



**HAL**  
open science

# Emulsions structurées et nanoparticules magnétiques dans un hydrogel : réalisation, caractérisation et validation en tant que système de délivrance thermomagnétique

Irena Markovic Milosevic-Markovic

► **To cite this version:**

Irena Markovic Milosevic-Markovic. Emulsions structurées et nanoparticules magnétiques dans un hydrogel : réalisation, caractérisation et validation en tant que système de délivrance thermomagnétique. Autre [cond-mat.other]. Université d'Orléans, 2009. Français. NNT : 2009ORLE2079 . tel-00547331

**HAL Id: tel-00547331**

**<https://theses.hal.science/tel-00547331>**

Submitted on 16 Dec 2010

**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.

**ÉCOLE DOCTORALE SCIENCES ET TECHNOLOGIES**

CENTRE DE RECHERCHE SUR LA MATIÈRE DIVISÉE

**THÈSE** présentée par :  
**Irena MILOSEVIC-MARKOVIC**

soutenue le : **20 novembre 2009**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université d'Orléans**

Discipline : Physique et chimie de la matière et des matériaux

**Emulsions structurées et nanoparticules  
magnétiques dans un hydrogel:  
réalisation, caractérisation et validation en tant  
que système de délivrance thermomagnétique**

**THÈSE dirigée par :**

**Marie-Louise SABOUNGI** Professeur, Université d'Orléans

**RAPPORTEURS :**

**Laurence MOTTE** Professeur, Université de Paris 13  
**Igor CHOURPA** Professeur, Université François Rabelais, Tours

**JURY:**

**Bruno CHAUDRET** Directeur de Recherche, CNRS Toulouse, *Président*  
**Etienne DUGUET** Professeur, Université de Bordeaux I  
**Laurence MOTTE** Professeur, Université de Paris 13  
**Igor CHOURPA** Professeur, Université François Rabelais, Tours  
**Jovan BLANUSA** Chargé de Recherche, Institut Vinča, Serbie  
**Samuel GUILLOT** Maître de Conférences, Université d'Orléans  
**Marie-Louise SABOUNGI** Professeur, Université d'Orléans











## *Remerciements*

Commençons par la fin, les remerciements ! Voici pour moi l'occasion à l'issue de trois années de travail de remercier toutes les personnes qui m'ont suivi, encouragé, et permis de découvrir la chance et la malchance d'être chercheur.

Je souhaite en tout premier lieu remercier les personnes qui m'ont fait l'honneur d'accepter d'être les membres de mon jury : M. Bruno Chaudret pour avoir présidé de façon exemplaire ce jury, mes rapporteurs, Mme Laurence Motte et M. Igor Chourpa pour avoir accepté de donner de leur temps pour évaluer ce manuscrit, ainsi que mes examinateurs, M. Etienne Duguet pour ses questions pertinentes et la clarté de ses remarques, de même que M. Jovan Blanusà pour les kilomètres parcourus depuis la Serbie. Merci à toutes ces personnes pour l'intérêt montré à cette étude.

Je tiens à exprimer toute ma gratitude et toute ma sympathie à Mme Marie-Louise Saboungi, Professeur, directrice du Centre de Recherche de la Matière Divisée qui fût aussi ma directrice de thèse pour sa gentillesse, sa bonne humeur, son ouverture d'esprit, et les bons moments passés en sa compagnie et celle de David. Merci sincèrement de m'avoir ouvert les portes du CRMD et de l'équipe Matériaux Complexes Confinés, et d'avoir toujours eu du temps à me consacrer.

Je n'oublie pas mes « coco-encadrants »: Samuel Guillot et Jean-Paul Salvetat. Je leur suis énormément reconnaissante pour leur amitié, leur patience, leur soutien moral et scientifique. Jean-Paul, merci de m'avoir fait confiance, de ne pas m'avoir oublié de Bordeaux, d'être venu à ma soutenance, et merci d'avoir toujours répondu à mes appels. Samuel, nous avons fait nos débuts au CRMD ensemble, jeune maître de conf (oui, jeune) en première année avec un agenda surchargé d'enseignements, tu n'as pas hésité à accepter d'encadrer ce travail et à prendre « la relève », tu t'es lancé dans le monde des nanos magnétiques avec moi, tu as cru en moi, et si tu ne m'avais pas soutenu lors de cette rédaction de thèse je ne sais pas si j'aurais pu finir.

Je suis également redevable à toutes nos diverses collaborations qui ont permis de finaliser cette thèse. J'ai pu apprécier les joies de la RPE des radicaux libres grâce au professeur László Forró, qui m'a si chaleureusement accueilli à l'Ecole Polytechnique Fédérale de Lausanne, merci particulièrement à Andrzej Sienkiewicz pour m'avoir initié à la RPE et à Katarzyna Pierzchala pour m'avoir supervisée lors des manip. Je tiens également à dire un grand merci à Katel Hervé et au professeur Igor Chourpa pour les mesures de SAA, de Raman et bien entendu pour les discussions qui m'ont éclairé sur le greffage des nanoparticules magnétiques. Merci à Mathieu Duttine pour m'avoir laissé en toute confiance la RPE de l'ICMCB et à l'équipe du professeur Etienne Duguet des matériaux hybrides (je pense notamment à Lydia et à Romain) pour m'avoir permis et aidé à faire les manip d'hyperthermie magnétique. Merci à Marin, Jovan, Vojislav, Vladan de l'institut Vinča en Serbie pour cette collaboration fructueuse et le SQUID. Merci à Rodolphe et Abdellah pour la méthode des  $3\omega$ . Les mesures de SAXS ont été effectuées au synchrotron Delta à Dortmund et je remercie à cette occasion les chercheurs et doctorants de cette institution qui sont très sympathiques. Merci à José Teixeira du

LLB à Saclay pour sa gentillesse et le temps de faisceau neutron, et à Janis Kliava du CPMOH à Bordeaux pour m'avoir tendu la main à propos des simulations des spectres RPE.

C'est avec beaucoup de nostalgie que j'en viens à remercier mes amis doctorants, ex-doctorants, post-doctorants, ou autre, pour tous ces moments, nos chemins se sont croisés à Orléans, j'ai trouvé en eux des amis fidèles et généreux : Hinda (ma copine de galère et de salsa « Oh piting con ! »), Kévin (l'homme qui ne sait pas dire non, concierge du labo et MdC), Yasin (le Turc qui danse le rock, et oui ça existe), Sébastien (dit le chevreuil, qui connaît tous les secrets de drague, très frontal !), Guérald (l'irremplaçable), Vincent (au travail !), Matthieu & Mathieu, José (Wolverine), Romain (mon prédécesseur), Nathalie (l'américain), Sandjib, Tri, Edouard (le voyageur), Marie-Pierre (qui s'adoucie avec le temps), Sarah (HamSarah, si mimi, courage !), Christine, Ludovic (Papa Ludo), Serigne, Jérôme (n'oublie pas ta promesse le jour J), Laurent (M. Poitiers), Abdellah (toujours un sac plein de cadeaux du Maroc), Julie, Haytam, Ling, Houcine, Chuanqiang, Karine, Mohamed, Rissel, bien sûr Geoffroy (oui-oui, buveur de rakia), merci à Zygus, Barambar et Caprioca pour mon single roumanesque.

Merci aux « rockeurs » pour le fabuleux concert : Alain, Xavier L., Christophe. Et merci aux permanents (ex et présent) : Fabienne M. (merci pour la relecture), Xavier B. (le king des jeux de mots !), Muzahim, Nicolas, Nanny, Sandrine, Faïza, Christiane, Sylvie, Christophe, Marylène, Margot, Caroline, Pascal, Roland (merci pour l'XPS), Fifi le mécano (et ses blagues), Nathalie, Françoise, Freddy, Hamidréza, ainsi que les autres.

Mes copines de course à pied vont me manquer énormément pour leur bonté de cœur et leur écoute dans les moments difficiles : Fabienne W. (merci pour la microscopie aussi, pour la relecture et pour tout le reste !), Marie-Pierre F., Séverine. Et l'équipe du secrétariat composée de Nicocole (Nini) et Jennifer (super Jenni), le meilleur secrétariat au monde : les filles vous ne pourrez jamais être méchantes même si vous le voulez !

Mes amis les plus fidèles m'ont beaucoup soutenu pendant ces trois années : Dragana, Nina, Bojana (ainsi que leurs conjoints), mais aussi Xavier, Lucie, JB, Mathilde, Steph !

Enfin c'est grâce à toute ma famille qui a toujours été à mes côtés et que j'aime plus qu'infiniment que j'ai vraiment pu réussir : mon Dejan, ma maman, mon papa, mes frères Igor & Ivan, ma belle-famille (Nešo, hvala !), mes cousines (Maja & Tamara) et ma tante (qui ont été si fières de moi), etc.

J'ai une pensée pour ma belle-maman et mes grand-mères qui ne sont malheureusement plus de ce monde et qui auraient été fières de moi.

# **TABLE DES MATIERES**

---



<b>CONTEXTE ET MOTIVATION.....</b>	<b>11</b>
<b>Chapitre I</b>	
<b>Etat de l'art : système de délivrance thermomagnétique.....</b>	<b>13</b>
<b>I.1. Les hydrogels magnétiques : concept et originalité.....</b>	<b>15</b>
<i>I.1.a. Rappel des propriétés magnétiques des nanoparticules.....</i>	<i>15</i>
<i>I.1.b. Relaxation de Néel et de Brown.....</i>	<i>16</i>
<i>I.1.c. Délivrance contrôlée de principe actif par action de nanoparticules magnétique.....</i>	<i>18</i>
<b>I.2. Les Isasomes : vecteurs lipidiques structurés.....</b>	<b>24</b>
<i>I.2.a. Emulsions et phases « cristal liquide ».....</i>	<i>24</i>
<i>I.2.b. Les systèmes non émulsifiés et le contrôle de la diffusion de PA.....</i>	<i>28</i>
<i>I.2.c. Les Isasomes et le contrôle de la diffusion de PA.....</i>	<i>29</i>
<b>I. 3. Bilan du chapitre I.....</b>	<b>31</b>
<b>Chapitre II</b>	
<b>Synthèse et caractérisation des nanoparticules d'oxyde de fer.....</b>	<b>33</b>
<b>II.1. Généralités sur les oxydes de fer .....</b>	<b>35</b>
II.1.1. Caractéristiques structurales.....	35
II.1.2. Ferrofluide et stabilisation colloïdale.....	36
II.1.3. Généralités sur la synthèse de nanoparticules d'oxyde de fer.....	37
<i>II.1.3.a. Synthèse par coprécipitation en milieu aqueux.....</i>	<i>37</i>
<i>II.1.3.b. Synthèse en milieu non aqueux type micelle inverse.....</i>	<i>38</i>
<b>II.2. Synthèse des nanoparticules d'oxyde de fer par voie chimique et préparation des ferrofluides.....</b>	<b>39</b>
II.2.1. Synthèse par coprécipitation de sels de fer.....	39
II.2.2. Synthèse par réduction d'acétylacétonate de fer type micelle inverse.....	41
<b>II.3. Résultats des synthèses de nanoparticules d'oxyde de fer.....</b>	<b>42</b>
II.3.1. Taille des nanoparticules.....	42

II.3.1.a. Synthèse par coprécipitation simple.....	43
II.3.1.b. Synthèse par coprécipitation assistée par les ultrasons.....	44
II.3.1.c. Synthèse type micelle inverse par réduction d'acétylacétonate de fer.....	45
II.3.2. Caractérisation structurale des nanoparticules d'oxydes de fer...	48
II.3.2.a. Synthèse par coprécipitation simple.....	48
II.3.2.b. Synthèse par coprécipitation assistée des ultrasons.....	51
II.3.2.c. Synthèse type micelle inverse par réduction d'acétylacétonate de fer.....	53
II.3.3. Propriétés magnétiques des nanoparticules d'oxyde de fer.....	54
II.4. Conclusion sur les synthèses des nanoparticules d'oxyde de fer..	56

## Chapitre III

### Conception et mise au point d'un système de délivrance thermomagnétique.....

#### III.1. Introduction.....

#### III.2. Préparation et caractérisation des Isasomes et de l'hydrogel magnétique.....

##### III.2.1. Emulsions de mésophases lipidiques.....

###### III.2.1.a. Auto-assemblage, transitions de phase et caractérisation structurale.....

###### III.2.1.b. L'interface des émulsions : définition d'un tensioactif, propriétés des agents tensioactifs, balance HLB.....

###### III.2.1.c. Effet de l'émulsifiant sur la taille des émulsions et leur stabilité.....

###### III.2.1.d. Effet du tensioactif sur la structure interne des Isasomes.....

##### III.2.2. Encapsulation de nanoparticules magnétiques hydrophobes dans les Isasomes.....

###### III.2.2.a. Choix du PA et influence du PA sur la structure des émulsions.....

###### III.2.2.b. Effet du confinement des NPM sur la structure interne des émulsions.....

###### III.2.2.c. Effet du confinement sur la taille des émulsions.....

###### III.2.2.d. Polymérisation des émulsions.....



<i>III.2.2.e. Confinement des NPs dans les émulsions polymérisées.....</i>	<b>83</b>
<b>III.2.3. Préparation des hydrogels magnétiques.....</b>	<b>87</b>
<i>III.2.3.a. Choix du polymère et préparation des hydrogels magnétiques.....</i>	<b>87</b>
<i>III.2.3.b. Capacité d'absorption des hydrogels mixtes.....</i>	<b>89</b>
<i>III.2.3.c. Echauffement des NPM sous champ magnétique alternatif</i>	<b>90</b>
<b>III.3. Utilisation de la RPE pour suivre la diffusion de PA.....</b>	<b>93</b>
<b>III.3.1. Principe de la RPE.....</b>	<b>93</b>
<b>III.3.2. Caractérisation du signal RPE du TEMPO.....</b>	<b>95</b>
<b>III.3.3. Etude de la diffusion du PA hors du gel dans des systèmes avec et sans émulsion.....</b>	<b>103</b>
<b>III.3.4. Etude de la diffusion du PA hors du gel en fonction du temps et de la température régulée par un bain externe.....</b>	<b>107</b>
<b>III.3.5. Etude de la délivrance du PA hors du gel par activation thermomagnétique.....</b>	<b>108</b>
<b>III.4. Conclusion du chapitre III.....</b>	<b>111</b>
<b>Chapitre IV</b>	
<b>Hydrogel réticulé par les nanoparticules magnétiques.....</b>	<b>113</b>
<b>IV.1. Introduction.....</b>	<b>115</b>
<b>IV.2. Modification de surface des NPM.....</b>	<b>116</b>
<b>IV.2.1. Etat de surface des NPM.....</b>	<b>116</b>
<b>IV.2.2. Méthodes de silanisation : Comparaison de la silanisation par US et par traitement thermique.....</b>	<b>118</b>
<i>IV.2.2.a. Détermination du point isoélectrique.....</i>	<b>120</b>
<i>IV.2.2.b. Analyse par spectrométrie IRTF des nanoparticules silanisées.....</i>	<b>121</b>
<i>IV.2.2.c. Microscopie électronique en transmission.....</i>	<b>123</b>
<i>IV.2.2.d. Analyse thermogravimétrique.....</i>	<b>125</b>
<b>IV.2.3. Modification de surface des NPM silanisées par des fonctions carboxyliques.....</b>	<b>126</b>
<i>IV.2.3.a. Détermination du PI par zétamétrie.....</i>	<b>126</b>
<i>IV.2.3.b. Analyse par spectrométrie IRTF.....</i>	<b>127</b>
<i>IV.2.3.c. Microscopie électronique en transmission.....</i>	<b>128</b>

<b>IV.3. Réticulation des chaînes d'acide hyaluronique par les NPM modifiées.....</b>	<b>129</b>
<b>IV.3.1. Hydrogel magnétique d'acide hyaluronique : principe de la réticulation.....</b>	<b>129</b>
<b>IV.3.2. Liaison des NPM à l'hydrogel.....</b>	<b>130</b>
<b>IV.4. Conclusion du chapitre IV.....</b>	<b>135</b>
<b>CONCLUSION GENERALE.....</b>	<b>137</b>
<b>PERSPECTIVES.....</b>	<b>139</b>
<b>ANNEXES.....</b>	<b>141</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</b>	<b>153</b>

# CONTEXTE ET MOTIVATION

---

*« La théorie, c'est quand on sait tout et que rien ne fonctionne. La pratique, c'est quand tout fonctionne et que personne ne sait pourquoi. Si la pratique et la théorie sont réunies, rien ne fonctionne et on ne sait pas pourquoi. »*

*A. Einstein*

La nanomédecine est un vaste domaine où la nanotechnologie s'applique au travers d'applications biomédicales. L'intérêt vient du contrôle de l'infiniment petit qui nous ouvre désormais les portes de la Santé et nous permet d'intervenir au niveau cellulaire. Les nanotechnologies ont ainsi fait progresser la médecine là où les méthodes traditionnelles connaissaient certaines limites. Elles ont aidé à améliorer le diagnostic [Jokerst J. V. *et al.*, 2009], l'administration de médicaments [Peppas N. A., 2004] ou bien permis le développement de nouveaux agents thérapeutiques [Mikhail A. S. *et al.*, 2009]. De plus en plus, les termes de « système intelligent » ou de « thérapie intelligente » sont employés pour dépeindre la nanomédecine [Hilt J. Z., 2004 ; Peppas N. A., 2004]. Par « intelligent » on qualifie des biomatériaux sensibles à l'environnement local, ou à un stimulus externe ; ils sont fonctionnalisés de sorte à les rendre très spécifiques.

Avant de s'intéresser aux nanoparticules magnétiques d'oxyde de fer et aux émulsions nanostructurées, l'équipe matériaux complexes confinés (MCC) du Centre de Recherche sur la Matière Divisée (CRMD/Université d'Orléans) a récemment développé un axe de recherche concernant les biomatériaux, qui a débuté par l'étude de l'encapsulation de principes actifs (PA) dans des nanostructures poreuses (silice mésoporeuse), dont la libération est contrôlée par reconnaissance moléculaire. En particulier, le taux de diffusion des espèces confinées est modulé par le contrôle de la taille des pores et la fonctionnalité de surface des nanoparticules. L'idée est de poursuivre cette démarche avec un nouveau type de matériau divisé, biocompatible et pouvant être mis en forme facilement.

Dans le cadre de cette thèse, nous nous sommes attachés à l'utilisation des nanoparticules magnétiques pour les applications biomédicales. Elles sont déjà utilisées en imagerie médicale comme agents de contraste [Kim D. H. *et al.*, 2009], en thérapie pour l'ablation thermique des tumeurs [Hou C. H. *et al.*, 2009], en biologie pour la détection, la purification et l'isolation de protéines et d'ADN [Atintas E. B. *et al.*, 2009], ou en tant qu'agents de transfection magnétique [Lee Y. J. *et al.*,

2009], dans la délivrance de médicaments [Benyettou F. *et al.*, 2009] ou encore pour la fabrication de biocapteurs [Li J. *et al.*, 2009]. De nombreuses sociétés développent cette technologie et l'innovation dans ce domaine est permanente.

Le but de ce travail est de créer un hydrogel qui contient durablement un médicament et dont la diffusion peut être déclenchée par un stimulus externe thermomagnétique. Pour cela, divers matériaux vont être utilisés pour constituer le matériau: des émulsions de mésophases lipidiques (Isasomes), des hydrogels et bien sûr les nanoparticules magnétiques d'oxyde de fer.

Pour obtenir un système de délivrance de principe actif efficace nous avons suivi le processus suivant :

- Dans un premier temps, les nanoparticules d'oxydes de fer ont été synthétisées par différentes méthodes chimiques. La structure, la forme, la taille, le magnétisme de ces particules ont été caractérisés. La meilleure voie de synthèse a été sélectionnée pour la suite du travail.
- Ensuite, un premier système de délivrance thermomagnétique alliant un hydrogel physique thermosensible, des NPM et des Isasomes a été mis au point. Des mesures de diffraction aux petits angles ont permis de déterminer la stabilité et la structure interne des gouttelettes suite à l'ajout des différents additifs. De plus, la préparation de l'hydrogel magnétique et la capacité des nanoparticules à échauffer le système sont exposées. Nous utiliserons ici une technique originale, la résonance paramagnétique électronique, pour suivre les processus de diffusion de PA par activation thermomagnétique.
- Enfin, nous avons modifié la surface des nanoparticules magnétiques d'oxyde de fer dans le but de réticuler l'hydrogel. Les différentes étapes de la fonctionnalisation seront présentées et caractérisées.
- Une synthèse des résultats significatifs et des perspectives seront présentées dans le dernier chapitre du manuscrit.

Pour ce travail, différentes collaborations ont été initiées avec :

- le Laboratoire de Physique de la Matière Condensée en Serbie (Vinca Institut) pour les mesures magnétiques dans le cadre d'un projet d'échange de chercheurs.
- l'Ecole Polytechnique Fédérale de Lausanne en Suisse dans l'équipe du Professeur Lazslo Forro pour les résultats préliminaires de RPE et l'initiation à l'utilisation des sondes radicalaires type nitroxyde. Cette collaboration a été possible grâce à un PICS.
- l'ICMCB de Bordeaux avec l'équipe du Professeur Etienne Duguet pour la partie hyperthermie magnétique couplée à la RPE.
- l'équipe « Nanovecteurs magnétiques pour la chimiothérapie » de l'UFR de Pharmacie, Université de François Rabelais de Tours pour le Raman.

**Chapitre I**  
**Etat de l'art**  
**Systemes de délivrance**  
**thermomagnétique**

---

*« Pour préparer l'avenir, il faut éclaircir le passé. »*

---

<b>Chapitre I</b>	
<b>Etat de l'art : système de délivrance thermomagnétique.....</b>	<b>13</b>
<b>I.1. Les hydrogels magnétiques : concept et originalité.....</b>	<b>15</b>
<i>I.1.a. Rappel des propriétés magnétiques des nanoparticules.....</i>	<i>15</i>
<i>I.1.b. Relaxation de Néel et de Brown.....</i>	<i>16</i>
<i>I.1.c. Délivrance contrôlée de principe actif par action de nanoparticules           magnétique.....</i>	<i>18</i>
<b>I.2. Les Isasomes : vecteurs lipidiques structurés.....</b>	<b>24</b>
<i>I.2.a. Emulsions et phases « cristal liquide ».....</i>	<i>24</i>
<i>I.2.b. Les systèmes non émulsifiés et le contrôle de la diffusion de PA.....</i>	<i>28</i>
<i>I.2.c. Les Isasomes et le contrôle de la diffusion de PA.....</i>	<i>29</i>
<b>I. 3. Bilan du chapitre I.....</b>	<b>31</b>

---

## **I.1. Les hydrogels magnétiques : concept et originalité**

La délivrance contrôlée d'un principe actif (PA) a lieu lorsqu'un matériau, synthétique ou naturel, est combiné avec un PA de telle sorte qu'il soit délivré de manière pré-établie. Quelle que soit la façon de concevoir cette délivrance (lente, rapide, cyclique, etc.), le but est de la contrôler afin d'améliorer l'efficacité des traitements et d'éviter les problèmes de sous ou sur-dosage. Ce mode d'administration contrôlée permet d'imaginer des systèmes utilisant au mieux les médicaments. Si un tel système a beaucoup d'avantages, il faut garder en mémoire la possible toxicité de ses constituants, leur incompatibilité biologique mais aussi leur coût intrinsèque, parfois supérieur aux matériaux déjà existants, et leur mise en œuvre souvent complexe.

L'utilisation des nanomatériaux pour la délivrance contrôlée de PA constitue le cœur de cette thèse. Ces dernières années, les recherches dans ce domaine se sont orientées vers le développement de nouveaux nanomatériaux dits intelligents pouvant répondre à des stimuli externes tels que le pH, le champ électrique, la température ou le champ magnétique. La finalité est de mettre au point un système permettant de répondre à l'un de ces stimuli en déclenchant la délivrance d'un PA. Dans ce travail, nous nous sommes intéressés au stimulus magnétique.

Les hydrogels magnétiques utilisés dans la délivrance contrôlée de PA peuvent répondre de différentes manières au stimulus magnétique. Les propriétés magnétiques intrinsèques du matériau jouent un rôle primordial dans cette réponse. Ainsi, ce sont à la fois les propriétés physiques de chacun des constituants du composite et les propriétés physiques des nanoparticules magnétiques qui vont définir notre matériau et son efficacité.

### ***I.1.a. Rappel des propriétés magnétiques des nanoparticules***

La compréhension des phénomènes magnétiques intervenants à l'échelle « nano » est nécessaire afin d'expliquer l'intérêt que l'on porte à ce type de matériau et de quelle façon nous allons nous en servir pour opérer une délivrance contrôlée. Cette partie n'est pas exhaustive ; elle permet simplement de rappeler des notions générales.

Les nanomatériaux sont constitués d'un assemblage de particules de taille nanométrique. A cette échelle, les matériaux possèdent des propriétés souvent totalement différentes de celles des mêmes matériaux massifs. Lorsque la taille d'un matériau magnétique diminue, son processus d'aimantation change. Le matériau, constitué de plusieurs domaines magnétiques à l'état massif, ne présente à l'échelle nanométrique plus qu'un seul domaine [Frenkel J. & Dorfman J., 1930]. Les particules magnétiques monodomains sont ferromagnétiques.

Dans ces systèmes monodomains, chaque particule possède un moment magnétique permanent bloqué dans des directions cristallographiques appelées axes ou directions de facile aimantation en-dessous d'une température dite de Curie. Cette direction est en général un axe cristallographique privilégié, associé à une énergie d'anisotropie magnétocristalline. Lorsque le moment magnétique s'aligne sur l'axe de facile aimantation, l'énergie potentielle est minimale. Ainsi,

l'énergie d'anisotropie magnétocristalline de nanoparticules monodomaines s'exprime par la relation suivante issue de la théorie de Stoner-Wohlfarth :

$$E_A = KV \sin^2 \theta$$

où  $K$  est la constante d'anisotropie magnétocristalline,  $V$  le volume de la nanoparticule, et  $\theta$  l'angle entre la direction de l'aimantation et l'axe de facile aimantation.

Lorsque le volume de la particule diminue en-deçà d'une taille critique, l'énergie d'anisotropie, qui maintient l'aimantation des nanoparticules dans une direction précise, devient comparable à l'énergie d'agitation thermique,  $k_B T$  ( $k_B$  la constante de Boltzman) au voisinage d'une température de blocage  $T_B$ . La barrière d'énergie d'anisotropie est alors si faible que les moments magnétiques peuvent basculer aisément d'une orientation de facile aimantation à une autre. Ce phénomène magnétique est le superparamagnétisme et caractérise le comportement d'un ensemble de particules ferromagnétiques monodomaines lorsque la température  $T$  est supérieure à la température de blocage  $T_B$ . Louis Néel fut le premier, en 1949, à rapporter cet état magnétique particulier concernant des très fines particules, sans pour autant le nommer comme tel [Néel L., 1949; Dormann J. L., 1981].

Le temps caractéristique  $\tau$ , associé à ce mécanisme de relaxation thermique de l'aimantation d'une nanoparticule peut être décrit par une loi d'Arrhénius :

$$\tau = \tau_0 \exp\left(\frac{E_A}{k_B T}\right)$$

où  $E_A$  est la barrière d'énergie magnétique à franchir afin de retourner l'aimantation, et  $\tau_0$  est le temps de relaxation pour une barrière d'énergie nulle.

Bean et Livingston ont montré que les nanoparticules magnétiques (NPM) agissent tels des atomes paramagnétiques. En effet, si le temps de mesure d'aimantation est inférieur au temps de relaxation  $\tau$ , le moment magnétique de la particule est dans son état bloqué, le matériau est alors considéré comme ferromagnétique. Par contre, si le temps de mesure est supérieur à  $\tau$ , l'aimantation paraîtra nulle et tout se passera comme si on avait un matériau paramagnétique avec un supermoment magnétique, d'où le nom donné au phénomène de superparamagnétisme [Bean C. P., 1955; Bean C. P & Livingston J. D., 1959; Rondinone A. J. *et al.*, 1999, Pankhurst Q. A. *et al.*, 2003].

Le mécanisme de relaxation de Néel (ou relaxation superparamagnétique), décrit par la loi  $\tau_N = \tau_0 \exp\left(\frac{KV}{k_B T}\right)$ , dépend de la taille  $V$  des nanoparticules [Okawa K. *et al.*, 2006] et de la température  $T$ .

### ***I. 1. b. Relaxation de Néel et de Brown***

En fait, ces deux mécanismes de relaxation peuvent être considérés dans le cas de nanoparticules magnétiques. Ils sont tous deux présents dans le cas de nanoparticules superparamagnétiques.



Dans le cas de nanoparticules ferromagnétiques, c'est le mécanisme de Brown qui domine. La relaxation de Brown dépend surtout de l'environnement local des nanoparticules car c'est l'ensemble de la particule qui effectue un mouvement de rotation ; il est décrit par la loi  $\tau_B = \frac{3\eta V_h}{k_B T}$ , où  $V_h$  est le volume hydrodynamique de la particule et  $\eta$  la viscosité du milieu.

Dans le mécanisme de Néel, c'est le moment de chaque particule qui tourne. La compréhension des processus de relaxation et du phénomène d'échauffement local y étant associé a donné naissance à un nouveau type de thérapie médicale basé sur les propriétés magnétiques des nanoparticules. Un autre phénomène magnétique peut aussi être dû à l'échauffement local et est connu sous le nom de perte par hystérésis [Lacroix J. M. *et al.*, 2009].

Depuis 1999, de nombreux travaux concernent le traitement du cancer par hyperthermie magnétique [Jordan A. *et al*, 1999, Hiergeist R. *et al*, 1999; Yang J. K. *et al*, 2007]. Il consiste à chauffer localement une tumeur cancéreuse à l'aide de nanoparticules magnétiques jusqu'à atteindre des températures comprises entre 41 et 46°C. A ces températures, les cellules tumorales ne sont plus viables [Chatterjee J. *et al*, 2005; Kettering M. *et al*, 2007; Fortin J. P. *et al*, 2008].

Cette augmentation de température est rendue possible en utilisant les modes de relaxation précédents. En appliquant un champ magnétique, les nanoparticules ferromagnétiques ou superparamagnétiques disposent d'une énergie suffisante pour orienter et retourner leurs moments magnétiques, et ainsi franchir la barrière d'énergie. En utilisant un champ magnétique alternatif, les nanoparticules sont soumises à une relaxation alternée, qui va induire l'augmentation de la température locale. Ce phénomène de génération de chaleur par un champ magnétique alternatif a été décrit par Rosensweig [Rosenweig R. E., 2002]. La chaleur libérée lors de l'échauffement magnétique doit être quantifiée dans le but de déterminer et comparer l'efficacité des différents systèmes. La capacité des nanoparticules à chauffer est évaluée par la mesure du taux d'absorption spécifique ou puissance d'échauffement massique, la SAR (*specific absorption rate*) [Pankhurst Q. A. *et al*, 2003; Schmidt A. M., 2005; Mornet S. *et al*, 2006]:

$$SAR = C \times \left( \frac{\Delta T}{\Delta t} \right)$$

$C$  est la capacité calorifique spécifique de l'échantillon avec  $C = \frac{C_{solvant}}{x_{magn}}$  où  $C_{solvant}$  est la capacité

calorifique massique du solvant,  $x_{magn} = \frac{m_{magn}}{m_{solvant}}$ ,  $m_{magn}$  et  $m_{solvant}$  étant les masses de l'élément

magnétique (le fer) et du solvant.  $\frac{\Delta T}{\Delta t}$  est la pente à l'origine de la courbe de la température en fonction du temps.

La SAR est en d'autres termes la puissance libérée sous forme de chaleur par gramme d'élément magnétique.

### ***1.1.c. Délivrance contrôlée de principe actif par action de nanoparticules magnétiques***

Les hydrogels sont d'excellents candidats pour des applications biomédicales. En effet, ils sont constitués de polymères, qui ont la capacité d'absorber une grande quantité d'eau. Leur faculté de pouvoir se gonfler (en absorbant de l'eau) ou de « se dégonfler » (en expulsant de l'eau) se déclenche par le pH, la force ionique ou la température [Peppas N. A., 2003; Peppas N. A. *et al.*, 2000; Satish C. S. *et al.*, 2006; Jeong B. *et al.*, 2002].

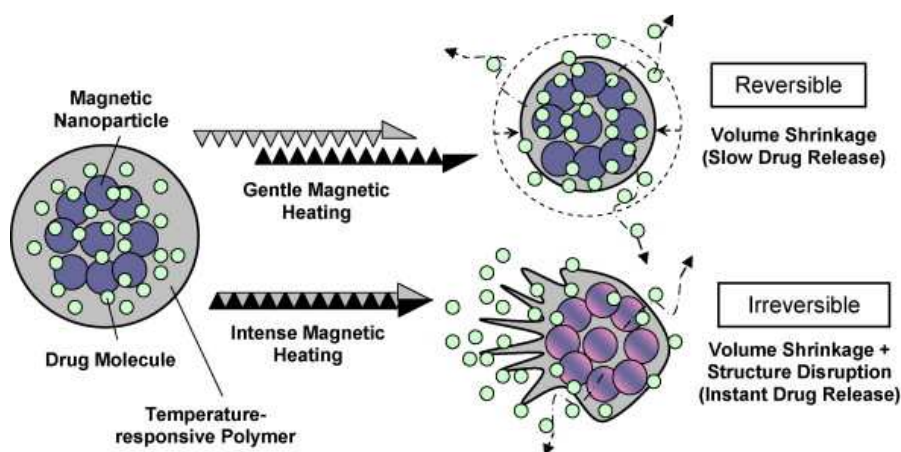
Il est donc possible d'imaginer de nombreux systèmes composites de délivrance de PA originaux prenant en compte à la fois les propriétés physiques intrinsèques des nanoparticules magnétiques [Arruebo M. *et al.*, 2007] et les propriétés physico-chimiques des hydrogels. Les systèmes composites contrôlés par application d'un stimulus magnétique peuvent être classés en trois catégories principales :

- Les composites à activation thermique [Liu T. Y. *et al.*, 2009] ;
- Les composites ayant une réponse magnétique on/off [Liu T-Y. *et al.*, 2006] ;
- Les nano-composites à guidage magnétique dans le corps [Liu X. *et al.*, 2007].

Selon le type de délivrance visé, plusieurs compositions peuvent être réalisées. Ainsi, un matériau à guidage magnétique dans le corps peut aussi délivrer le PA par activation thermique [Müller-Schulte D. *et al.*, 2006].

#### **Les composites à activation thermomagnétique**

Ces composites combinent des nanoparticules magnétiques (NPM) à des hydrogels thermosensibles. Récemment, Liu *et al.* ont répertorié tous les polymères thermosensibles utilisés ainsi que leur LCST (lower critical solution temperature, température au-dessus de laquelle l'échantillon présente deux phases : l'eau et une phase riche en polymère) [Liu T. Y. *et al.*, 2009]. Au-dessus de la LCST, le polymère perd sa solubilité dans l'eau, alors qu'en-dessous de cette température critique, il devient hydrosoluble [L'Alloret F. *et al.*, 1997]. D'après Liu, deux mécanismes de délivrance sont possibles en employant ce type de polymères qui présente une microséparation de phase. Le schéma suivant décrit ces mécanismes :

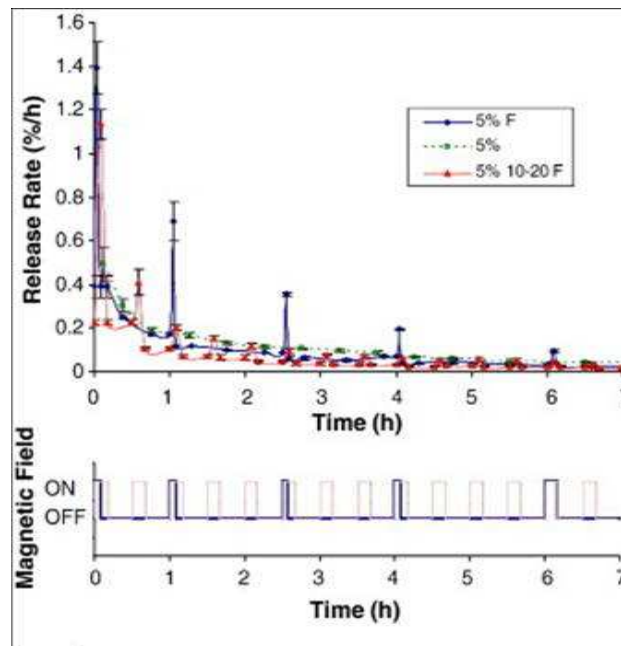


**Figure I.1. Mécanismes de diffusion de PA par chauffage magnétique [Liu T. Y. *et al.*, 2009].**

Un chauffage magnétique modéré permet de libérer le PA (et de l'eau) progressivement pendant que le réseau du polymère se contracte sans altération. Au contraire, sous chauffage magnétique intense, la diffusion du PA est quasi-instantanée, et la structure de l'hydrogel est par ailleurs détruite. Le polymère le plus fréquemment utilisé est le poly(*N*-isopropylacrylamide), de LCST comprise entre 30 et 34°C [Liu T. Y. *et al.*, 2009; Xulu M. P. *et al.*, 2000; Zrinyi M., 2000; Müller-Schulte D. *et al.*, 2006; Rubio-Retama J. *et al.*, 2007; Satarkar N. S. & Hilt J. Z., 2008; Lien Y. S. & Wu T. M., 2008; Satarkar N. S. & Hilt J. Z., 2008].

En 2000, un hydrogel magnétique a été formulé à partir de poly(NIPAAm) (poly(*N*-isopropylacrylamide)) et de NPM. La présence des NPM semble ne pas modifier les propriétés thermosensibles de l'hydrogel, ni sa LCST et permet de contrôler le composite grâce à un champ magnétique [Zrinyi M., 2000].

Plus récemment, Satarkar et Hilt ont conçu un hydrogel magnétique composite à base de poly(NIPAAm) et de NPM de 25 nm, enrobées par du polyvinylpyrrolidone. Les impulsions magnétiques hautes fréquences ont permis de contrôler la diffusion du bleu de méthylène (molécule de PA modèle de cette étude) [Satarkar N. S. & Hilt J. Z., 2008].



**Figure I.2. Diffusion de PA par champ magnétique pulsé [Satarkar N. S. & Hilt J. Z., 2008].**

En comparant le bleu de méthylène à la vitamine B1 qui a une masse quatre fois plus importante, les auteurs ont observé une vitesse de diffusion du bleu de méthylène plus grande (loi de Stokes-Einstein).

Müller-Schulte et Schmitz-Rode ont synthétisé des vecteurs magnétiques sphériques de poly(NIPAAm) par polymérisation inverse en suspension. Ce type de polymérisation permet d'encapsuler à la fois le colloïde magnétique et les molécules modèles de PA dans la matrice de polymère. A l'application du champ magnétique alternatif, les NPM génèrent de la chaleur permettant d'atteindre une température supérieure à la LCST et de faire diffuser les PA.

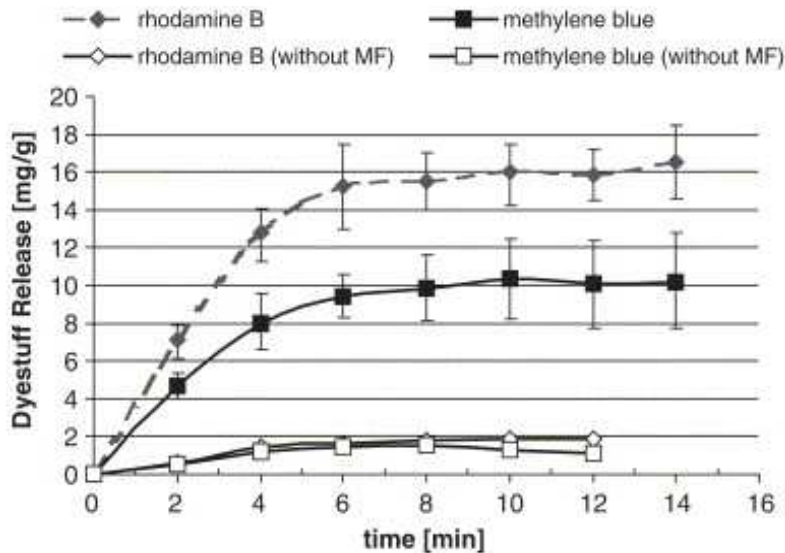


Figure I.3. Diffusion du bleu de méthylène et de la rhodamine B hors du système poly(NIPAAM)/NPM avec et sans (without MF) champ magnétique [Müller-Schulte D. *et al.*, 2006].

Le profil de diffusion du bleu de méthylène diffère de celui de la rhodamine B. D'après les auteurs, le bleu de méthylène présente des charges positives qui entrent en interaction ionique avec le ferrofluide anionique, ralentissant sa diffusion à travers l'hydrogel [Müller-Schulte D. *et al.*, 2006].

L'équipe de Liu *et al.* a travaillé sur le copolymère tribloc F127, caractérisé par une température micellaire critique de 20 à 36°C [Alexandridis P. *et al.*, 1994; Liu T. Y. *et al.*, 2009]. Ils ont observé que des nanoparticules composées d'un cœur d'oxyde de fer et d'une couronne de F127 ont une LCST plus élevée que le F127 seul à la même concentration [Liu T.Y. *et al.*, 2007]. Par la suite, un composite thermosensible a été réalisé par un procédé de synthèse *in situ* de NPM dans des nanosphères de F127. Ce matériau offre une réponse très rapide au stimulus thermomagnétique.

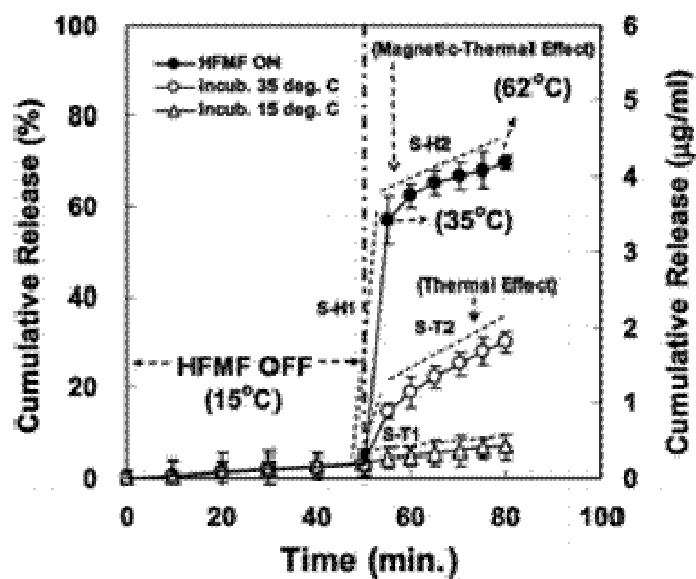


Figure I.4. Suivi de la délivrance de la doxorubicine à partir de nanosphères de F127/NPM par application d'un champ magnétique haute fréquence (50-100 kHz) [Liu T. Y. *et al.*, 2008].

Comme le suggèrent les données de la figure I.4., la délivrance du PA n'est pas uniquement due à un effet thermique des NPM mais dépend aussi d'un éventuel changement structural de l'architecture polymérique. En effet, dans un bain thermostaté à 35°C, la cinétique est 4,9 fois plus lente que dans le cas du chauffage magnétique à 35°C mais n'est pas négligeable [Liu T. Y. *et al.*, 2008]. Un autre exemple de matériau composite à base de F127 consiste en des capsules fabriquées en connectant les copolymères de F127 par de la gélatine. Ces particules à coques, qui contiennent des nanoparticules d'oxyde de fer et un PA, ont un rôle de stockage et de protection. Lorsque le champ magnétique est activé, les NPM génèrent de la chaleur et les capsules sont détruites irréversiblement, délivrant très rapidement le PA (près de 80% en 5 minutes) [Liu T. Y. *et al.*, 2009].

La gélatine, obtenue par hydrolyse partielle du collagène, est biocompatible. Mélangée à de l'eau, elle forme un gel aux basses températures et fond lorsqu'elle est chauffée. L'étude de l'effet d'un champ magnétique oscillant montre que la diffusion du PA est essentiellement due au mouvement des NPM (et non à l'augmentation de température générée par ces dernières). Par ailleurs, une étude en fonction du poids moléculaire de la molécule modèle de PA démontre que plus la molécule est grande, plus la diffusion est ralentie [De Paoli V. M. *et al.*, 2006].

Certaines associations de polymères permettent d'optimiser l'effet recherché [Hernandez R. *et al.*, 2009; Zhang J. L. *et al.*, 2007; Stover T. C. *et al.*, 2008]. Par exemple, l'ajout de chitosan à la gélatine offre des possibilités supplémentaires pour le stockage du PA et un point d'ancrage pour les NPM. L'activation magnétique haute fréquence va chauffer et déformer la microstructure du matériau, la réponse est la diffusion du PA [Hu S. H. *et al.*, 2007].

### **Les composites à réponse magnétique on/off**

Un matériau à réponse magnétique de type on/off est une classe de composites qui ne répond qu'au seul stimulus magnétique - et non plus thermomagnétique - pour libérer le PA. Contrairement à la précédente catégorie, le matériau intégrant le PA n'est pas thermosensible. Néanmoins, le processus de diffusion reste contrôlé par un déclenchement magnétique.

En 2005, Giu *et al.* proposent un mécanisme de délivrance alliant les NPM à des nanoparticules de silice mésoporeuse (MSN) avec des pores d'environ 3 nm. Ce mécanisme consiste à fonctionnaliser les NPM à la surface des pores pour piéger le PA (fluorescéine) à l'intérieur des canaux des MSN (cf. fig. 6). Les NPM étant liées par des ponts disulfures, la délivrance de PA est activée en clivant ces liaisons par des agents réducteurs dans un premier temps, puis en attirant les NPM à l'aide d'un aimant [Giri S. *et al.*, 2005].

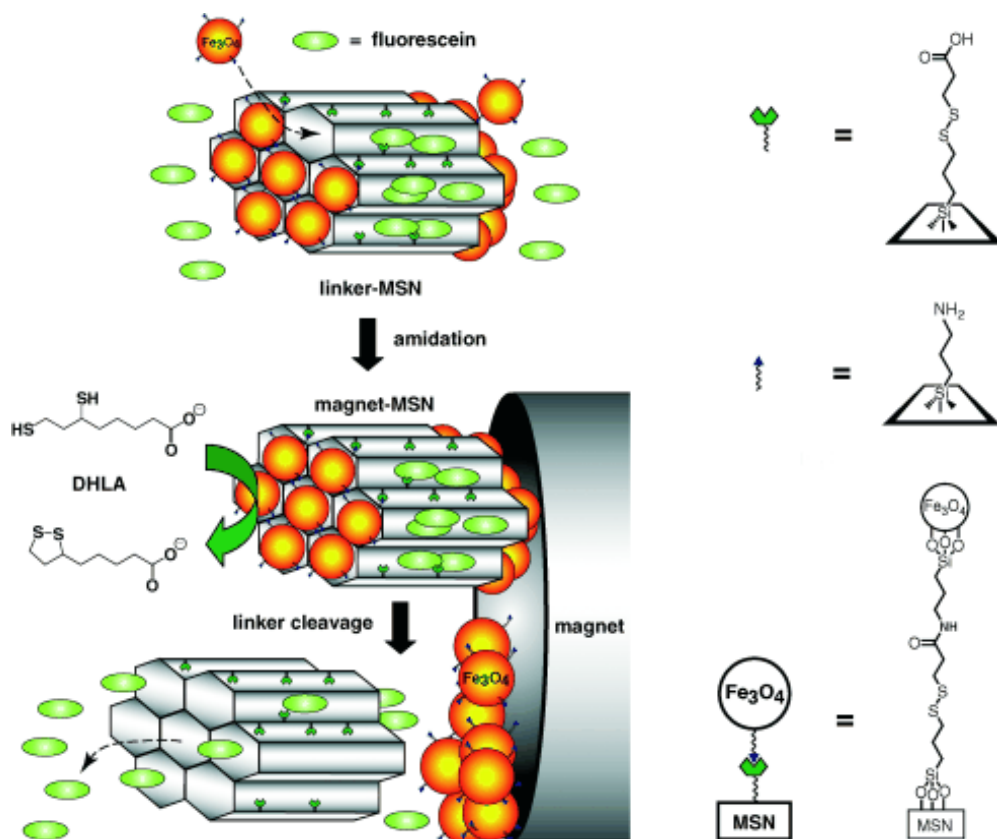
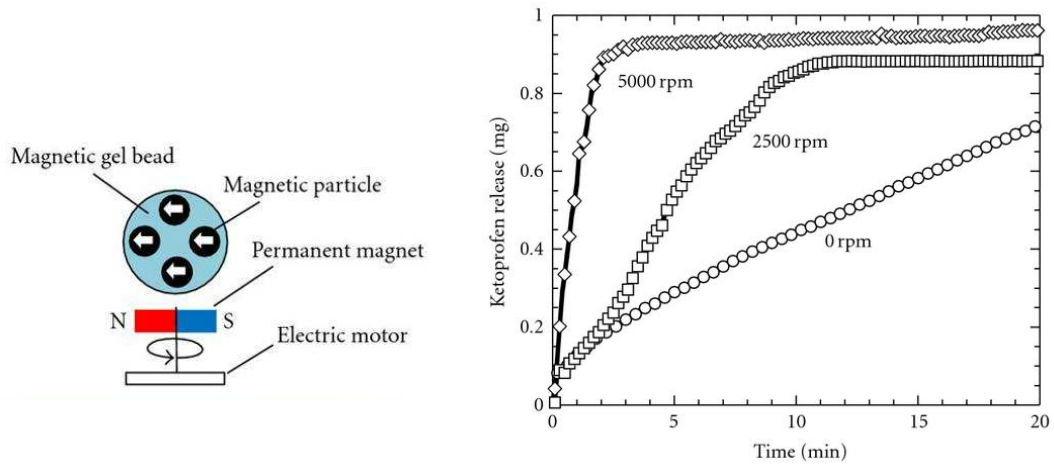


Figure I.5. Mécanisme de délivrance par clivage et attraction magnétique [Giri S. *et al.*, 2005].

Ce confinement du PA est très efficace et lorsque le «bouchon magnétique» est retiré, 85% du PA diffuse en 48 heures.

Pourtant des chercheurs ont observé un effet contraire du champ magnétique sur des polymères magnétiques. Alors que dans les cas précédents l'application d'un champ magnétique active la diffusion, dans leur cas, elle est ralentie voire stoppée. L'équipe de Chen, qui s'est aussi intéressée aux hydrogels magnétiques thermosensibles, a développé des polymères magnétiques à base de gélatine puis de PVA (polyvinyl alcool). La dispersion de NPM ferromagnétiques dans la matrice du polymère permet d'agir sur la porosité du réseau de polymère. Quand un champ magnétique continu est appliqué, le réseau se contracte car les NPM sont attirées les unes vers les autres, l'enchevêtrement de chaînes empêche le PA de passer librement à travers le réseau de pores (longueur de corrélation du réseau) jusqu'à la surface du matériau. Au contraire, lorsque le champ est nul le PA diffuse plus rapidement [Liu T. Y. *et al.*, 2006; Liu T. Y. *et al.*, 2006; Liu T. Y. *et al.*, 2007; Huang L. Y. & Yang M. C., 2007].

Très récemment, Mitsumata a tenté d'expliquer l'influence de la rotation de particules d'alginate magnétiques sur la diffusion de PA. Les NPM utilisées dans son étude sont des ferrites de baryum et le PA, le kétoprofène [Mitsumata T. *et al.*, 2008].



**Figure I.6. Principe de délivrance de PA induit par rotation des particules (à gauche). Quantité de kétoprofène diffusée en fonction de la vitesse de rotation des particules d'alginate magnétiques (à droite).**

Lorsque la vitesse de rotation des particules augmente, la délivrance de PA s'accélère d'un facteur 8. Ceci serait le résultat de l'effondrement de la structure des particules de gel, d'une certaine façon, érodées par les mouvements d'eau dûs à la rotation [Mitsumata T. *et al.*, 2008].

### Les micro ou nano-composites à guidage magnétique dans le corps (drug targeting)

La catégorie de matériaux concernant le guidage magnétique est la plus vaste [Lübbe A. S. *et al.*, 2001; Dobson J., 2006 ; Lalatonne Y. *et al.*, 2008]. Dans ce cas, les NPM peuvent, du fait de leurs propriétés magnétiques, être dirigées dans le corps à l'aide d'un gradient de champ magnétique. De plus, en les fonctionnalisant pour former des structures cœur-couronne, il est tout à fait envisageable de les utiliser comme sondes de reconnaissance [Lalatonne Y. *et al.*, 2009] ou comme vecteurs de PA [Banerjee S.S. *et al.*, 2009]. Les objets utilisés sont en général des liposomes, des micro ou nanocapsules, des micro ou nanosphères de polymère. Le PA est confiné dans la couronne [Yoon T. J. *et al.*, 2005; Zhao W. *et al.*, 2008], dans le coeur ou lié directement à la surface des vecteurs particules [Banerjee S.S. *et al.*, 2009]. L'administration du PA est locale et le gradient de champ magnétique sert uniquement à guider les composites jusqu'à l'organe ou tissu cible à traiter. Les recherches dans ce domaine sont les plus avancées. En effet, les premiers essais précliniques et cliniques ont déjà été réalisés en 1996 avec des ferrofluides de magnétites enrobées d'anhydroglucose, le PA était un anti-cancéreux, l'épirubicine, adsorbé chimiquement sur les particules. Le PA, une fois concentré à l'endroit visé, se désorbe. Ces essais ont montré une bonne tolérance des patients vis-à-vis des ferrofluides thérapeutiques [Lübbe A. S., Bergemann C., Riess H. *et al.*, 1996; Lübbe A. S., Bergemann C., Huhnt W. *et al.*, 1996].

Les polymères biodégradables tels que les nanosphères magnétiques de polylactide-co-glycolide (PLGA) [Gomez-Lopera S. A. *et al.*, 2001 ; Okassa Ngaboni L. *et al.*, 2005; Okassa Ngaboni L. *et al.*, 2007; Liu X. *et al.*, 2007], ou de poly(L-lactique acide) (PLLA) [Hu F. X. *et al.*, 2006] permettent de libérer le PA lorsque le polymère se dégrade. Des polymères sensibles au pH ont aussi été utilisés pour déclencher la libération du PA [Bhattacharya S. *et al.*, 2007].



Le poly(éthyl méthacrylate) (PEMA) et le poly(2-hydroxyéthyl méthacrylate) (PHEMA) sont des polymères non-biodégradables, leur association chimique forme un copolymère dibloc. Le PEMA étant hydrophobe et le PHEMA hydrophile, le PEMA constitue l'intérieur hydrophobe du colloïde. La solubilisation d'un PA hydrophobe dans le PEMA va le protéger lors du transport. En effet, le composite est résistant aux dilutions, au pH, à la température et n'est pas biodégradable, ce qui procure au PA une protection stable et durable. Par ailleurs, la diffusion du PA est ralentie de presque 70% par rapport à une diffusion dite libre hors des micelles de polymère [Bai Y. *et al.*, 2006].

## I.2. Les Isasomes : vecteurs lipidiques structurés

Nous nous sommes intéressés à une famille d'émulsions encore peu connues : les émulsions à base de lipides structurants. Après un bref rappel sur les émulsions, la nature et l'intérêt des émulsions structurées seront explicités. Enfin, leur utilisation en tant que vecteur pour la délivrance de PA sera commentée.

### I.2.a. Emulsions et phases « cristal liquide »

Une émulsion est un système comprenant au moins deux miscibles, dont l'un est dispersé dans l'autre sous forme de gouttelettes. On distingue la phase dispersée et la phase continue. Si la phase continue est une phase grasse, l'émulsion est une émulsion d'eau dans l'huile. Au contraire, c'est une émulsion d'huile dans l'eau si la phase continue est aqueuse. L'ajout d'un émulsifiant permet à la fois de stabiliser les émulsions dans le temps et d'abaisser la tension interfaciale afin de faciliter le phénomène de dispersion. Le tableau I.1. suivant montre que l'ajout d'un tensioactif permet de réduire considérablement l'énergie nécessaire pour créer des interfaces.

Domaine	Type	Energies (mJ/m <sup>2</sup> )
Surfaces	Eau/air	73
	Glycérol/air	50
	Huile/air	20 à 40
	Eau+tensioactifs/air	10 à 30
Interfaces	Eau/huile	50
	Eau+tensioactifs/air	0,1 à 10

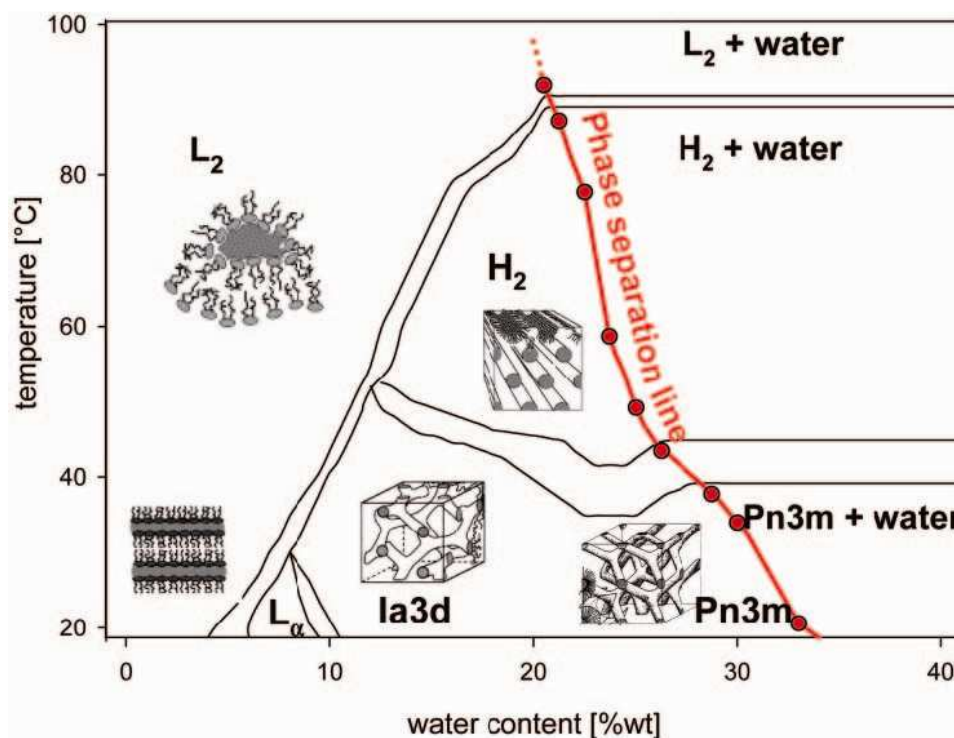
**Tableau I.1: Ordre de grandeur des énergies de surface et des énergies interfaciales répertoriées dans les techniques de l'ingénieur.**

Les émulsions sont utilisées dans divers secteurs industriels comme l'industrie cosmétique [de Clermont-Gallerande H. *et al.*, 2001], l'industrie agroalimentaire [Augustin M. A. & Hemar Y., 2009], ou encore l'industrie pharmaceutique pour l'encapsulation de PA [Sakulku U. *et al.*, 2009]. Ainsi, l'homme du métier comprendra aisément tous les enjeux qui existent derrière le développement et la caractérisation de nouvelles formulations d'émulsion. Ces dernières années, des phases de type



« cristal liquide » formées à partir de lipides auto-assemblés ont pu être émulsifiées [Larsson K., 1989 ; Gustafsson J. *et al.*, 1996 ; Gustafsson J. *et al.*, 1997 ; Larsson K., 2000]. Ces associations lipidiques rappellent celle existant dans les membranes biologiques [Larsson K., 1989]. Leur interaction avec d'autres molécules est encore mal connue et notamment leur position exacte dans les structures.

A partir d'un système binaire lipide amphiphile structurant/eau, il est possible de formuler des dispersions, de tailles submicroniques, ayant une structure interne modulable en fonction de la température de façon réversible [Larsson K., 2000; Koynova R. & Caffrey M., 2002 ; Kaasgard T. & Drummond C. J., 2006]. Par exemple, la monolinoléine (MLO) est un monoglycéride insaturé qui s'auto-assemble en présence d'eau donnant une phase cubique discontinue inverse ( $Pn\bar{3}m$ ), une phase hexagonale inverse ( $H_{II}$ ) ou une phase  $L_2$  en fonction de la température ou de la quantité d'eau solubilisée.



**Figure I.7. Diagramme de phase du système binaire MLO/eau. La ligne rouge représente la séparation de phase entre les régions avec et sans excès d'eau [de Campo L. *et al.*, 2004].**

Comme le montre la figure I.7., la MLO ne peut solubiliser qu'une certaine quantité maximale d'eau à une température donnée. Au-delà de cette valeur, deux phases vont coexister : la mésophase gonflée au maximum et l'eau en excès. Ce phénomène fait apparaître une ligne de séparation de phase, fonction de la température (ligne rouge sur la fig.1.7.). Cette situation permet de disperser la mésophase caractérisée par la ligne d'excès d'eau par sonication afin d'obtenir des émulsions nano-structurées. Pour stabiliser les gouttelettes d'émulsion, il est nécessaire d'ajouter un tensioactif tel que le polymère tribloc F127 ( $PEO_{98}$ - $PPO_{67}$ - $PEO_{98}$ ) dont les unités hydrophobes (PPO) s'adsorbent à la surface des gouttelettes d'émulsion. Les blocs hydrophiles (PEO) forment une couronne permettant une stabilisation stérique de la dispersion [Gustafsson J. *et al.*, 1996 ; Gustafsson J. *et al.*, 1997; de

Campo L. *et al.*, 2004 ; Yaghmur A. *et al.*, 2005]. Ces émulsions stables dont l'intérieur est auto-assemblé sont appelées « **Isasomes** » (*Isa pour Internally self assembled*).

L'ajout d'un composant supplémentaire dans ces formulations peut influencer les structures auto-assemblées [Borné J. *et al.*, 2000 ; Caboi F. *et al.*, 2001]. En effet, cet additif, de par sa structure, modifie la courbure interfaciale et entraîne éventuellement des transitions de phase pour une concentration suffisante [Seddon J. M. *et al.*, 1996 ; Caboi F. *et al.*, 2001 ; Caboi F. *et al.*, 1997 ; Shearman G. C. *et al.*, 2006].

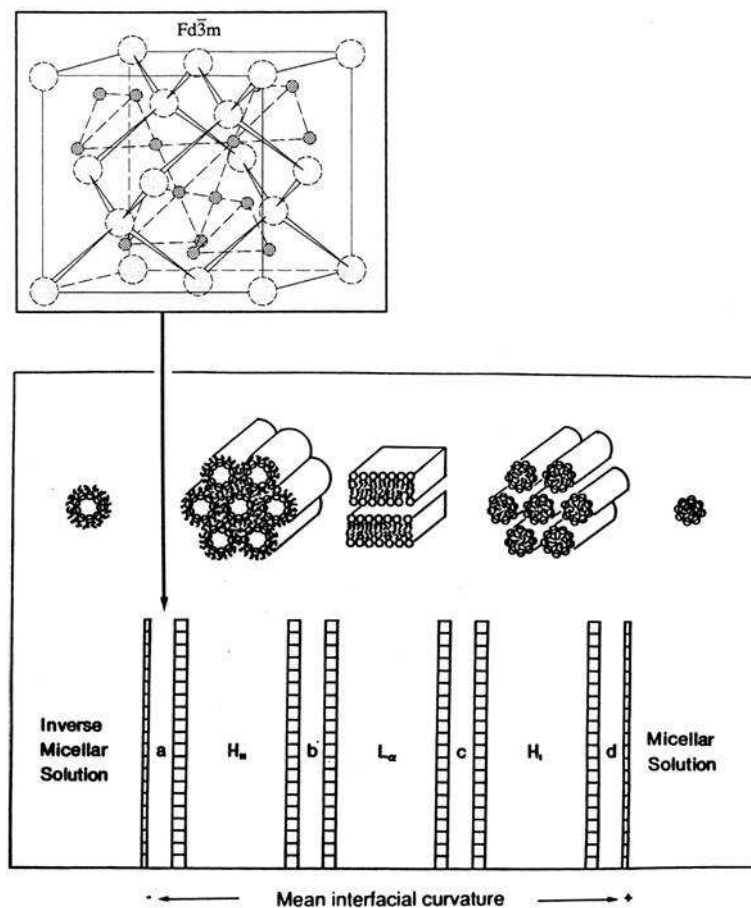


Figure I.8. Courbure interfaciale en fonction de la mésophase [Seddon J. M. *et al.*, 1996].

Le type de mésophase créé par un lipide structurant dans l'eau dépend de la courbure donnée à l'interface lipide/eau. Celle-ci dépend directement de la structure du lipide au travers de son paramètre d'empilement critique. Pour une courbure moyenne nulle, les interfaces sont localement lamellaires, ce qui induit des mésophases lamellaires ou cubiques bicontinues. Les courbures positives sont reliées à des phases avec une proportion majoritaire d'eau et donc à des agrégats micellaires dispersés dans l'eau. Dans notre cas, à l'intérieur des gouttes d'émulsion, l'eau est minoritaire et les courbures moyennes des interfaces négatives. En augmentant le volume hydrophobe des chaînes lipidiques (par exemple en rajoutant une huile), les courbures deviennent encore plus négatives et le système peut donner des phases hexagonale, micellaire cubique ou à l'extrême des micelles inverses (Figure I.8).

En incorporant par exemple du tétradécane ou du R-(+)-limonène, la nanostructure interne des émulsions a pu être modifiée et contrôlée en fonction de la température et de la concentration en additif à température fixe [Yaghmur A. *et al.*, 2005 ; Yaghmur *et al.*, 2006 ; Guillot S. *et al.*, 2006]. Toutes les structures qui coexistent avec un excès d'eau sont dispersables à température ambiante à condition de connaître la bonne formulation. Par exemple, une nouvelle phase micellaire cubique discontinue a pu être dispersée récemment, la phase  $Fd\bar{3}m$  [Yaghmur *et al.*, 2006].

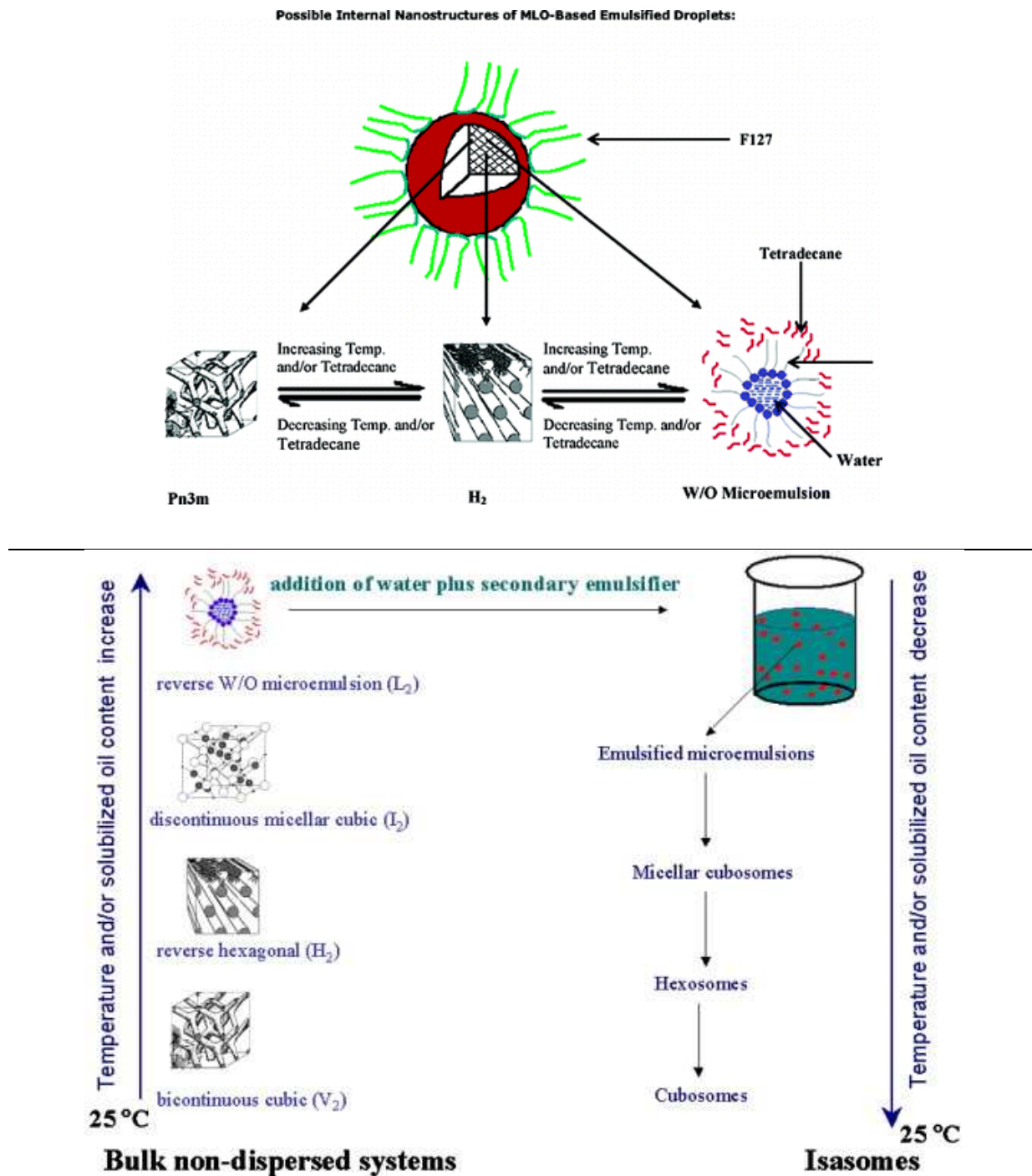
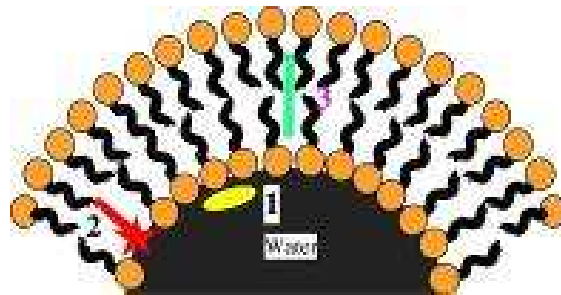


Figure I.9. Nanostructures possibles à l'intérieur des gouttelettes d'émulsion à base de MLO [Yaghmur A. *et al.*, 2005 ; Yaghmur A. & Glatter O., 2009].

Une particularité de ces émulsions est de pouvoir solubiliser une large gamme de molécules ayant diverses polarités. Ceci est dû au réseau de nano-canaux aqueux contenu dans la matrice hydrophobe qui forme la structure tridimensionnelle des gouttelettes (cf figure I.9.) : ces canaux peuvent représenter jusqu'à 30% en masse de la particule [Salonen A. *et al.*, 2007].

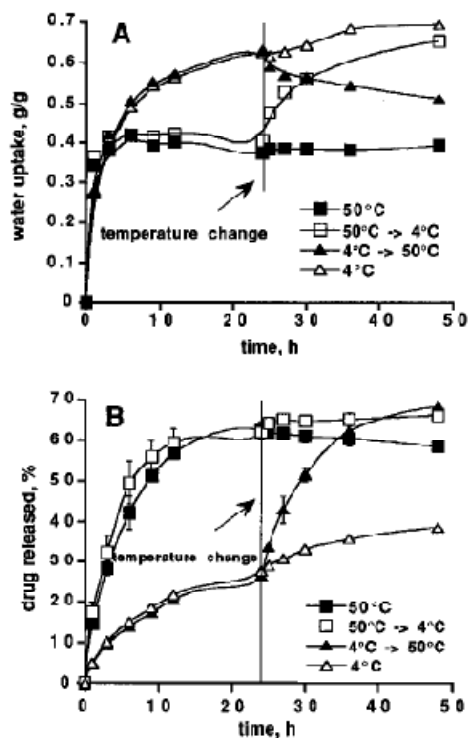


**Figure I.10. Localisation possible des additifs dans la gouttelette selon leur polarité (1 est hydrophile, 2 est amphiphile, 3 est lipophile) [Leser *et al.*, 2003].**

De par leur stabilité dans le temps, leur biocompatibilité, leur très grande surface ( $\sim 400 \text{ m}^2/\text{g}$ ) et leur capacité de stockage importante, ces dispersions s'avèrent être d'excellents candidats pour le transport et la protection de molécules fonctionnelles hydrophiles, lipophiles ou même amphiphiles [Drummond C. J. & Fong C., 2000; Caboi F. *et al.*, 2001 ; Caboi F. *et al.*, 2002 ; Sagalowicz L. *et al.*, 2006; Amar-Yuli I. *et al.*, 2009].

### ***1.2.b. Les systèmes non émulsifiés et le contrôle de la diffusion de PA***

Chang et Bodmeier furent les premiers à s'y intéresser en 1997 [Chang C.-M. & Bodmeier R., 1997]. A partir d'un système binaire monoglycéride insaturé/eau, ils ont élaboré des matrices lipidiques pour l'étude de la délivrance de molécules de PA (Myverol®). Ces matrices sont des systèmes non émulsifiés dits *bulks*. La chlorphéniramine maléate et la pseudoéphédrine HCl ont été choisies comme molécules modèles hydrophiles. Ils ont observé que la diffusion suit une loi linéaire en fonction de la racine carrée du temps (loi de Fick) pendant les douze premières heures, confirmant ainsi que la délivrance de PA est prédominée par la diffusion. La diffusion plus lente de la chlorphéniramine maléate a été attribuée aux interactions de cette molécule, légèrement amphiphile, avec la phase cubique de la matrice. Ces phases « cristal liquide » lyotropes sont sensibles au changement de température, le contrôle de la diffusion molécule hôte modèle en fonction de la température a donc été exploré (figure I.11.).



**Figure I.11. Influence de la température sur la quantité d'eau solubilisée dans la matrice (A) et la diffusion du propranolol hydrochloride (B) [Chang C.-M. & Bodmeier R., 1997].**

Lors d'un changement de température de 4 à 50°C, la molécule diffuse plus rapidement. Ceci est la conséquence d'une part de la solubilité accrue de la molécule lorsque la température augmente et d'autre part de l'expulsion subite de l'eau et du PA hors de la matrice (phase lamellaire à 4°C et phase cubique à 50°C) comme le montre la figure I.11-A. A l'inverse, la matrice se « remplit » d'eau lorsque la température diminue ce qui n'a pas d'influence sur la diffusion de la molécule de PA hors du système. Dans une seconde étude, Chang et Bodmeier ont fait varier le pH et montrent que ce paramètre peut aussi influencer la diffusion des molécules [Chang C.-M. & Bodmeier R., 1997]. En conclusion, le déclenchement de la diffusion des molécules de PA hors de matrices structurées peut être contrôlé par un changement structural de ces dernières à l'aide de deux paramètres : la température et le pH.

### ***1.2.c. Les Isasomes et le contrôle de la diffusion de PA***

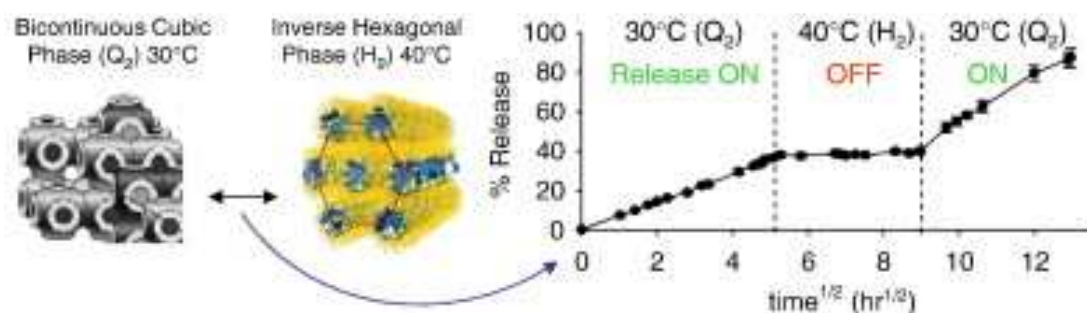
De nombreuses études ont déjà été réalisées sur les changements structuraux à l'intérieur des Isasomes suite à l'ajout de diverses molécules (huile, molécule active, tensioactif) suivant leur taille, leur structure, leur polarité, leur concentration [Yaghmur A. *et al.*, 2006 ; Uyama M. *et al.*, 2009 ; Amar-Yuli I. *et al.*, 2009 ; Leser *et al.*, 2003]. Les phases dispersées cubiques et hexagonales aussi nommées cubosomes et hexosomes sont les phases qui ont été le plus largement explorées, la littérature en témoigne [Gustafsson J. *et al.*, 1996; Gustafsson J. *et al.*, 1997; Nankano M. *et al.*, 2002; Spicer P. T. *et al.*, 2002; Boyd B. J., 2003; Yaghmur A. *et al.*, 2005; Guillot S. *et al.*, 2006; Yaghmur A. *et al.*, 2006; Rosa M. *et al.*, 2006; Salonen A. *et al.*, 2007; Boyd B. *et al.*, 2007; Popescu G. *et al.*, 2007].

En revanche, peu de travaux ont été effectués sur l'étude de la délivrance de molécules actives à l'aide de ces vecteurs structurés. En 2005, Clogston *et al.* ont agi directement sur la molécule de PA, le tryptophane (molécule hydrophile), dans le but de changer la cinétique de délivrance. L'ajout de groupements alkyls aux molécules de tryptophane les rendant moins hydrophiles, leur localisation au sein des gouttelettes a été modifiée. Les molécules ont ainsi tendance à se loger dans les régions apolaires des nano-structures, ralentissant leur diffusion vers l'extérieur des cubosomes. Un coefficient de partition  $P$  a été défini:

$$P = \frac{[X_{\text{bicouche lipidique}}]}{[X_{\text{aqueux}}]}$$

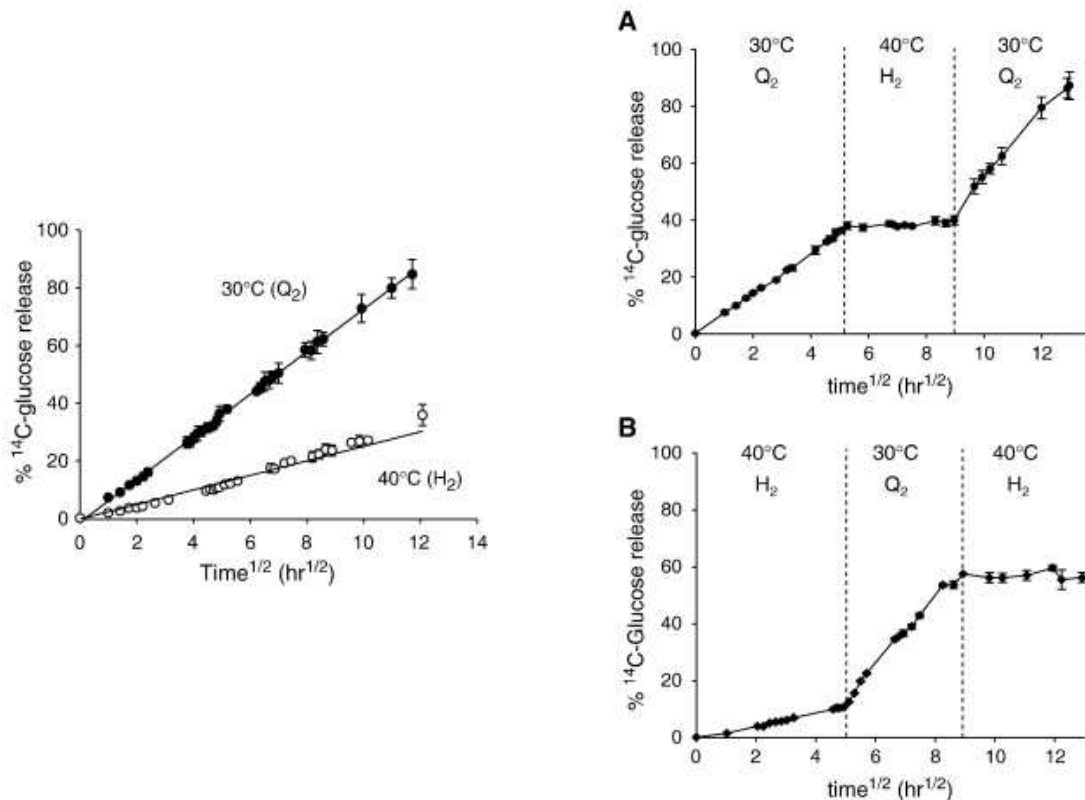
où  $[X_{\text{bicouche lipidique}}]$  représente la concentration de PA dans la région apolaire de la phase cubique, et  $[X_{\text{aqueux}}]$  la concentration de PA dans la région polaire. Plus la longueur de la chaîne alkyl augmente, plus  $P$  est grand et plus le temps de diffusion augmente. Par conséquent, une modification de la diffusion est possible en ajustant la longueur de la chaîne [Clogston J. *et al.*, 2005]. D'autres études sur les hexosomes et les cubosomes en tant que vecteurs pour la délivrance contrôlée ont été faites. Angius R. *et al.* ont utilisé des molécules spécifiques pour le ciblage de certains types de récepteurs cellulaires [Angius R. *et al.*, 2006].

Boyd *et al.* ont imaginé des systèmes de délivrance de type on/off d'émulsion nanostructurées présentant une température de transition proche de 40°C, température du corps humain. Ce système se sert des transition de phase pour déclencher la diffusion de molécule hôte [Boyd B. J. *et al.*, 2006; Fong W. K. *et al.*, 2009; Lee K. W. Y. *et al.*, 2009].



**Figure I.12. Système de délivrance on/off activé par variation de structure induit par changement de température [Fong W. K. *et al.*, 2009].**

Ce type de contrôle de la délivrance est particulièrement intéressant pour des applications pharmaceutiques des émulsions nano-structurées.



**Figure I.13. Variations avec la température des profils de délivrance statique (à gauche) et dynamique (à droite) du glucose à l'extérieur des émulsions structurées (Phytantriol + 3% Vitamine E) cubique bicontinue (Q<sub>2</sub>) et hexagonale inverse (H<sub>2</sub>) [Fong W. K. *et al.*, 2009].**

La délivrance du PA (le glucose dans ce cas) est dominée par la diffusion. Cette diffusion est déclenchée par la température (cf. figure I.13. à gauche). Le système de type « commutateur » est le suivant : pendant la phase Q<sub>2</sub>, le système est ouvert, et pendant la phase H<sub>2</sub>, la diffusion est arrêtée (cf. figure I.13. à droite). Cette étude est une preuve qu'une diffusion de type on/off est réalisable à partir d'**Isosomes**. Elle est à comparer aux résultats de Chang & Bodmeier [Chang C.-M. & Bodmeier R., 1997], sur la délivrance de PA intégré dans des bulks de phases lamellaires et cubiques de lipides structurants (cf. § I.2.b.). En effet, même si dans le cas des émulsions submicroniques structurées la surface spécifique de diffusion est beaucoup plus importante que dans les bulks et le tensioactif constitue une barrière à la diffusion, la phase cubique Q<sub>2</sub> ( = Pn $\bar{3}m$  ) semble être la phase propice à une diffusion plus rapide du PA.

### I. 3. Bilan du chapitre I

L'étude bibliographique menée dans ce chapitre a permis de situer la problématique qui est la conception de matériaux originaux répondant à un stimulus externe par la délivrance de PA. Les nombreux articles référencés nous informent sur la nécessité de nouveauté et de développement dans ce domaine. C'est dans cet esprit que cette thèse a été menée. Les chapitres qui suivent décriront la démarche utilisée pour la conception de nos matériaux, et la caractérisation de la délivrance de PA.





# Chapitre II

## Synthèse et caractérisation de nanoparticules d'oxyde de fer

---

*« On fait la science avec des faits, comme on fait une maison avec des pierres : mais une accumulation de faits n'est pas plus une science qu'un tas de pierres n'est une maison »*

*H. Poincaré*

---

<b>Chapitre II</b>	
<b>Synthèse et caractérisation des nanoparticules d'oxyde de fer.....</b>	<b>33</b>
<b>II.1. Généralités sur les oxydes de fer .....</b>	<b>35</b>
<b>II.1.1. Caractéristiques structurales.....</b>	<b>35</b>
<b>II.1.2. Ferrofluide et stabilisation colloïdale.....</b>	<b>36</b>
<b>II.1.3. Généralités sur la synthèse de nanoparticules d'oxyde de fer.....</b>	<b>37</b>
<i>II.1.3.a. Synthèse par coprécipitation en milieu aqueux.....</i>	<i>37</i>
<i>II.1.3.b. Synthèse en milieu non aqueux type micelle inverse.....</i>	<i>38</i>
<b>II.2. Synthèse des nanoparticules d'oxyde de fer par voie chimique et préparation des ferrofluides.....</b>	<b>39</b>
<b>II.2.1. Synthèse par coprécipitation de sels de fer.....</b>	<b>39</b>
<b>II.2.2. Synthèse par réduction d'acétylacétonate de fer type micelle inverse.....</b>	<b>41</b>
<b>II.3. Résultats des synthèses de nanoparticules d'oxyde de fer.....</b>	<b>42</b>
<b>II.3.1. Taille des nanoparticules.....</b>	<b>42</b>
<i>II.3.1.a. Synthèse par coprécipitation simple.....</i>	<i>43</i>
<i>II.3.1.b. Synthèse par coprécipitation assistée par les ultrasons.....</i>	<i>44</i>
<i>II.3.1.c. Synthèse type micelle inverse par réduction d'acétylacétonate de fer.....</i>	<i>45</i>
<b>II.3.2. Caractérisation structurale des nanoparticules d'oxyde de fer....</b>	<b>48</b>
<i>II.3.2.a. Synthèse par coprécipitation simple.....</i>	<i>48</i>
<i>II.3.2.b. Synthèse par coprécipitation assistée des ultrasons.....</i>	<i>51</i>
<i>II.3.2.c. Synthèse type micelle inverse par réduction d'acétylacétonate de fer.....</i>	<i>53</i>
<b>II.3.3. Propriétés magnétiques des nanoparticules d'oxyde de fer.....</b>	<b>54</b>
<b>II.4. Conclusion sur les synthèses des nanoparticules d'oxyde de fer.....</b>	<b>56</b>

---

## II.1. Généralités sur les oxydes de fer

Les nanoparticules d'oxyde de fer sont classées en deux catégories. Elles sont appelées SPION (*SuperParamagnetic Iron Oxides Nanoparticles*) si les particules individuelles ont un diamètre supérieur à 50 nm, et USPION (*Ultrasmall SuperParamagnetic Iron Oxides Nanoparticles*) pour des tailles inférieures à 50 nm. Dans ce chapitre, nous décrirons la synthèse et la caractérisation des matériaux. Les oxydes de fer sont les ferrites les plus connus historiquement. Les types d'oxyde de fer sont nombreux, nous expliciterons ici les principales caractéristiques physico-chimiques de la magnétite et de la maghémite.

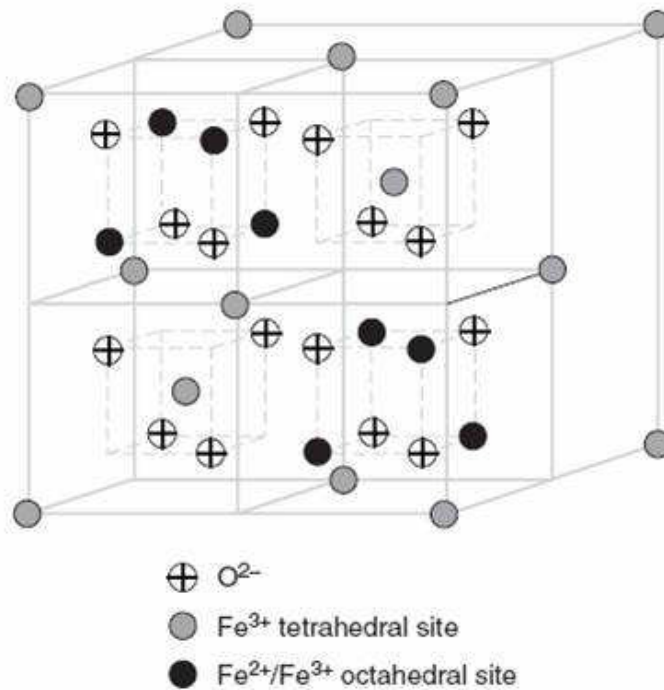
### II.1.1. Caractéristiques structurales

La détermination structurale des particules d'oxyde de fer est rendue difficile par la formation de nombreuses phases cristallines composées d'ions métalliques à différents degrés d'oxydation. En effet, six phases d'oxydes de fer peuvent être rencontrées dont les plus courantes sont la magnétite ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ), la maghémite ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ), l'hématite ( $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ) et la wüstite ( $\text{FeO}$ ). La plupart de ces phases adoptent une structure de type spinelle<sup>1</sup>. Nous nous intéressons ici à la magnétite et la maghémite.

La structure de la magnétite  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  a été établie dès 1915 à l'aide de la diffraction des rayons X par Bragg et par Nishikawa [Bragg W. H., 1915 ; Nishikawa S., 1915]. La maille élémentaire de la magnétite est un arrangement cubique face centré (cfc) de 32 anions  $\text{O}^{2-}$  comportant par ailleurs 64 interstices de symétrie tétraédrique et 32 interstices de symétrie octaédrique. L'état de l'oxyde de fer est différent des autres car il contient à la fois des atomes de fer divalents ( $\text{Fe}^{2+}$ ) et trivalents ( $\text{Fe}^{3+}$ ). Ces atomes se trouvent dans les sites tétraédriques et octaédriques mais seulement 1/8 des sites tétraédriques et la moitié des sites octaédriques sont occupés. Le spinelle de la magnétite de formule  $[\text{Fe}^{3+}]_{\text{T}}[\text{Fe}^{2+}\text{Fe}^{3+}]_{\text{O}}\text{O}_4$ , est dite inverse [Hill *et al.*, 1979] car les ions trivalents se répartissent entre les sites tétraédriques et octaédriques tandis que les ions divalents se trouvent uniquement en sites tétraédriques comme schématisé sur la figure 2.1. Son groupe d'espace cubique est  $Fd\bar{3}m$  (n°227), et son paramètre de maille est 8,3970 Å. La magnétite est souvent non-stœchiométrique, dans ce cas le cation déficient est le  $\text{Fe}^{3+}$ . Quand la magnétite est stœchiométrique le rapport  $\text{Fe}^{2+}$  sur  $\text{Fe}^{3+}$  est de 0,5.

---

<sup>1</sup> Une structure de type spinelle est  $(X^{2+})(Y^{3+})_2(O^{2-})_4$ .



**Figure II.1. Structure spinelle inverse de la magnétite, système cfc d'ions oxygène [Gossuin Y. *et al.*, 2009].**

Dans la maghémite  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ , le fer se trouve totalement dans l'état trivalent d'oxydation ce qui se traduit par l'apparition de lacunes cationiques en positions octaédriques. Comme pour la magnétite, la maghémite est un spinelle inverse qui cristallise dans un système cfc d'ions oxygène. Il a été établi que la formation d'un spinelle a pour origine les transferts électroniques entre les ions  $\text{Fe}^{2+}$  et  $\text{Fe}^{3+}$  de l'oxyde de fer. Cette même mobilité électronique est aussi à l'origine de la transformation de la magnétite en maghémite [Jolivet J. P. & Tronc E., 1988; Jolivet J. P. *et al.*, 2004]. La structure spinelle de la maghémite s'écrit  $[\text{Fe}^{3+}]_{\text{T}}[\text{Fe}^{3+}_{5/3}\text{Fe}^{2+}_{1/3}]_{\text{O}}\text{O}_4$ , c'est une structure spinelle lacunaire [Tronc E. *et al.*, 1982].

Le paramètre de maille de la maghémite diffère légèrement de celui de la magnétite : 8,3515 Å au lieu de 8,3970 Å.

### II.1.2. Ferrofluide et stabilisation colloïdale

En vue d'applications biomédicales, la mise en suspension des oxydes de fer et le contrôle de la stabilité des suspensions sont des enjeux majeurs. Le paragraphe suivant explicite les différents paramètres à prendre en compte pour la préparation d'un ferrofluide stable dans le temps. Un ferrofluide est une dispersion colloïdale de particules magnétiques dans un solvant généralement aqueux. Afin de rendre la suspension homogène et stable, des interactions répulsives entre les nanoparticules sont nécessaires pour éviter leur agglomération et/ou une séparation complète du solvant.

La stabilisation des dispersions diluées de particules chargées peut être décrite par la théorie DLVO (Derjaguin, Landau, Verwey, Overbeek). Elle donne la hauteur de la barrière énergétique pour éviter les contacts entre particules, c'est la stabilité cinétique. La stabilité de la suspension résulte d'un

équilibre entre les forces attractives et répulsives entre les particules. Les forces qui vont à l'encontre de la stabilité sont les forces attractives de type Van der Waals, et les forces d'interaction magnétique. Les énergies permettant la stabilité des ferrofluides sont l'énergie d'agitation thermique Brownienne (de l'ordre de  $k_B T$ ) et les énergies répulsives entre les particules. Les énergies de répulsion permettant de moduler la barrière de potentiel prévenant l'agglomération, ne dépendent que des molécules choisies pour stabiliser la suspension. La stabilité de la suspension a une contribution électrostatique (stabilisation électrostatique) ou bien stérique par adsorption de macromolécules (stabilisation stérique) à la surface des particules magnétiques, créant ainsi un volume exclu. Les paramètres à considérer pour obtenir une suspension électrostatique stable sont le pH de la solution, la nature et la concentration des électrolytes (force ionique) [Jolivet J. P., 1994 ; Vayssières L., 2005] tandis que les facteurs influençant la stabilité stérique sont multiples comme la force d'interaction surface-macromolécule, le taux de couverture de la surface des particules, la taille des particules adsorbées, etc. [Jolivet J. P., 1994 ; Jolivet J. P. *et al.*, 2004].

Avant de pouvoir obtenir un ferrofluide stable, il faut synthétiser les nanoparticules d'oxyde de fer d'une certaine manière. Au fil des années, divers modes de synthèse ont été mis au point, les plus usuels sont présentés ci-après.

### **II.1.3. Généralités sur la synthèse de nanoparticules d'oxyde de fer**

La synthèse des nanoparticules d'oxyde de fer a été largement étudiée. Il existe des méthodes de synthèse physiques et chimiques, cependant la voie chimique est la plus courante car elle permet un meilleur contrôle de la taille à l'échelle nanométrique [Gupta A.K. & Gupta M., 2005]. Dans le cadre de cette thèse, nous nous sommes intéressés à deux méthodes de synthèse par voie chimique : la synthèse par co-précipitation et la synthèse par réduction d'acétylacétonate de fer.

De manière générale, la synthèse par voie chimique peut se scinder en une phase de nucléation et une phase de croissance. Pour obtenir la taille désirée de nanoparticules il faut pouvoir contrôler et/ou limiter ces deux étapes.

#### ***II.1.3.a. Synthèse par coprécipitation en milieu aqueux***

La synthèse de la magnétite par coprécipitation d'ions ferriques et ferreux par une base forte est connue depuis 1852 [Le Fort, 1852]. La réaction chimique est la suivante:



La phase spinelle est formée quasi instantanément à température ambiante. Le contrôle de la morphologie et de la polydispersité des particules d'oxyde de fer a été un enjeu scientifique dès les années 1980 [Sugimoto T. & Matijevic E., 1980 ; Ozaki M. & Matijevic E., 1985 ; Massart R., 1981 ; Matijevic E., 1981 et 1986 ; Jolivet J. P., 1994]. Il a résulté de ces travaux l'importance des paramètres comme la température, le temps de chauffage, la force ionique, le pH.

La force ionique et le pH du mélange réactionnel sont les facteurs principaux pour le contrôle de la polydispersité et de la taille des oxydes de fer dans la synthèse aqueuse par coprécipitation. De façon

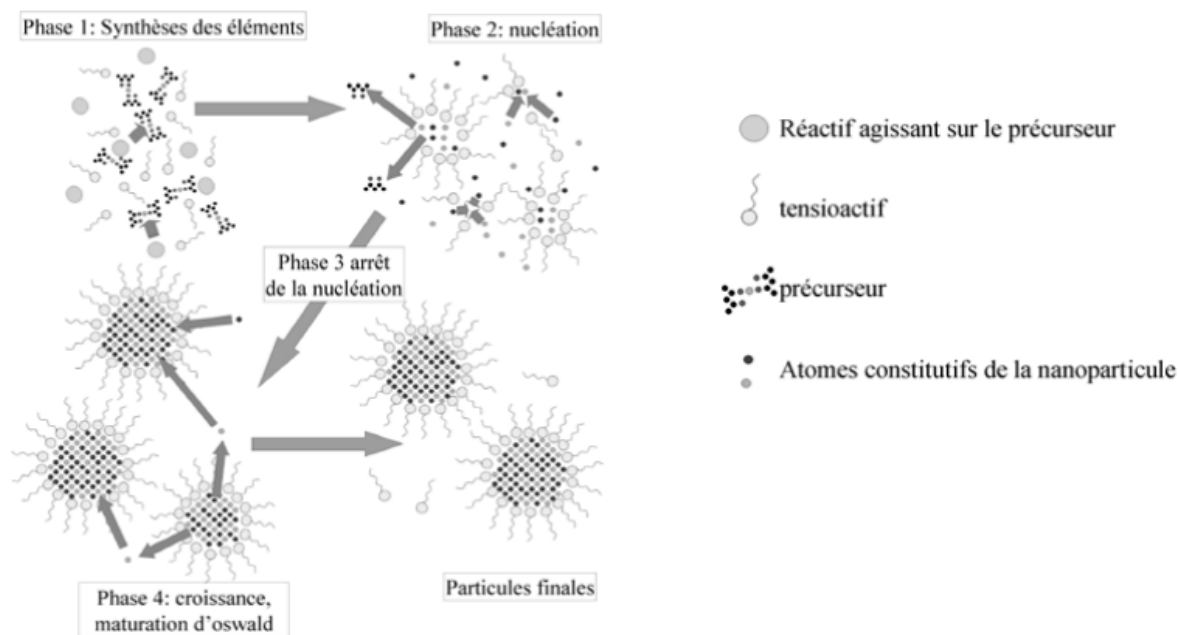
générale, plus le pH et la force ionique sont élevés, plus les particules sont petites [Vayssières L., 2009]. Vayssières *et al.* ont également observé l'existence d'une valeur de pH critique, à une force ionique fixée, au-dessus de laquelle la taille des particules n'évolue plus au cours du vieillissement. Au contraire, si le pH, au cours de la coprécipitation, est inférieur à ce pH critique, les particules ont tendance à grossir après leur formation (mûrissement d'Ostwald) [Vayssières L. *et al.*, 1998]. De plus, la nature des anions présents en solution issus de sels utilisés peut aussi avoir une importance. Les travaux de Matijevic ont permis d'observer que le pouvoir complexant de l'anion joue un rôle majeur dans le contrôle de la morphologie des particules d'oxyde. Par exemple, la présence d'anions chlorure n'oriente pas la croissance des nanoparticules d'oxyde, leur croissance reste donc isotrope car ces anions ne sont pas suffisamment complexants [Matijevic E., 1981 et 1986].

La synthèse par coprécipitation présente l'avantage de travailler en milieu aqueux ce qui est un point primordial lorsque l'on envisage des applications biomédicales. La stabilisation des oxydes de fer sous forme de suspension colloïdale aqueuse est rendue possible par peptisation acide ou basique, sans l'intervention de tensioactif organique [Massart R., 1981 ; Berger P. *et al.*, 1999].

### ***II.1.3.b. Synthèse en milieu non aqueux type micelle inverse***

Les oxydes de fer peuvent être obtenus par d'autres méthodes chimiques au cours desquelles les nanoparticules sont aussi fonctionnalisées. Dans le paragraphe suivant est détaillée une synthèse plus sophistiquée que la synthèse par coprécipitation mais aussi plus contraignante car elle a lieu en milieu non aqueux.

Cette synthèse en milieu non aqueux permet de produire des nanoparticules d'oxydes de fer hydrophobes stabilisées de manière stérique par des molécules de tensioactifs (e.g. acide oléique, CTAB). Lorsque la synthèse se fait dans un solvant apolaire, les molécules de tensioactifs s'organisent sous forme de micelles inverses (eau dans l'huile) à l'intérieur la nucléation-croissance interviendra. Dans ce type de synthèse qui comprend la synthèse par décomposition thermique et la synthèse par réduction de précurseurs, différents paramètres nous permettent de contrôler la taille, la polydispersité des particules mais aussi la forme des particules [Sun S. *et al.*, 2004 ; Chaudret B., 2005 ; Dumestre F. *et al.*, 2004]. Dans la synthèse que nous utilisons, la taille des nanoparticules est influencée par la nature du précurseur métallique, la température et le temps de la réaction. En règle générale, la température de la réaction est fixée par la température d'ébullition du solvant choisi [Sun S. *et al.*, 2004]. Ce mode de synthèse se décompose en plusieurs étapes représentées dans la figure II.2.



**Figure II.2. Différentes phases de la synthèse chimique par réduction de précurseurs [Fleurier R., 2006].**

Dans un premier temps, les ions métalliques qui vont former les atomes métalliques constitutifs de la nanoparticule sont mis en présence des réactifs. Durant cette phase, la température contrôle la réaction de réduction des précurseurs. A partir des atomes métalliques formés, les germes nécessaires à la croissance des particules sont produits, c'est la nucléation (ou germination). Lors de la nucléation, l'ajout de molécules de tensioactifs à la solution peut limiter la vitesse de croissance. L'étape suivante est l'arrêt de la germination dû à la diminution de la quantité d'atomes métalliques présents en solution (consommation des atomes). Enfin, une fois la nucléation stoppée, la croissance a lieu, gouvernée par le phénomène de mûrissement d'Ostwald.

## **II.2. Synthèse des nanoparticules d'oxyde de fer par voie chimique et préparation des ferrofluides**

Nous avons synthétisé des nanoparticules d'oxyde de fer par voie chimique selon trois méthodes : deux synthèses par coprécipitation et une synthèse par réduction d'un acétylacétonate de fer.

### **II.2.1. Synthèse par coprécipitation de sels de fer**

#### **Protocole expérimental de la synthèse par coprécipitation**

Le mode opératoire de cette synthèse suit de près la méthode mise au point par Massart [Massart R., 1981]. Il comprend une étape de synthèse suivie du lavage des nanoparticules. Pour ce faire, les sels de fer sont introduits dans un ballon bicol en proportion stœchiométrique tel que

$\frac{[Fe^{II}]}{[Fe^{III}]} = \frac{0,15 M}{0,30 M} = 0,5$  dans 50mL d'eau déionisée ultrapure (18M $\Omega$ ). La solution de réactifs est

dégazée pendant 5 à 10 minutes à l'argon, et les sels de fer sont coprécipités à pH entre 10 et 12 par un excès d'ammoniaque (NH<sub>4</sub>OH, 25%) à température ambiante, et sous forte agitation. La solution est alors chauffée à 90°C pendant 20 minutes. Une fois que la solution colloïdale de nanoparticules a refroidi jusqu'à température ambiante, les particules sont récupérées par décantation magnétique à l'aide d'un aimant en néodyme. L'élimination des ions ammonium adsorbés se fait par des lavages successifs à l'acétone puis à l'eau déionisée. Ces nanoparticules sont ensuite conservées dans l'eau déionisée dans le but d'être peptisées.

### **Protocole expérimental de la synthèse par coprécipitation assistée par les ultrasons**

Une variante de la synthèse par coprécipitation est la synthèse assistée par les ultrasons [Kim E. H., 2005]. Son intérêt est qu'elle ne nécessite pas de conditions particulières de température et d'atmosphère. Cependant, quelques travaux ont rapporté que le temps d'ultrasons influence la cristallinité des nanoparticules obtenues et par conséquent leurs propriétés magnétiques [Kim E. H., 2005 ; Drogenik M., 2006]. Cette synthèse repose sur le phénomène de cavitation acoustique à savoir la formation, la croissance et l'implosion de bulles dans un liquide [Fitzgerald M. E. *et al.*, 1956]. A l'intérieur de ces bulles, des conditions de haute température et haute pression sont créées [Gedanken A., 2004]. Par la suite, nous avons voulu comparer cette synthèse à la synthèse par coprécipitation conventionnelle.

Comme précédemment, les ions ferriques et ferreux sont ajoutés en proportion stœchiométrique à 10 mL d'eau déionisée dans un pilulier de 30 mL. Une sonde à ultrasons en titane grande puissance et de fréquence 20 kHz est plongée dans la solution. La puissance de la sonde est réglée à 30-35% de sa puissance maximale (500 Watt) par intermittences d'une seconde. La solution contenant le mélange initial est soumise aux ultrasons pendant 1 minute avant d'ajouter l'ammoniaque en excès qui sert à coprécipiter les sels de fer. Un précipité noir de nanoparticules d'oxyde de fer se forme immédiatement. Le floculat de nanoparticules est soumis aux ultrasons pendant différents temps allant de 10 minutes à 3 heures. Des échantillons du précipité sont prélevés dans le but d'être analysés à 10 minutes, 30 minutes, 1 heure, 2 heures et 3 heures. Les nanoparticules, récupérées par décantation magnétique, sont lavées plusieurs fois pour se débarrasser des ions ammoniums adsorbés à leur surface.

Les floculats obtenus sont conservés pour être par la suite mis en suspension colloïdale.

### **Préparation des ferrofluides : Peptisation des nanoparticules d'oxyde de fer**

Trois types de ferrofluides ont été réalisés à partir des particules obtenues par coprécipitation dans cette étude : un ferrofluide acide dont le contre-ion est non floculant comme les ions nitrates (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) [Mornet S., 2001], un ferrofluide basique ayant pour contre-ions les cations de



tétraméthylammonium [Berger P. *et al.*, 1999] et un ferrofluide citraté anionique dont les contre-ions sont des citrates [Bee A. *et al.*, 1995 ; Toprak M. S. *et al.*, 2007].

- **Ferrofluide acide cationique** : L'oxyde de fer floculé est traité par l'acide nitrique HNO<sub>3</sub> à la concentration de 2 mol/L. La solution est agitée et décantée magnétiquement. Le précipité récupéré est lavé à l'acétone afin d'éliminer l'excès d'acide. Un volume de 150 mL d'eau déionisée est ajouté aux nanoparticules pour les peptiser par les ions nitrates. La solution est placée dans un bain à ultrasons pendant 15 minutes afin de bien disperser les agrégats qui se seraient formés. Ces NPs seront utilisées pour la modification de surface dans le chapitre IV.
- **Ferrofluide basique anionique** : Au floculat de nanoparticules synthétisé en milieu aqueux, une solution molaire d'hydroxyde de tétraméthylammonium N(CH<sub>3</sub>)<sub>4</sub>OH est ajoutée. Les nanoparticules sont dans un premier temps récupérées par décantation magnétique puis lavées à l'acétone pour éliminer l'excès d'ions. Les particules sont redispersées à l'aide d'un bain à ultrasons dans la quantité d'eau voulue. Ce ferrofluide sera utilisé lors d'une étude de résonance paramagnétique électronique.
- **Ferrofluide citraté anionique** : Le mélange biphasique de nanoparticules magnétiques et d'eau est fortement agité à 90°C pendant 1 heure en présence de citrate de trisodium (Na<sub>3</sub>Cit) en excès dont le pH est compris entre 7 et 9. Cette solution est soumise aux ultrasons 1 heure de plus, et les particules sont récupérées à l'aide d'un aimant puissant en néodyme. Le floculat est lavé à l'acétone et redispersé dans une certaine quantité d'eau à l'aide d'ultrasons pendant 30 minutes. La suspension obtenue a un pH compris entre 7 et 9. Le Na<sub>3</sub>Cit permet d'avoir des suspensions stables sur une large gamme de pH (4 < pH < 10) puisque la molécule de citrate possède trois fonctions carboxyliques dont les pK<sub>a</sub> à 18°C sont 3,08, 4,74 et 5,4 complètement déprotonées à pH neutre. Le citrate s'adsorbe sur les nanoparticules par complexation des atomes de fer superficiel [Dubois E. *et al.*, 1999]. L'hydrogel magnétique physique sera formé en utilisant ce ferrofluide citraté.

Chacun des ferrofluides préparé est dialysé à l'aide d'un boudin de dialyse en cellulose régénérée Spectrapor 6 avec une taille de pores de 50 kDa pendant 1 à 2 jours dans de l'eau déionisée au pH approprié. Cette eau de dialyse est changée toutes les 4 heures.

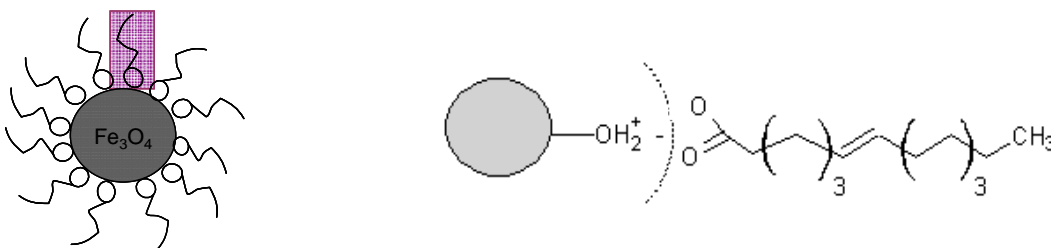
### II.2.2. Synthèse type micelle inverse par réduction d'acétylacétonate de fer

La synthèse utilisée dans le cas présent comprend quatre étapes.

- L'étape n°1 consiste à mélanger, dans un ballon tricol équipé d'un reflux, 2 mmol de précurseur d'acétylacétonate de fer(III), 10 mmol de réducteur 1,2-hexadécane-1,2-diol dans 30 mL de solvant (éther d'octyl, de phényle, ou de benzyle). Cette solution est dégazée pendant 20 minutes à l'argon sous agitation constante.

- Dans l'étape n°2, toujours sous atmosphère inerte, la température est augmentée progressivement (5°C/min) jusqu'à 100°C. A ce stade, 6 mmol d'acide oléique sont incorporés à l'aide d'une seringue et le mélange est laissé à cette température pendant 10 minutes.
- A la troisième étape, l'augmentation de température continue jusqu'à la température d'ébullition du solvant (5°C/min). La réaction est laissée à cette température pendant 20 minutes.
- Après avoir laissée la suspension recouvrer la température ambiante, les nanoparticules sont récupérées pour être purifiées. Pour ce faire, 40 mL d'éthanol absolu est versé dans le floculat et ce mélange est centrifugé à 6000 tours par minute pendant 15 minutes. Le surnageant est jeté tandis que le précipité noir est redispersé dans une solution d'hexane contenant 5 mL d'éthanol. On centrifuge une nouvelle fois 15 minutes à 6000 tr/min, cette fois le surnageant est récupéré. Enfin, une dernière centrifugation est réalisée en ajoutant 40 mL d'éthanol à la suspension. Le précipité noir est alors redispersé dans l'hexane à l'aide d'un bain à ultrasons.

Les particules obtenues sont enrobées de molécules d'acide oléique comme sur le schéma de la figure II.3 ci-dessous :



**Figure II.3. Schéma d'une nanoparticule d'oxyde de fer entourée d'acide oléique (à gauche) et de l'interaction possible entre l'acide oléique et cette nanoparticule (à droite).**

Du fait que l'acide oléique est un ligand tensioactif, il contribuera à la stabilisation colloïdale dans l'hexane, le solvant apolaire utilisé.

## II.3. Résultats des synthèses de nanoparticules d'oxyde de fer

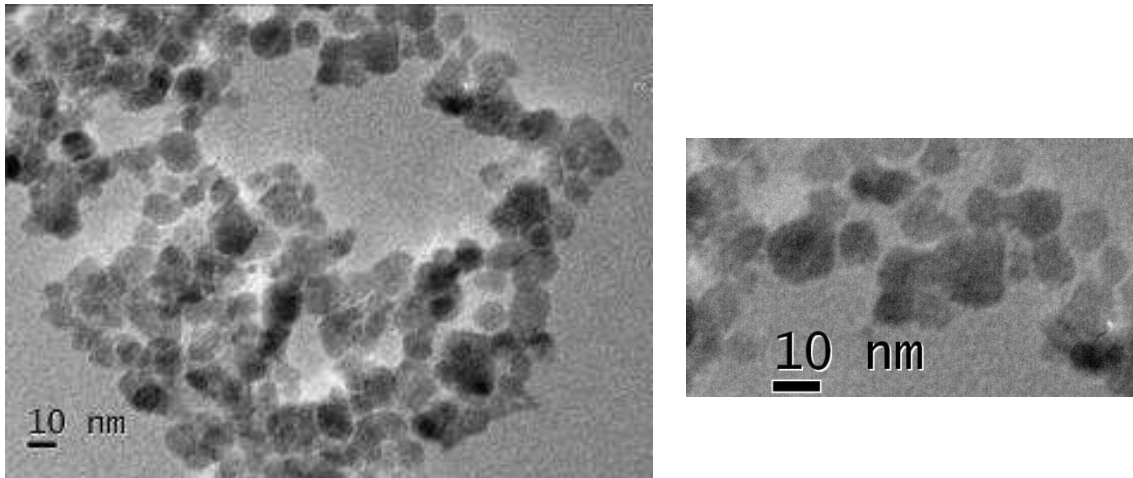
### II.3.1. Taille des nanoparticules

La taille des particules d'oxyde de fer est une donnée importante. L'un des moyens pour évaluer leur diamètre, leur forme et leur dispersité est la visualisation des nanoparticules en microscopie électronique en transmission (MET).

Avant tout, le ferrofluide est dilué dans le solvant approprié et mis dans un bain à ultrasons pendant 30 mn afin de casser les agrégats éventuels. Pour observer les nanoparticules en MET, il faut déposer et laisser sécher à température ambiante une goutte de ferrofluide dilué sur des grilles de microscopie. Les clichés sont réalisés sur un microscope Philips CM20 opérant à 200 kV.

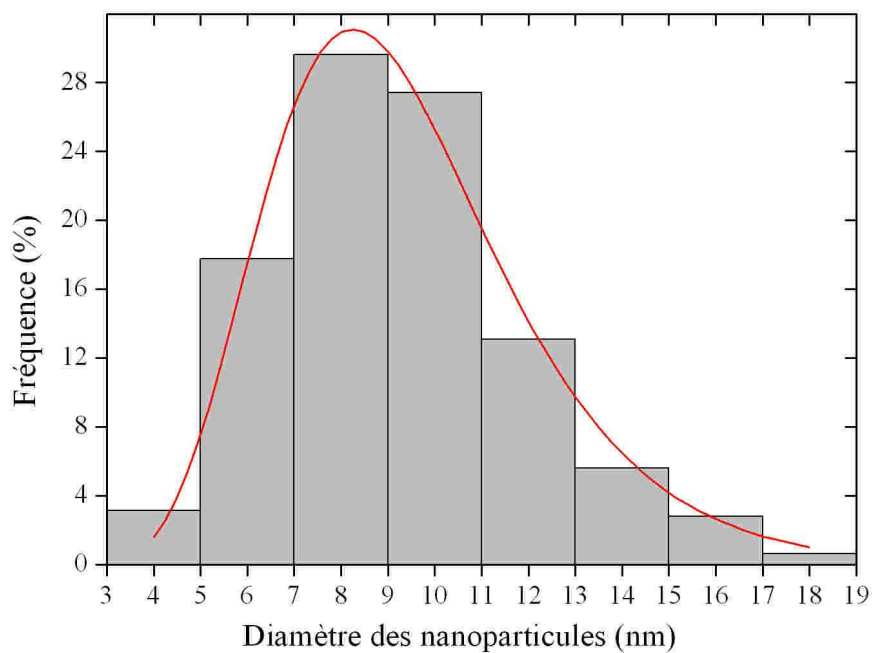
### II.3.1.a. Synthèse par coprécipitation simple

Le cliché de la figure II.4 montre des particules d'oxyde de fer plus ou moins sphériques et plus ou moins agrégées. L'agrégation est essentiellement due au phénomène de séchage de la goutte sur la grille.



**Figure II.4.** Cliché de MET de nanoparticules synthétisées par coprécipitation simple et stabilisées dans l'eau par l'acide nitrique (ferrofluide acide).

Un histogramme en taille a été réalisé à partir de plusieurs centaines de nanoparticules (fig. II.5.). La distribution a été ajustée par une loi de type log-normale (fig. II.5.).



**Figure II.5.** Histogramme en taille des nanoparticules d'oxyde de fer issues de la synthèse par coprécipitation simple ajusté à partir d'une loi log-normale.

La loi log-normale est de la forme :

$$n(d) = \frac{1}{\sqrt{2\pi}\sigma d} \times \exp\left(-\frac{\ln^2(d/d_0)}{2\sigma^2}\right)$$

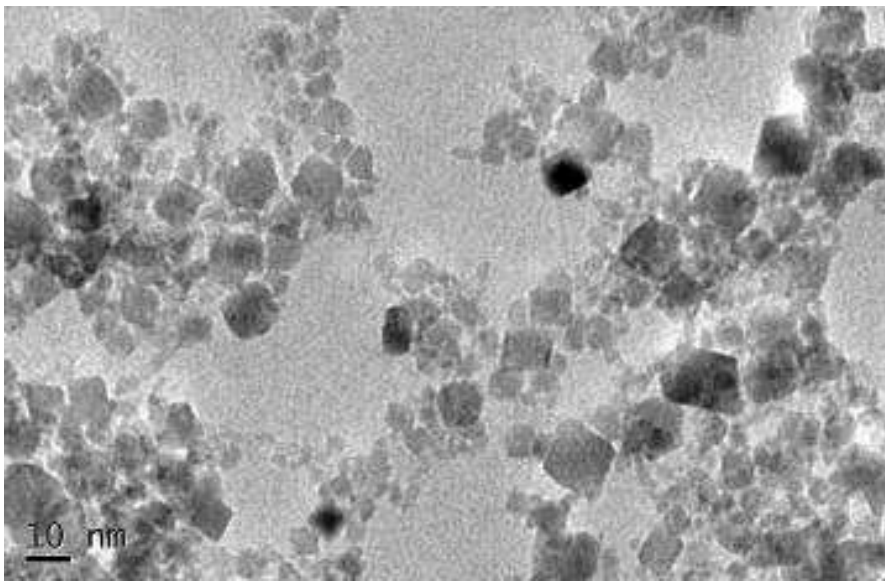
$n(d)$  est l'amplitude de la densité en fonction du diamètre  $d$ ,  $d_0$  est le diamètre médian et  $\sigma$  est l'écart-type des  $\ln(d)$ .

Le diamètre le plus probable des particules, noté  $d_p$ , est relié à  $d_0$  et  $\sigma$  par la relation  $d_p = d_0 \exp(-\sigma^2)$ . Si l'écart-type est grand, la dispersion des valeurs autour de  $d_p$  est très large. Si  $\sigma$  est faible, la dispersion des valeurs est étroite autour de  $d_p$ .

Dans le cas de la synthèse par coprécipitation simple, le diamètre le plus probable est de 8,3 nm et le diamètre médian est de 9 nm. L'écart-type de cette synthèse est  $\sigma = 0,29$ .

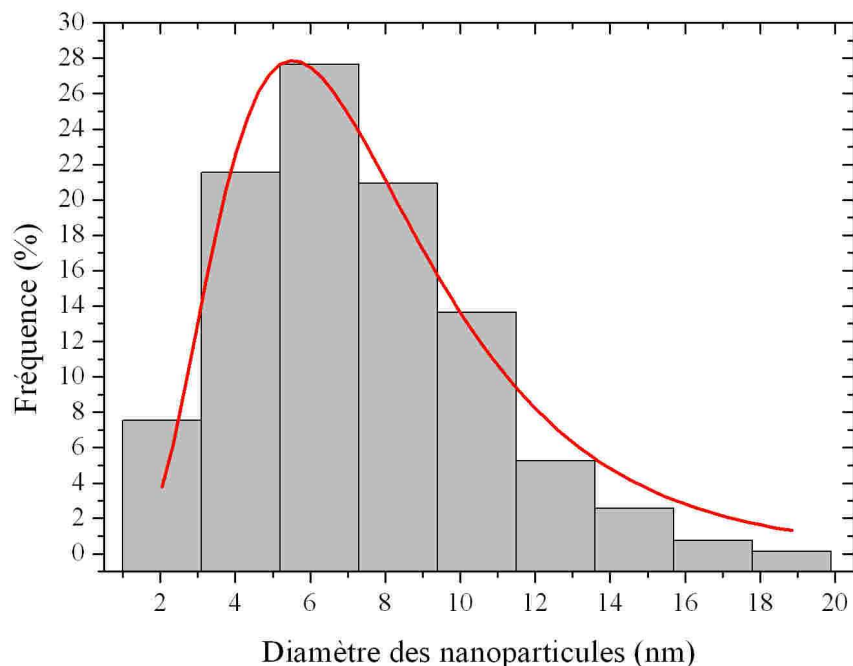
### *II.3.1.b. Synthèse par coprécipitation assistée des ultrasons*

En MET, les nanoparticules issues de la synthèse par coprécipitation assistée des ultrasons apparaissent très facettées. A première vue, elles apparaissent plus polydisperses en taille que sans ultrasons, le cliché montre en effet de très petites particules mais aussi des plus grosses allant de 1 nm à 19 nm. Comme précédemment, les particules sont plus ou moins agrégées et sont inférieures à 20 nm.



**Figure II.6.** Cliché de MET de nanoparticules synthétisées par coprécipitation assistée par les ultrasons et stabilisées dans l'eau par les ions de tétraméthylammonium (ferrofluide basique).

Une distribution en taille de ce dépôt est faite à partir de quelques centaines de nanoparticules (environ 800) et nous avons ajusté cette distribution à l'aide de la loi log-normale.



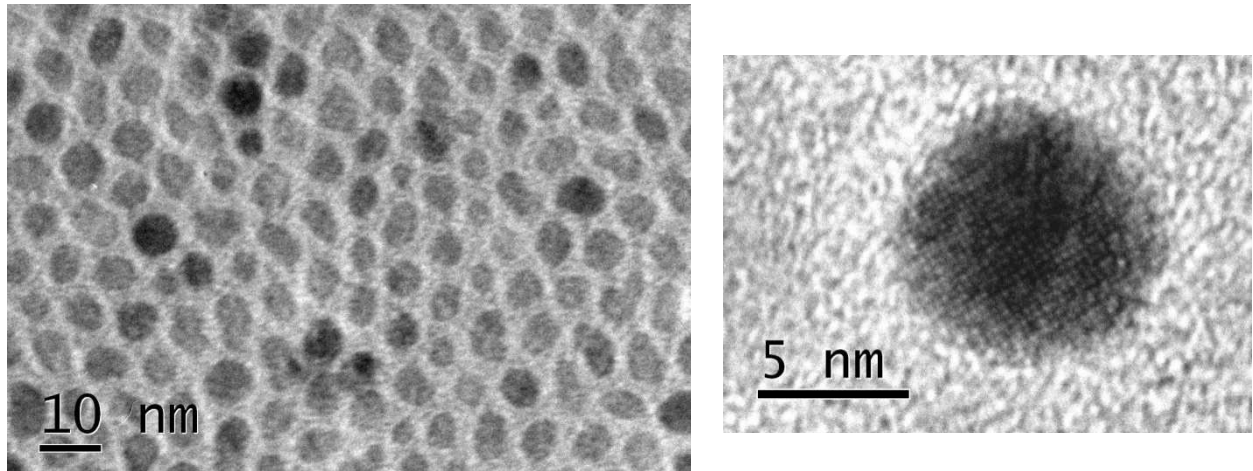
**Figure II.7. Histogramme en taille des nanoparticules d'oxyde de fer issues de la synthèse par coprécipitation assistée par les ultrasons ajusté à partir d'une loi log-normale.**

Dans le cas de la synthèse par coprécipitation assistée des ultrasons, l'histogramme en taille montre l'existence de très petites particules dont le diamètre est inférieur à 3 nm et qui n'étaient pas observées dans la synthèse précédente. De plus, pour la synthèse assistée par les ultrasons, 21% des nanoparticules ont des tailles comprises entre 3 et 5 nm tandis que pour la synthèse sans ultrasons, seulement 3% des nanoparticules sont dans cette gamme de taille. Le diamètre médian calculé à partir de l'ajustement par la loi log-normale est de 7,1 nm, et le diamètre le plus probable est de 5,5 nm. La dispersion en taille autour de  $d_p$  est très large avec  $\sigma = 0,5$ .

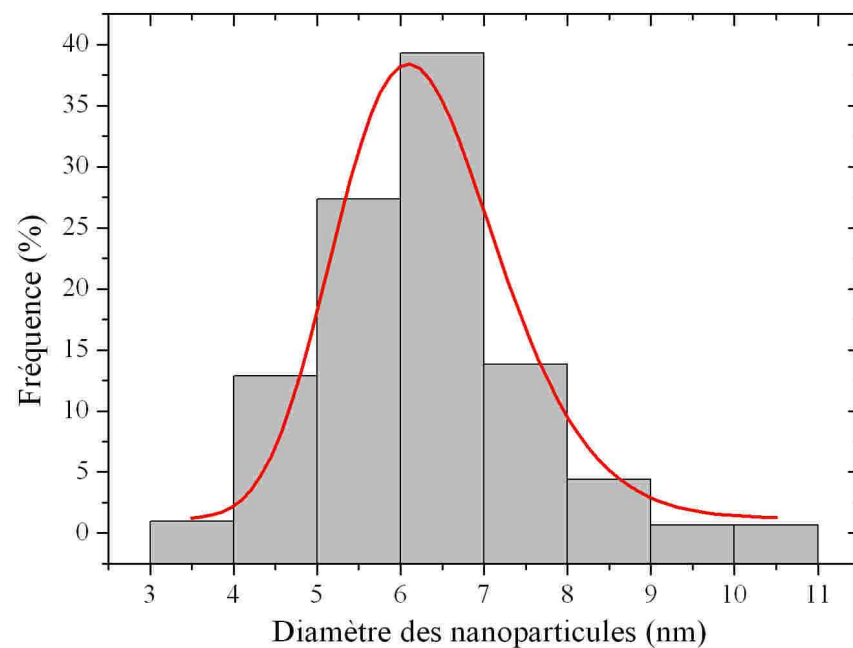
### ***II.3.1.c. Synthèse type micelle inverse par réduction d'acétylacétonate de fer***

Sur le cliché de microscopie présenté figure II.8. (à gauche), nous observons un tapis de nanoparticules bien délimitées. L'acide oléique est un acide gras de formule chimique brute  $C_{18}H_{34}O_2$  et est dans le cas présent le ligand (cf fig.II.3.). En effet, cette molécule amphiphile comporte une tête hydrophile qui interagit fortement avec les groupements hydroxyles des nanoparticules et une chaîne hydrophobe qui rend les particules hydrophobes. Par ailleurs, ce ligand à longue chaîne alkyle aide à la stabilisation stérique des nanoparticules et évite ainsi leur agrégation. La distance interparticulaire entre deux particules voisines est en moyenne 2,1 nm ( $d_p = 2,1$  nm,  $d_0 = 2,1$  nm et  $\sigma = 0,14$ ), c'est-à-dire qu'elle est très inférieure à la longueur de deux chaînes d'acide oléique mises bout à bout, une chaîne mesurant 1,75 nm [Lee D. K. *et al.*, 2007; Pauly M. *et al.*, 2009]. Par conséquent, les chaînes d'acide gras de deux particules voisines s'interpénètrent fortement sans que les nanoparticules ne s'agglomèrent lors du dépôt.

Les nanoparticules sont de forme plus ou moins sphérique. En microscopie haute résolution (fig. II.8., à droite), les plans réticulaires sont visibles ce qui permet de confirmer que les particules sont bien cristallisées.



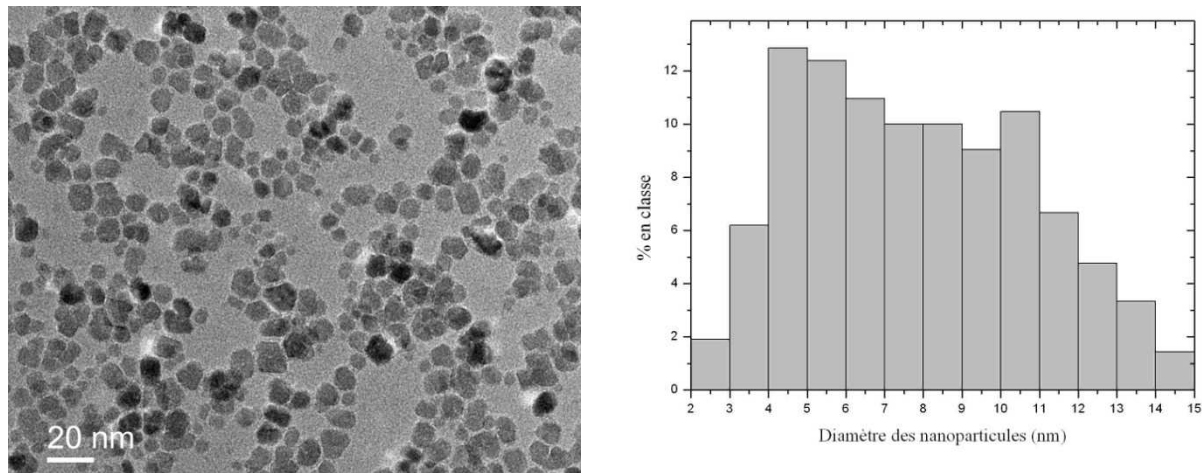
**Figure II.8.** Clichés de MET de nanoparticules synthétisées par réduction d'acétylacétonate de fer dans l'éther d'octyl et stabilisées par de l'acide oléique dans l'hexane. A droite-cliché haute résolution d'une nanoparticule dont on distingue les plans réticulaires.



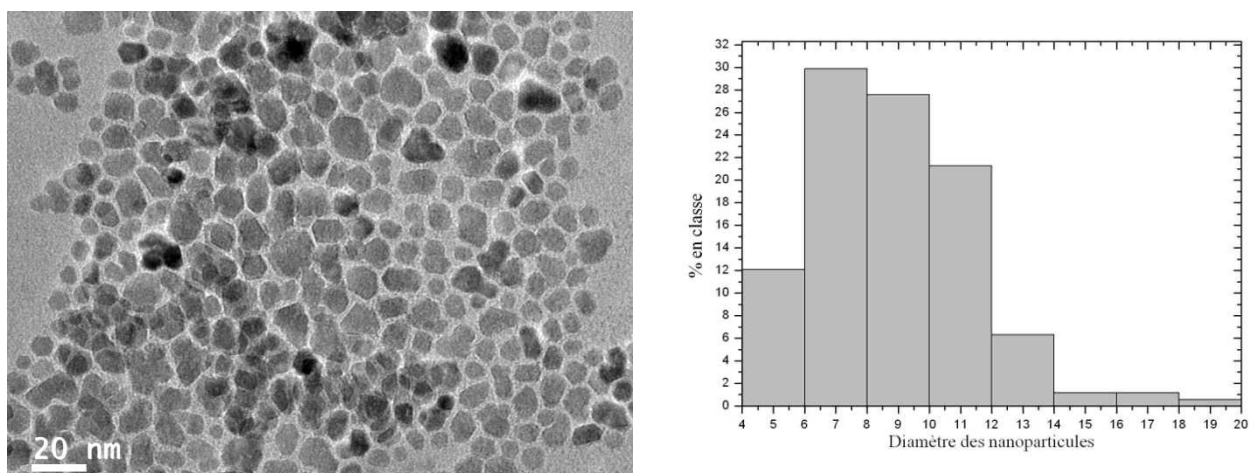
**Figure II.9.** Histogramme en taille des nanoparticules d'oxyde de fer issues de la synthèse par réduction d'acétylacétonate de fer dans l'éther d'octyl ajusté à partir d'une loi log-normale.

A partir de la distribution en taille (fig. II.9.), la loi log-normale nous donne le diamètre le plus probable  $d_p = 6,1$  nm, le diamètre médian  $d_0 = 6,2$  nm et l'écart-type  $\sigma = 0,16$  nm. La dispersion est donc très peu polydisperse.

D'après Sun *et al.*, plus la température de la réaction est élevée plus la taille des particules augmente [Sun S. *et al.*, 2004]. En plus de la synthèse dans l'éther d'octyl, nous avons testé d'autres solvants ayant des températures d'ébullition différentes tout en conservant les mêmes étapes précisées dans le paragraphe II. 2. 2. Les températures d'ébullition de l'éther de phényl, d'octyl, et de benzyl sont respectivement 265, 295 et 300°C.



**Figure II.10. Clichés de MET de la synthèse par réduction d'acétylacétonate de fer dans l'éther de phényl et son histogramme en taille.**



**Figure II.11. Clichés de MET de la synthèse par réduction d'acétylacétonate de fer dans l'éther de benzyl et son histogramme en taille.**

La température d'ébullition de l'éther de phényl étant plus faible que pour l'éther d'octyl ou de benzyl, il est attendu des tailles de particules plus petites. Les clichés de MET des figures II.10. et II.11. ainsi que les histogrammes en taille montrent une grande hétérogénéité en taille contrairement à ce qui a été observé sur la figure II.8. et avec des nanoparticules beaucoup plus facettées. Les particules issues de la synthèse avec l'éther de phényl (figure II.10.) ont 8% de particules qui ont des tailles inférieures à 4 nm contrairement à la synthèse avec l'éther de benzyl ou d'octyl. De plus, même si l'éther d'octyl et phényl ont des températures d'ébullition proches (5°C d'écart), les particules obtenues sont très différentes. Par ailleurs, la synthèse dans l'éther d'octyl donne des nanoparticules de formes plus

arrondies contrairement aux deux autres synthèses. Les résultats montrent que les paramètres de la réaction ne sont pas optimisés pour les synthèses dans l'éther de phényl et de benzyl. L'amélioration passe par l'ajustement de certains paramètres tels que le temps de réaction, la montée contrôlée en température ou encore les précurseurs utilisés.

Par la suite, nous avons poursuivi notre étude en utilisant la synthèse par réduction d'acétylacétonate de fer donnant les meilleurs résultats, c'est-à-dire la synthèse dans l'éther d'octyl.

### **II.3.2. Caractérisation structurale des nanoparticules d'oxyde de fer**

Dans le but de déterminer la structure des oxydes de fer synthétisés, nous avons combiné deux méthodes : la diffraction des rayons X (DRX) et la spectroscopie Raman.

***Préparation des échantillons de NPs d'oxydes de fer pour la DRX :*** Les diffractogrammes de poudre ont été collectés avec un diffractomètre Philips utilisant une radiation  $\text{CuK}\alpha_1$  ( $\lambda_{\text{Cu}} = 1.5406 \text{ \AA}$ ). Les échantillons de flocculat sont séchés, broyés et compactés sur un support en PVC ou tout simplement déposés par évaporation du solvant sur une plaque de verre.

***Préparation des échantillons de NPs d'oxyde de fer pour la spectroscopie Raman :*** L'analyse Raman se fait à partir de flocculat de particules ou d'une goutte de ferrofluide séché sur une lamelle de microscopie optique en verre. L'appareil utilisé est un microspectromètre Raman confocal à balayage LabRam équipé d'une platine Peltier. La longueur d'onde excitatrice émise avec un laser hélium-néon est de 632,8 nm. Afin de prévenir la dégradation de l'échantillon et la transformation de phase des oxydes de fer dues à la température [de Faria *et al*, 1997] la puissance du laser a été réduite à l'aide de filtres de 15 mW au départ à 0,4 mW. La proportion en magnétite et en maghémite dans l'échantillon est évaluée par une analyse semi-quantitative en déconvoluant les bandes Raman-actives grâce à des courbes Lorentziennes. Une moyenne est effectuée en visant trois à quatre zones sur l'échantillon.

#### ***II.3.2.a. Synthèse par coprécipitation simple***

Le diffractogramme de la figure II.12. donne des informations sur la cristallinité des oxydes de fer. La largeur des raies peut indiquer un effet dû à la taille réduite des particules mais éventuellement être la conséquence d'oxydes de fer mal cristallisés.



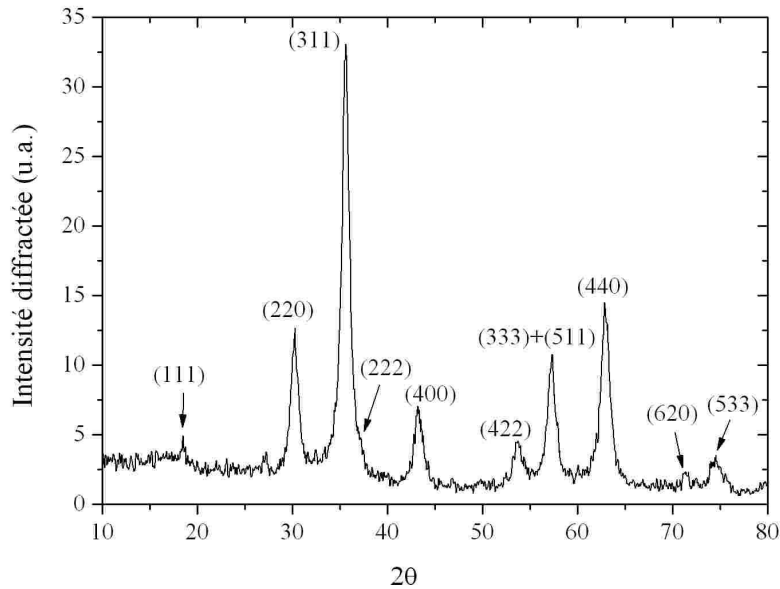


Figure II.12. Diffractogramme de poudre d'oxyde de fer synthétisé par coprécipitation simple.

Nous avons indexé les pics de Bragg de ce diffractogramme en effectuant le rapport de la position du pic par rapport au pic le plus intense (pic de référence). Ce rapport au carré est un entier naturel :

$$\left( \frac{\sin \theta_1}{\sin \theta_{ref}} \right)^2 = \frac{N_1^2}{N_{ref}^2}$$

Le pic de référence étant le pic correspondant aux indices de Miller (311), on prendra  $\theta_{ref}(\text{°}) = \frac{35,55}{2} = 17,775$  et  $N_{ref}^2 = h^2 + k^2 + l^2 = 3^2 + 1^2 + 1^2 = 11$ . Les résultats sont regroupés dans le tableau II.1.

Pic	2θ °	N <sup>2</sup>	N	h	k	l	N <sup>2</sup> théorique	N théorique	Remarques
1	18,4	3,0171	1,7369	1	1	1	3	1,7320	
2	30,25	8,0358	2,8347	2	2	0	8	2,8284	
3	35,55	11	3,3166	3	1	1	11	3,3166	<b>Pic de référence</b>
	37,25	12,0390	3,4697	2	2	2	12	3,4641	Epaulement
4	43,2	15,9950	3,9993	4	4	0	16	4	
	47,3	18,9935	4,3581	3	3	1	19	4,3589	Non observé
5	53,7	24,0775	4,9068	4	2	2	24	4,8990	
6	57,3	27,1329	5,2089	5	1	1	27	5,1962	
7	62,85	32,0854	5,6644	4	4	0	32	5,6569	
8	71,35	40,1431	6,3358	6	2	0	40	6,3246	
9	74,5	43,2443	6,5760	5	3	3	43	6,5574	

Tableau II.1. Indexation des pics du diffractogramme de la figure II. 12.

Les valeurs calculées à partir des données expérimentales sont en accord avec les valeurs théoriques, l'indexation des pics correspond au groupe d'espace cubique  $Fd\bar{3}m$ .

La loi de Bragg  $d_{hkl} = \frac{\lambda}{2 \sin \theta}$  et l'expression du paramètre de maille établie pour une maille

cubique  $a = d_{hkl} \sqrt{h^2 + k^2 + l^2}$  permet de moyenner sur chaque pic la valeur de  $a$ .

Dans le tableau II.2., nous avons calculé le paramètre de maille déduit de chaque pic, que nous avons également mis sous forme graphique dans la figure II.13. L'ensemble des points se trouvent entre les valeurs des paramètres de maille de la magnétite et de la maghémite.

Pic observé	20 °	N	$d_{hkl}$ (Å)	$a$ (Å)
1	18,4	1,7370	4,8161	8,3417
2	30,25	2,8348	2,9510	8,3468
3	35,55	3,3166	2,5223	8,3654
4	37,25	3,4697	2,4110	8,3667
	43,2	3,9994	2,0917	
5	47,3	4,3582	1,9195	8,3520
	53,7	4,9069	1,7048	
6	57,3	5,2089	1,6060	8,3449
7	62,85	5,6644	1,4768	8,3543
8	71,35	6,3359	1,3203	8,3505
9	74,5	6,5760	1,2721	8,3418

Tableau II.2. Détermination du paramètre de maille des oxydes de fer.

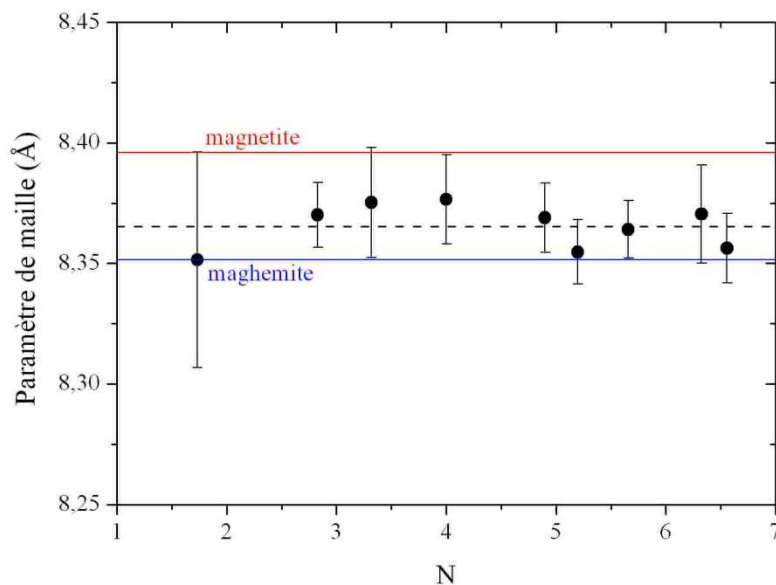
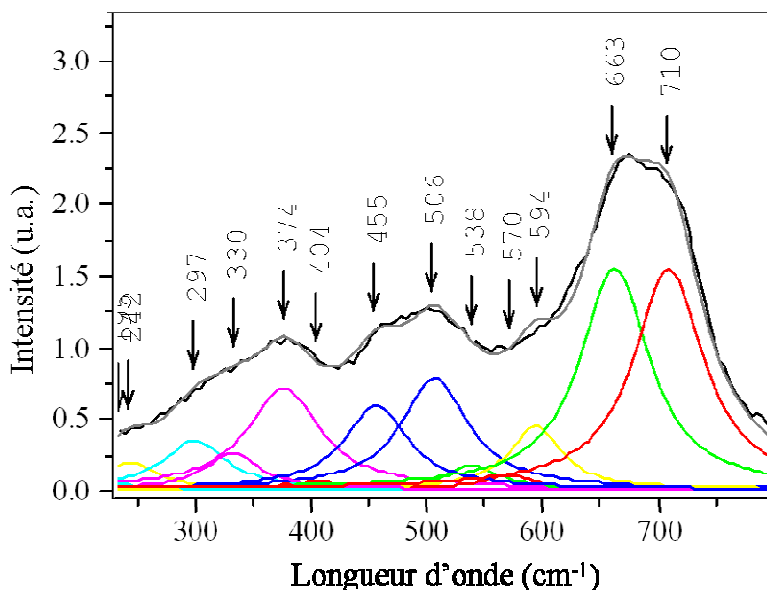


Figure II.13. Valeur calculée du paramètre de maille  $a$  en fonction de  $N$  expérimental et comparaison avec les paramètres de maille de la maghémite et de la magnétite.

La différence entre les paramètres de maille de la magnétite et de la maghémite étant faible (8,3970 Å et 8,3515 Å respectivement), le calcul du paramètre de maille ne nous permet pas de conclure quand à la phase obtenue à l'issue de la synthèse. Comme lors de la synthèse nous n'avons pas effectué l'étape d'oxydation de la magnétite, il est probable que l'échantillon est un mélange des deux phases.

La spectroscopie Raman est utilisée dans l'analyse des nanoparticules d'oxyde de fer. En 2005, Chourpa *et al.* présente une analyse semi-quantitative par la spectroscopie confocale Raman

permettant de caractériser la composition moléculaire des oxydes de fer et d'en déduire la proportion en magnétite et en maghémite dans l'échantillon [Chourpa *et al.*, 2005].

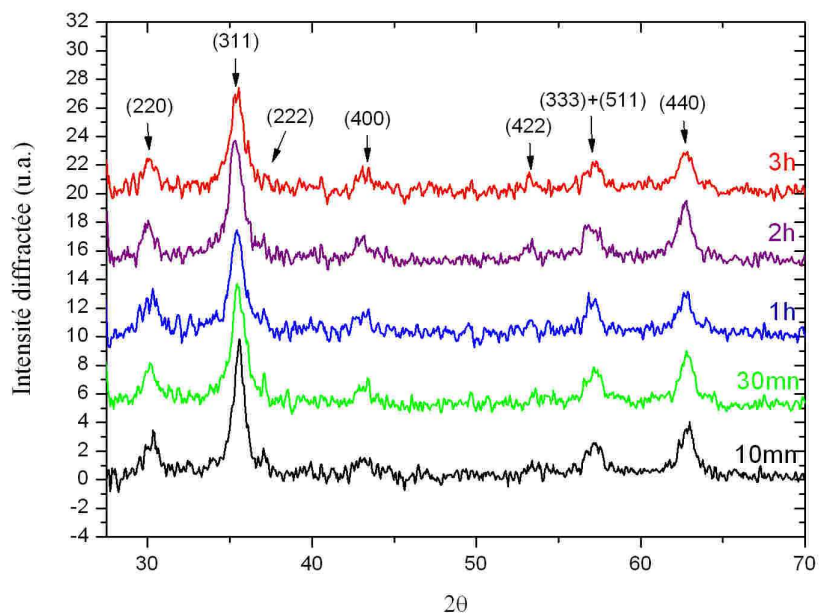


**Figure II.14. Spectre Raman des nanoparticules d'oxyde de fer synthétisées par coprécipitation simple.**

La théorie prédit que la magnétite aura cinq bandes actives en Raman : trois  $T_{2g}$ , une  $E_g$  et une  $A_{1g}$ . Nous avons fait le choix de travailler sur la gamme de 150 à 800  $cm^{-1}$ . Dans cette zone, la magnétite est caractérisée par trois bandes à 300, 532 et 661  $cm^{-1}$  [de Faria D. L. A. *et al.*, 1997]. D'après la littérature, le spectre Raman de la maghémite contient généralement trois bandes principales vers 350, 500 et 700  $cm^{-1}$  [Chourpa I. *et al.*, 2005 ; Soler M. A. G. *et al.*, 2007]. Le spectre moyen pris dans différentes zones de l'échantillon est donné figure II.14. La bande la plus intense est située entre 600 et 750  $cm^{-1}$ , il est possible de la déconvoluer en deux bandes, une bande à 663  $cm^{-1}$  et une autre à 710  $cm^{-1}$ . Le mode  $A_{1g}$  de la magnétite nanophasée est attribué à la bande à 663  $cm^{-1}$  et la seconde bande est assignée à la maghémite. Le rapport de l'aire intégrée des bandes 710/663  $cm^{-1}$  sur 4 zones de l'échantillon fournit une estimation semi-quantitative de la proportion de magnétite et de maghémite (selon Chourpa *et al.*). Dans le cas présent de la synthèse par coprécipitation simple, cette méthode donne une proportion de magnétite de 55% contre 45% de maghémite.

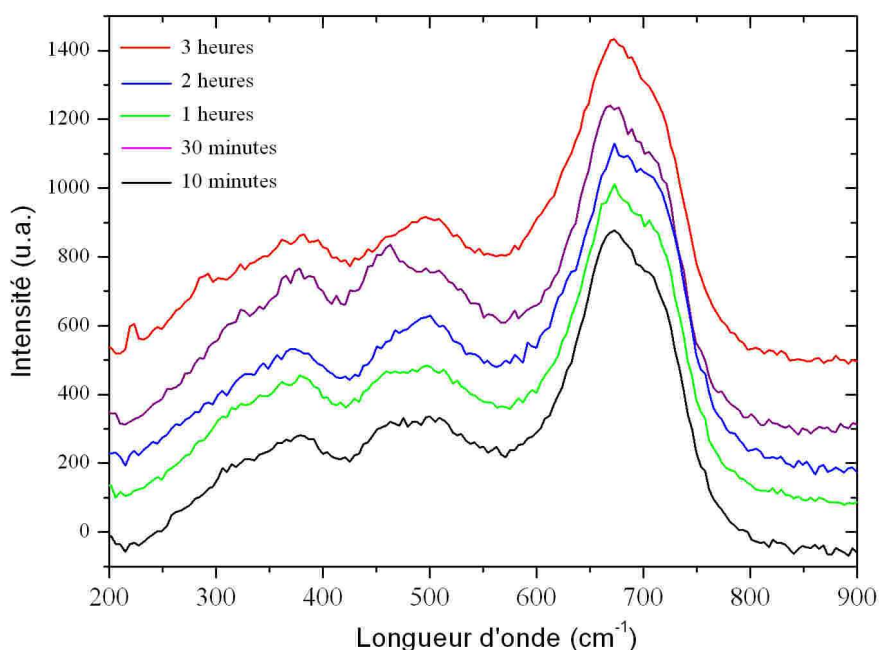
### **II.3.2.b. Synthèse par coprécipitation assistée des ultrasons**

Lors de la synthèse assistée par les ultrasons nous avons prélevé un échantillon de flocculat à différents moments successifs de la synthèse. La figure II.15. représente les diffractogrammes des oxydes de fer de 10 minutes à 3 heures d'ultrasons. Aucune différence significative n'a été enregistrée et ces diffractogrammes possèdent les mêmes pics de Bragg caractéristiques de la magnétite et de la maghémite cubiques. Les pics de Bragg sont diffus et indiquent, comme pour la synthèse précédente, que les particules sont mal cristallisées et que les particules de l'échantillon sont très fines.



**Figure 2.15. Diffractogrammes de poudre d'oxyde de fer synthétisé par coprécipitation assistée par les ultrasons à différents instants (de 10 mn à 3h).**

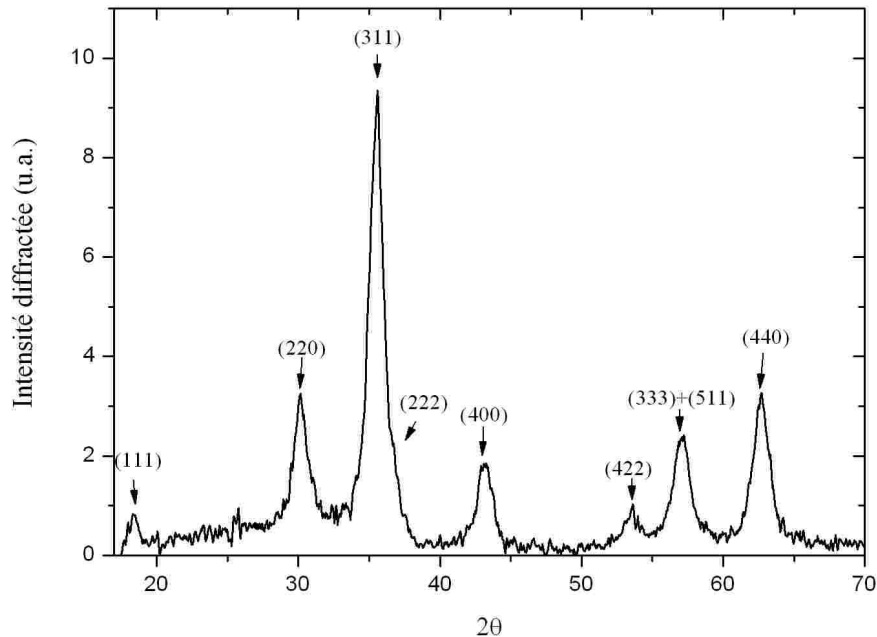
L'analyse semi-quantitative par spectroscopie Raman, décrite par Chourpa *et al.*, va nous informer sur la composition des oxydes de fer de chaque prélèvement aux différents instants. Entre 10 minutes et 3 heures d'ultrasons, aucune différence significative dans les spectres Raman n'est enregistrée. Contrairement à ce que l'on pourrait penser, le temps d'US n'influence pas la composition en maghémite.



**Figure II.16. Spectres Raman moyens des nanoparticules d'oxyde de fer synthétisées par coprécipitation assistée des ultrasons de 10 minutes à 3 heures d'ultrasons.**

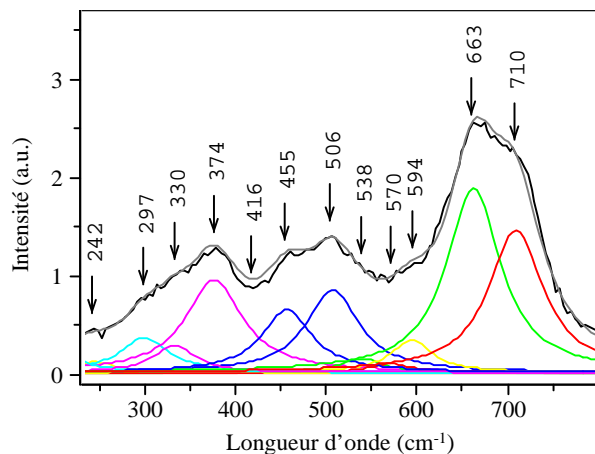
### II.3.2.c. Synthèse type micelle inverse par réduction d'acétylacétonate de fer

La quantité de nanoparticules issue de la synthèse par réduction d'acétylacétonate de fer étant faible et le produit sec étant visqueux dû à la présence d'acide oléique, la DRX a été réalisée à partir de dépôt de nanoparticules sur une plaque de verre après évaporation de l'hexane. Il est important de concentrer au maximum le film de nanoparticules pour bien couvrir la surface du verre et pour avoir une quantité suffisante de matière qui diffracte. En soustrayant le signal amorphe du verre, le diffractogramme de la figure II.17. est obtenu. Sept pics représentatifs de la magnétite et de la maghémite sont indexés par les indices de Miller associés.



**Figure II.17. Diffractogramme d'un dépôt de ferrofluide après évaporation de solvant sur plaque de verre d'oxyde de fer synthétisé par réduction d'acétylacétonate de fer.**

Le spectre Raman de la figure II.18. présente les mêmes bandes à 663 et 710  $\text{cm}^{-1}$ , la proportion de magnétite et de maghémite a été établie à partir de ces deux bandes. Le ferrofluide à base d'oxyde de fer synthétisé par réduction de fer (III) acétylacétonate est évalué à 61% de magnétite et 39% de maghémite.



**Figure II.18. Spectre Raman des nanoparticules d'oxyde de fer synthétisées par réduction d'acétylacétonate.**

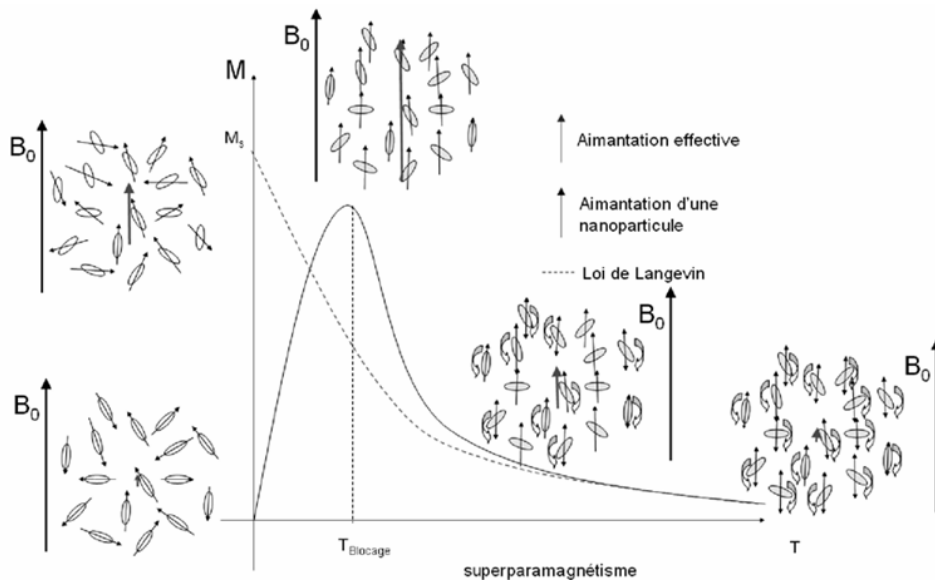
### II.3.3. Propriétés magnétiques des nanoparticules d'oxyde de fer

Les fluctuations thermiques désorientent l'aimantation. Au-dessus de la température de blocage, on voit apparaître un comportement paramagnétique de l'aimantation  $M$  conformément à la loi de Langevin :

$$M = M_s(\coth x - 1/x)$$

avec  $x = \mu_0 \mu B / k_B T$ ,  $\mu$  moment magnétique des particules monodomaines,  $\mu_0$  perméabilité du vide et  $M_s$  aimantation à saturation. Expérimentalement la mesure d'une grandeur physique n'est pas instantanée, elle s'effectue sur un temps  $t_m$  (temps de mesure) caractéristique de l'appareil utilisé. Pour un magnétomètre à SQUID,  $t_m$  est de l'ordre de 100 s. La température de blocage dépend du temps que prend une mesure à être réalisée.

L'évolution de l'aimantation d'un ensemble de particules est résumée sur la figure II.19.



**Figure II.19. Evolution de l'aimantation en fonction de la température. Blocage des aimantations à basse température, qui s'annulent deux à deux pour donner une aimantation effective nulle, et évolution à haute température comme un matériau paramagnétique suivant la loi de Langevin. On notera la diminution de la norme de l'aimantation des nanoparticules avec la température. Les doubles flèches schématisent l'effet du superparamagnétisme [Fleurier R., 2006].**

Les mesures magnétiques sont réalisées sur le magnétomètre à SQUID du *Laboratoire de Physique de la Matière Condensée* (Vinca Institut), en Serbie.

Le protocole expérimental de mesure ZFC/FC s'articule en quatre temps.

Pour le ZFC ou *zero field cooled* :

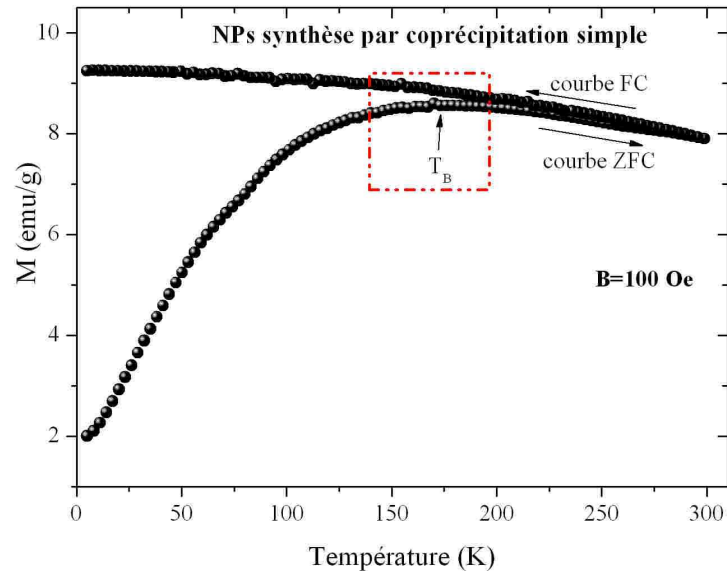
1. L'échantillon est refroidi à 5 K en champ nul ;
2. Un champ magnétique faible est appliqué (100 Oe) ;
3. On augmente la température de 5 à 300 K, l'aimantation est mesurée tous les  $\Delta T$ .

Pour le FC ou *field cooled* :

4. On diminue la température de 300 à 5 K sous champ et l'aimantation est de même mesurée tous les  $\Delta T$ .

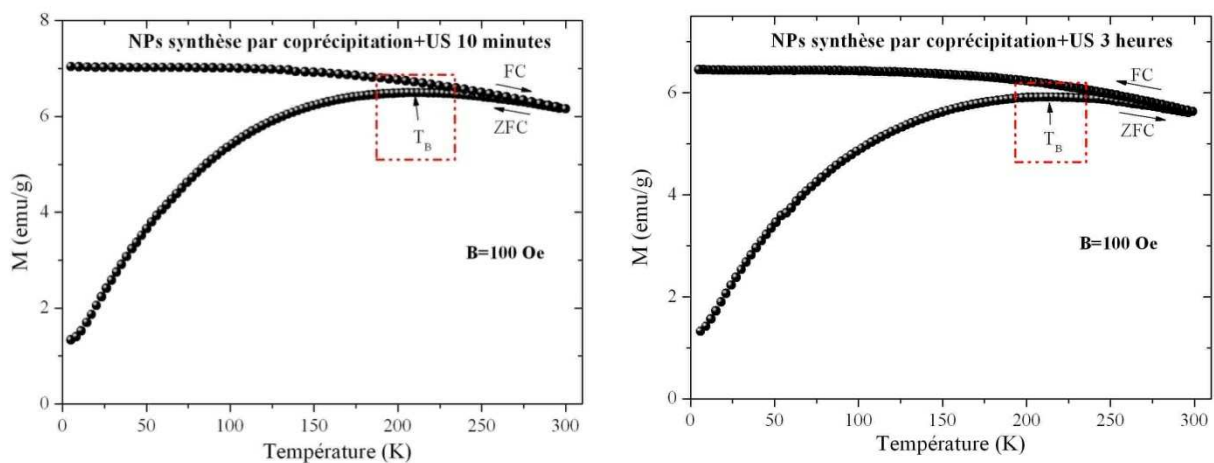
A l'aide des courbes ZFC/FC donnant l'aimantation en fonction de la température à champ magnétique constant, la température de blocage a pu être déterminée sur les échantillons de nanoparticules synthétisées selon les différentes méthodes.

Sur les figures suivantes, nous pouvons observer que l'aimantation augmente puis diminue avec la température, les maxima correspondent à la température de blocage.



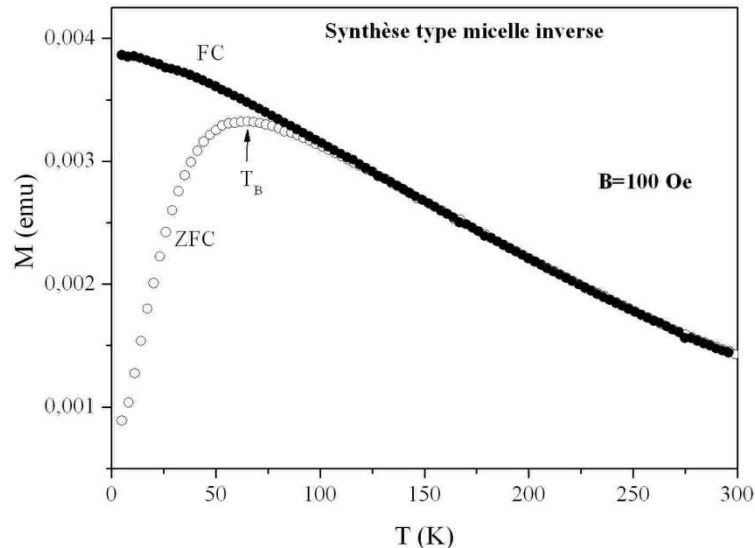
**Figure II.20. Courbes ZFC/FC des nanoparticules d'oxyde de fer synthétisées par coprécipitation simple.**

Plusieurs informations ressortent de ces courbes. D'une part, nous confirmons qu'à température ambiante, les nanoparticules d'oxyde de fer synthétisées sont dans l'état superparamagnétique. D'autre part, nous connaissons les températures de blocage ( $T_B$ ). Pour la synthèse par coprécipitation simple, cette température est de 170 K environ. Elle est supérieure pour la synthèse assistée par les US puisque la  $T_B$  est de 210K. La figure II.22. concerne les mesures magnétiques en ZFC/FC des nanoparticules d'oxyde de fer synthétisées par réduction d'acétylacétonate de fer. La température de blocage est plus faible dans ce cas avec  $T_B=65$  K.



**Figure II.21. Courbes ZFC/FC des nanoparticules d'oxyde de fer synthétisées par coprécipitation assistée par les US pendant 10 minutes et 3 heures.**

Sur les courbes de la figure II.21., nous ne constatons aucune différence dans le comportement magnétique des NPs soumises 10 minutes ou 3 heures aux US. Les maxima sur ces courbes sont très larges, ce qui est la conséquence de la large distribution en taille observée pour les NPM issues de cette synthèse. En effet, chaque taille correspond à une température de blocage, donc plus la distribution de taille sera importante au sein de l'échantillon, plus il y aura de  $T_B$  différentes. Sur la figure II.22., la distribution en taille étant étroite, le maximum de la courbe de ZFC est plus fin.



**Figure II.22. Courbes ZFC/FC des nanoparticules d'oxyde de fer synthétisées par réduction d'acétylacétonate de fer type micelle inverse.**

## II.4. Conclusion sur les synthèses des nanoparticules d'oxyde de fer

La synthèse d'oxyde de fer la plus simple à mettre en œuvre et nécessitant le moins de contraintes est de loin la synthèse par coprécipitation assistée des ultrasons. Néanmoins cette synthèse, qui donne la valeur du diamètre le plus probable la plus faible, s'avère la moins performante tant au niveau du contrôle de la taille que de la cristallinité des nanoparticules.

	$d_p$ (nm)	$d_0$ (nm)	$\sigma$	% magnétite	% maghémite
<b>Coprécipitation simple</b>	8,3	9	0,29	55	45
<b>Coprécipitation + Ultrasons</b>	5,5	7,1	0,50	54	46
<b>Réduction Fe(acac)<sub>3</sub> type micelle inverse</b>	6,1	6,2	0,16	61	39

**Tableau II.4. Caractéristiques des nanoparticules synthétisées par les trois méthodes décrites dans ce chapitre.**

La synthèse par réduction d'acétylacétonate de fer possède la distribution en taille la plus étroite, les valeurs de diamètre mesuré étant groupées autour de  $d_p = 6,1$  nm. D'ailleurs, la valeur du diamètre le plus probable et du diamètre médian sont voisines contrairement aux autres synthèses. Cependant, cette synthèse est de loin la plus exigeante, et les molécules d'acide oléique sont fortement adsorbées en surface. Il est donc très difficile de séparer les NPM de ces ligands.



# Chapitre III

## Conception et mise au point d'un système de délivrance thermomagnétique

---

*« A la source de toute connaissance, il y a une idée, une pensée, puis l'expérience vient confirmer  
l'idée. »*

*C. Bernard*

---

<b>Chapitre III</b>	
<b>Conception et mise au point d'un système de délivrance thermomagnétique.....</b>	<b>57</b>
<b>III.1. Introduction.....</b>	<b>59</b>
<b>III.2. Préparation et caractérisation des Isasomes et de l'hydrogel magnétique.....</b>	<b>60</b>
<b>III.2.1. Emulsions de mésophases lipidiques.....</b>	<b>60</b>
<i>III.2.1.a. Auto-assemblage, transitions de phase et caractérisation structurale.....</i>	<i>60</i>
<i>III.2.1.b. L'interface des émulsions : définition d'un tensioactif, propriétés des agents tensioactifs, balance HLB.....</i>	<i>62</i>
<i>III.2.1.c. Effet de l'émulsifiant sur la taille des émulsions et leur stabilité.....</i>	<i>66</i>
<i>III.2.1.d. Effet du tensioactif sur la structure interne des Isasomes.....</i>	<i>70</i>
<b>III.2.2. Encapsulation de nanoparticules magnétiques hydrophobes dans les Isasomes.....</b>	<b>71</b>
<i>III.2.2.a. Choix du PA et influence du PA sur la structure des émulsions....</i>	<i>72</i>
<i>III.2.2.b. Effet du confinement des NPM sur la structure interne des émulsions.....</i>	<i>74</i>
<i>III.2.2.c. Effet du confinement sur la taille des émulsions.....</i>	<i>77</i>
<i>III.2.2.d. Polymérisation des émulsions.....</i>	<i>79</i>
<i>III.2.2.e. Confinement des NPs dans les émulsions polymérisées.....</i>	<i>83</i>
<b>III.2.3. Préparation des hydrogels magnétiques.....</b>	<b>87</b>
<i>III.2.3.a. Choix du polymère et préparation des hydrogels magnétiques.....</i>	<i>87</i>
<i>III.2.3.b. Capacité d'absorption des hydrogels mixtes.....</i>	<i>89</i>
<i>III.2.3.c. Echauffement des NPM sous champ magnétique alternatif.....</i>	<i>90</i>
<b>III.3. Utilisation de la RPE pour suivre la diffusion de PA.....</b>	<b>93</b>
<b>III.3.1. Principe de la RPE.....</b>	<b>93</b>
<b>III.3.2. Caractérisation du signal RPE du TEMPO.....</b>	<b>95</b>
<b>III.3.3. Etude de la diffusion du PA hors du gel dans des systèmes avec et sans émulsion.....</b>	<b>103</b>
<b>III.3.4. Etude de la diffusion du PA hors du gel en fonction du temps et de la température régulée par un bain externe.....</b>	<b>107</b>
<b>III.3.5. Etude de la délivrance du PA hors du gel par activation thermomagnétique.....</b>	<b>108</b>
<b>III.4. Conclusion du chapitre III.....</b>	<b>111</b>

---

### III.1. Introduction

L'étude bibliographique du chapitre I s'est focalisée sur les travaux de divers groupes ayant rapporté la préparation de systèmes de délivrance pouvant être activés par la température et/ou par un champ magnétique. Les matériaux thermosensibles, qui ont suscité le plus d'intérêt dans notre étude, ont été les hydrogels et les émulsions nanostructurées (Isasomes). La température permet de modifier ces matériaux et déclencher la délivrance de PA par un processus de gonflement/dégonflement pour l'hydrogel ou par une modification de la structure interne des gouttes d'émulsion. Une grande quantité de molécules actives relativement lipophiles peut être solubilisée et stockée dans les émulsions nanostructurées. En les dispersant et immobilisant dans un hydrogel, cela permet d'obtenir un matériau contenant des réservoirs lipophiles. L'échauffement du système par des nanoparticules magnétiques permettrait de moduler la structure des émulsions et par là-même d'activer la diffusion des molécules qu'elles contiennent hors des gouttelettes mais aussi hors de la structure polymérique thermosensible.

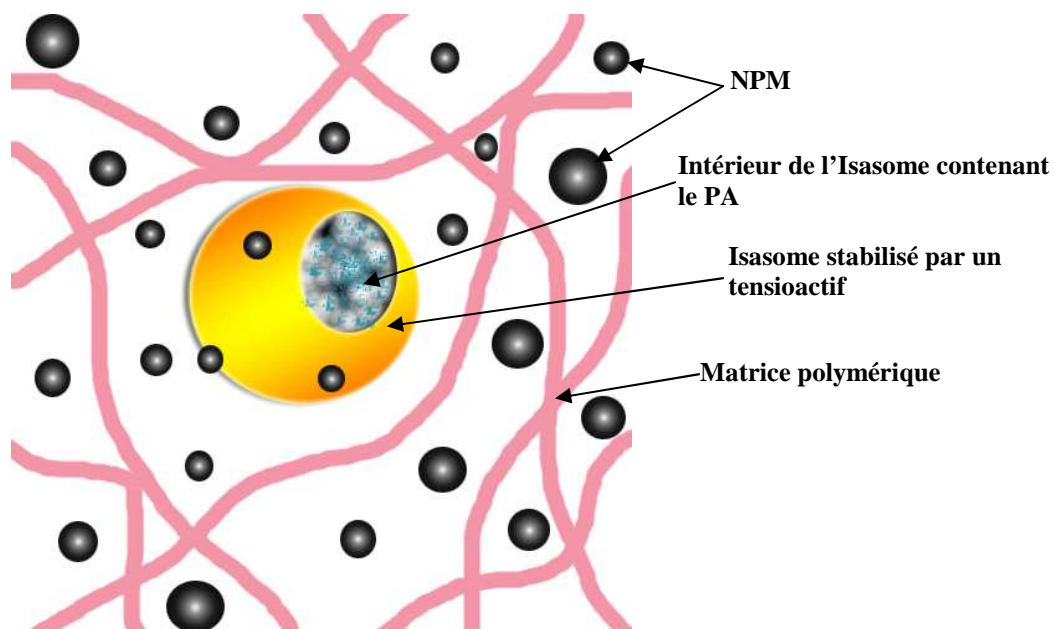


Figure III.1. Illustration de la hiérarchie du système de délivrance envisagée.

Ce chapitre a pour but d'étudier la délivrance de PA par activation thermomagnétique hors d'un système complexe comprenant des nanoparticules magnétiques, des Isasomes, un hydrogel thermosensible et un PA détectable par résonance paramagnétique électronique (RPE). La RPE s'avère être une technique très prometteuse pour le suivi à la fois du PA et des nanoparticules magnétiques.

Dans un premier temps, nous décrirons les Isasomes, le choix du tensioactif, le PA, et l'effet éventuel des additifs sur la structure de ces émulsions. Ensuite, un descriptif de la préparation de l'hydrogel magnétique sera présenté. Les premiers essais de chauffage par hyperthermie magnétique sur ce système seront commentés. Enfin, nous montrerons l'efficacité du suivi de la délivrance de PA par résonance paramagnétique électronique.

## III.2. Préparation et caractérisation des Isasomes et de l'hydrogel magnétique

### III.2.1. Emulsions de mésophases lipidiques

#### III.2.1.a. Auto-assemblage, transitions de phase et caractérisation structurale

Il a été montré (voir § I.2.a.) qu'il est possible de former des émulsions stables de systèmes binaires lipides structurants (MLO)/eau. L'incorporation d'un additif lipophile ou amphiphile aux Isasomes a permis la réalisation d'un nouveau système dont la structure interne peut être contrôlée non seulement par la température mais aussi par la quantité d'additif solubilisée à température constante. Dans ce travail, l'additif que nous avons utilisé est le R-(+)-limonène ; les différentes phases du système ternaire émulsifié MLO/R-(+)-limonène/eau ont été présentées récemment [Guillot S. *et al.*, 2006].

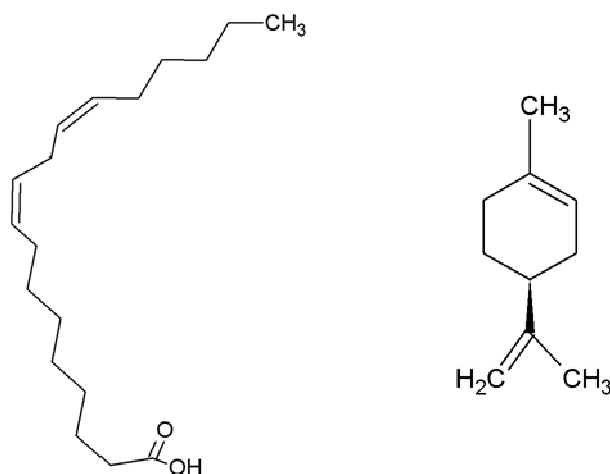


Figure III.2. Molécules de MLO et de R-(+)-limonène.

Deux paramètres principaux ont été définis pour caractériser les Isasomes ; les paramètres  $\beta$  et  $\delta$  dont les définitions sont :

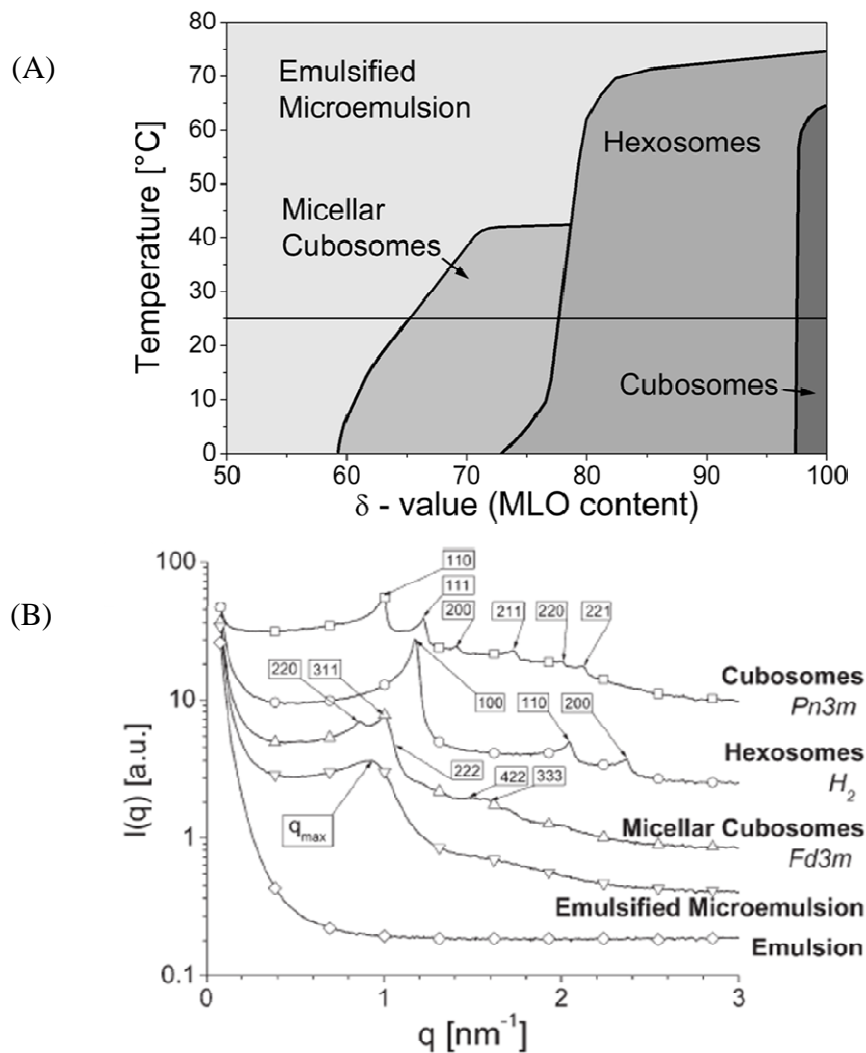
$$\delta = \frac{\text{masse MLO}}{(\text{masse MLO} + \text{masse R-(+)-limonène})}$$

$$\beta = \frac{\text{masse du tensioactif}}{(\text{masse MLO} + \text{masse R-(+)-limonène})}$$

Le paramètre  $\delta$  représente la concentration de MLO dans le mélange hydrophobe et  $\beta$ , le rapport de la quantité d'émulsifiant sur la phase dispersée. Le paramètre  $\beta$  permet principalement de contrôler la taille des Isasomes en augmentant ou en diminuant la quantité d'émulsifiant.

En ajustant la valeur de  $\delta$ , la structure interne des Isasomes peut être contrôlée. Le diagramme de phase de ce système est donné dans la figure III.3.A ci-après. Lorsque la quantité de R-(+)-limonène augmente dans le système dispersé MLO/eau, c'est-à-dire lorsque la valeur de  $\delta$  diminue, la structure

interne passe d'une phase cubique  $Pn\bar{3}m$  à une phase hexagonale inverse puis à une phase micellaire cubique ( $T < 40^\circ\text{C}$ )  $Fd\bar{3}m$  pour aboutir à des micelles inverses non structurés ou microémulsions. De même, à une valeur de  $\delta$  donnée, la structure interne change en fonction de l'augmentation ou de la diminution de la température. Le système est parfaitement réversible en température car il s'agit de mésophases en excès d'eau en équilibre thermodynamique avec le solvant. De plus, une expulsion d'eau par les particules a lieu simultanément avec le changement de structure dû à l'augmentation de la température puisque la quantité d'eau solubilisée à l'intérieur des Isasomes est directement liée à leur structure interne [Salonen A. *et al.*, 2007]. Les particules incorporent à nouveau de l'eau lorsque la dispersion est refroidie. Ce comportement fait penser à un « mode de respiration » des particules.



**Figure III.3. (A) Diagramme de phase du système MLO/R-(+)-limonène. (B) courbes de diffusion caractéristiques et indexation des pics de Bragg [Moitzi C. *et al.*, 2007].**

De par les interactions qui existent entre la matière et le rayonnement, la diffusion par un échantillon d'un faisceau de rayons X permet de déduire l'organisation de la matière au sein de cet échantillon à différentes échelles déterminées par la gamme de vecteurs de transfert utilisée. La diffusion des rayons X aux petits angles est donc une technique permettant de sonder la structure des Isasomes. L'intensité diffusée est proportionnelle au facteur de forme de l'élément diffusant (fonction dont l'enveloppe

décroit en  $q^{-4}$  pour une sphère homogène) multiplié par le facteur de structure. La figure III.3.(B) rassemble les courbes de diffusion aux petits angles caractéristiques de ces systèmes émulsifiés attestant du caractère cristallin ou non des Isasomes. Les pics de Bragg obtenus sur la figure III.3.(B) dûs à la structure de la mésophase émulsifiée sont indexés par les indices de Miller (h k l) (voir annexe B).

### III.2.1.b. L'interface des émulsions : définition d'un tensioactif, propriétés des agents tensioactifs, balance HLB

La mise en suspension de gouttelettes d'émulsions dans le cas général et plus particulièrement de nos mésophases nécessite la présence d'un ou plusieurs tensioactifs. Les molécules tensioactives sont des composés amphiphiles qui comportent une partie apolaire ayant donc une affinité pour les composés lipophiles et une partie polaire ayant une forte affinité pour l'eau.

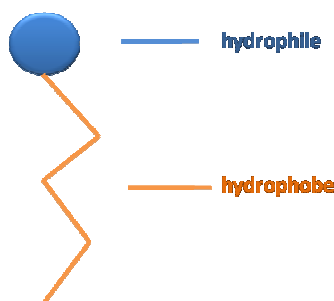


Figure III.4. Schématisation d'un tensioactif avec partie hydrophobe et partie hydrophile.

La partie hydrophobe ou apolaire est composée d'une ou plusieurs chaînes aliphatique(s). Le caractère plus ou moins hydrophobe de la molécule est notamment fonction du nombre d'atomes de carbone, d'insaturations et de ramifications qui constitue la partie apolaire. La partie hydrophile est souvent constituée d'une tête polaire munie d'un ou plusieurs groupements polaires. On distingue les tensioactifs ioniques (chargés) des tensioactifs non-ioniques (neutres).

Une bonne stabilisation des émulsions passe par le choix approprié du tensioactif associé à l'application envisagée.

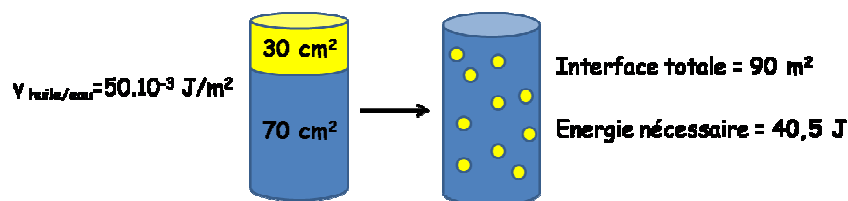
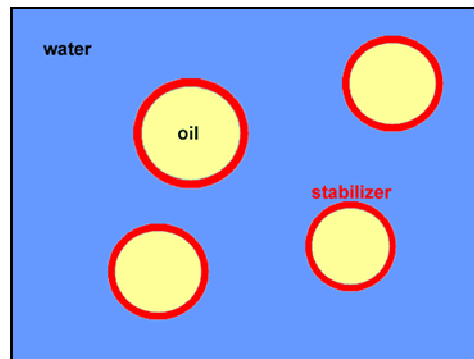


Figure III.5. Illustration du phénomène lié à l'adsorption des tensioactifs aux interfaces. A gauche, l'état démixé et à droite, l'état dispersé.

Comme illustré sur la figure III.5., lorsque deux milieux de polarité différente (exemple de l'huile dans l'eau) sont mis en contact, le composé de densité plus faible migre vers la surface et les deux phases

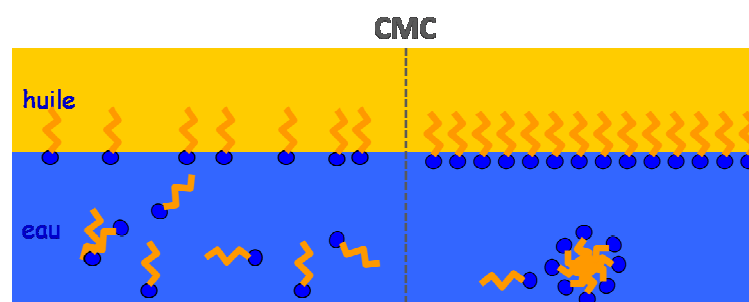
vont se séparer, c'est la démixtion. En homogénéisant le mélange par apport d'énergie une dispersion est formée, la surface totale séparant les deux phases non miscibles est alors augmentée. La présence de tensioactifs est indispensable pour stabiliser la dispersion et éviter une nouvelle démixtion.

La nature amphiphile de ces molécules leur confère des propriétés d'agents de surface : elles se placent spontanément à l'interface de solvants de différentes polarités, réduisant ainsi la tension de surface et permettant la dispersion de deux liquides non miscibles (cf. Fig III.6.). L'énergie d'adsorption est de l'ordre de l'énergie thermique  $k_B T$ , ainsi, un équilibre adsorption/désorption se crée. Le tensioactif permet de diminuer la tension interfaciale afin de faciliter l'augmentation de l'aire interfaciale par le processus de dispersion.



**Figure III.6. Localisation du tensioactif à l'interface eau/huile permettant la stabilisation des gouttelettes.**

La dispersion des émulsions est rendue possible car l'énergie interfaciale est abaissée par l'adsorption des molécules tensioactives. La diminution de la tension interfaciale est fonction de la concentration en tensioactif à l'interface et de l'aire occupée par cette molécule. Cette dernière joue le rôle crucial de stabilisation des suspensions afin d'éviter la fusion des gouttelettes d'émulsion. La déstabilisation des émulsions provient de différents phénomènes (coalescence, mûrissement d'Ostwald) conduisant à la démixtion.



**Figure III.7. Illustration de la CMC de molécules de tensioactifs-adsorption aux interfaces.**

Ainsi, les tensioactifs s'adsorbent aux interfaces huile/eau afin de minimiser les tensions interfaciales. Pourtant, au-delà d'une concentration seuil nommée concentration micellaire critique (CMC), l'interface est saturée (cf. Figure III.7.). Les molécules en excès s'associent alors pour former des agrégats aussi appelés micelles. Les chaînes hydrophobes constituent le cœur de la micelle et les têtes hydrophiles sont au contact de l'eau. La forme des micelles est liée à la nature et à la concentration des

tensioactifs, ainsi les agrégats peuvent être sphériques, cylindriques, etc. [Arditty S., 2004] La CMC dépend de la température, de la force ionique du milieu, de la nature des contre-ions, de la charge de la tête polaire et de la longueur des chaînes aliphatiques.

En général, le tensioactif est choisi de manière à ce qu'il ait une bonne affinité pour la phase continue. Par exemple, une dispersion d'huile dans une phase continue aqueuse nécessite un agent à caractère plutôt hydrophile. Cette nature du tensioactif est évaluée de manière empirique à l'aide du concept de balance hydrophile-lipophile (HLB). Le paramètre HLB a été défini par Griffin dans les années 1950, il permet de préciser le caractère hydrophile ou lipophile de l'agent de surface. Les valeurs de HLB sont reportées sur une échelle de valeurs comme sur la figure III.8.

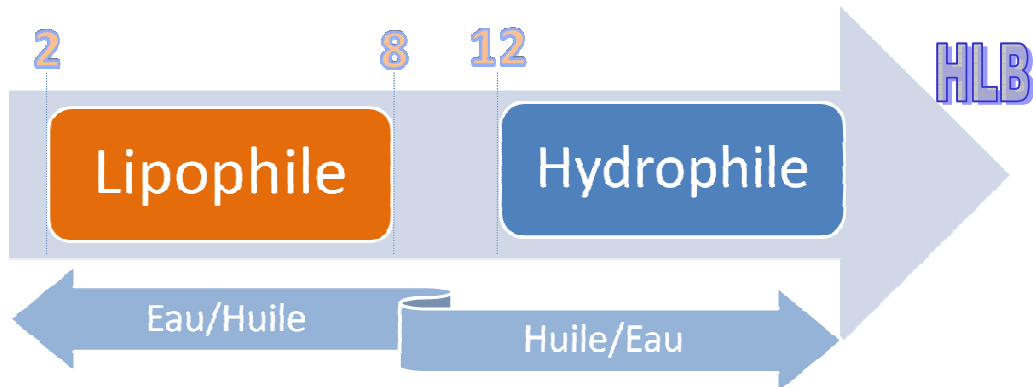


Figure III.8. Echelle HLB.

Pour des émulsions de type eau dans l'huile, les tensioactifs ayant un HLB inférieur à 8 sont préférables. Des tensioactifs de plus forte HLB sont utilisés pour des émulsions de type huile dans l'eau. Par ailleurs, pour faire le bon choix de tensioactif, il faut prendre également en compte le HLB de l'huile.

La notion de courbure spontanée est aussi essentielle dans le choix du tensioactif. Elle résulte de la compétition entre l'attraction hydrophobe des chaînes aliphatiques et les répulsions ioniques et stériques des têtes polaires tendant à optimiser l'aire par tête polaire des molécules amphiphiles. Le paramètre empirique d'empilement critique est une relation géométrique reliant le volume de la chaîne aliphatique ( $v$ ), la longueur de cette chaîne ( $l$ ) et la surface optimale occupée par la tête polaire ( $a_0$ ) du

tensioactif (cf. Figure III.9.) telle que  $P = \frac{v}{l * a_0}$  [Tanford C., 1976 ; Israelachvili J., 1991].

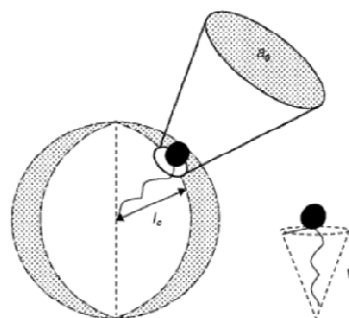
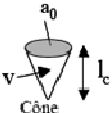


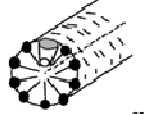

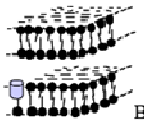




Figure III.9. Illustration du paramètre d'empilement critique [Cosgrove T., 2005].



La valeur de  $P$  est reliée elle-même à la forme du volume occupé par la molécule de tensioactif en solution et conditionne la courbure spontanée d'une interface formée et donc le type de phase créé (cf. fig. III.10.).

$\frac{v}{a_0 l_c}$	$C_0$	Forme de la molécule de tensioactif	Structures formées
$< 1/3$	$>> 0$	 Cône	 Micelles sphériques
$1/3 - 1/2$	$> 0$	 Cône tronqué	 Micelles cylindriques
$\sim 1$	$\sim 0$	 Cylindre	 Bicouche plane
$> 1$	$< 0$	 Cône tronqué inversé	 Micelles inverses

**Figure III.10. Relation entre le paramètre d'empilement critique, la courbure, la forme de la molécule et les structures formées [d'après Arditty S., 2004].**

La courbure spontanée est donc essentiellement fixée par le paramètre de forme  $P$ . Lorsque le tensioactif est préférentiellement liposoluble, la chaîne aliphatique est plus volumineuse que la tête polaire, la courbure spontanée est alors négative ( $C_0 < 0$ ). En revanche, si ce dernier est plutôt soluble dans l'eau, la courbure spontanée est positive.

La HLB, la nature du tensioactif, la force ionique du milieu, la température, le pH de la solution sont les critères à connaître dans le but de trouver l'agent de surface idéal. Dans la suite, nous avons choisi d'étudier trois tensioactifs : le polymère tribloc F127 déjà connu pour stabiliser les Isasomes (cf. § I.2.a), le caséinate de sodium et la lécithine de soja.

Dans le cas des émulsions comme dans le cas des ferrofluides (cf. Chapitre II, § II.1.2.), les gouttelettes dispersées interagissent entre elles *via* la phase continue. Leur stabilisation est le résultat de l'équilibre entre les forces attractives (e.g. force de Van der Waals) et répulsives de types électrostatiques ou stériques. Ces forces vont déterminer l'état d'agrégation de ces particules semi-solides. Néanmoins, d'autres facteurs auront pour effet d'accélérer ou de ralentir ce phénomène de déstabilisation ou de destruction des émulsions.

### III.2.1.c. Effet de l'émulsifiant sur la taille des émulsions et leur stabilité

Selon la nature réversible ou irréversible du phénomène, deux types d'instabilités sont définis. La floculation et la pesanteur entraînent une répartition non homogène des gouttelettes de phase dispersée sans réduire la quantité d'interface entre les deux phases. L'agitation permet alors généralement de redisperser les gouttes. Par exemple, le phénomène de crémage est dû à la différence de densité entre l'huile et l'eau, les gouttes d'huile migrent vers le haut, conséquence directe de la poussée d'Archimède. La vitesse de ce processus peut être limitée en réduisant la taille des gouttelettes, en diminuant la différence de masse volumique entre les deux phases ou en augmentant la viscosité de la phase continue.

La destruction de l'émulsion est attribuée au mûrissement d'Ostwald et à la coalescence. Le mûrissement d'Ostwald se traduit par la diminution du diamètre des petites gouttes au profit des plus grosses jusqu'à leur disparition complète. La coalescence est quant à elle un mécanisme par lequel deux gouttes adjacentes de phase dispersée fusionnent de manière irréversible. Elle implique la rupture du film de tensioactif séparant les deux gouttelettes. Cette rupture peut être causée par la nature du tensioactif et/ou une quantité insuffisante en tensioactif ce qui rend le film très instable.

Pour pallier les phénomènes d'instabilité, la nature des agents de surface va avoir un rôle prépondérant. Plusieurs facteurs peuvent influencer la stabilité des émulsions : tout d'abord, la concentration surfacique ou le taux de couverture de la surface des gouttelettes (moins la surface est couverte, plus la coalescence est rapide), puis l'épaisseur de la couche surfacique (plus la couche de tensioactif adsorbée est épaisse, moins les particules auront de contact proche entre elles). Ainsi, la présence d'émulsifiant de faible poids moléculaire va fragiliser l'interface.

Le F127, la lécithine de soja et le caséinate de sodium (NaCas) sont des tensioactifs permettant de stabiliser des émulsions de type huile dans l'eau.

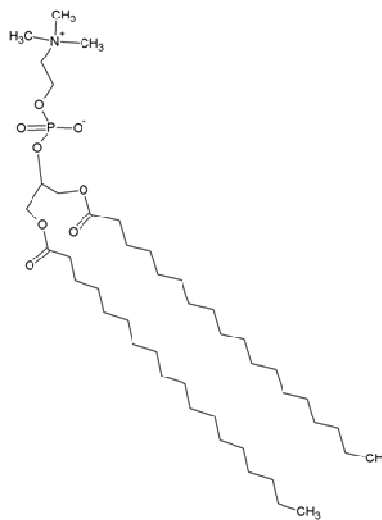
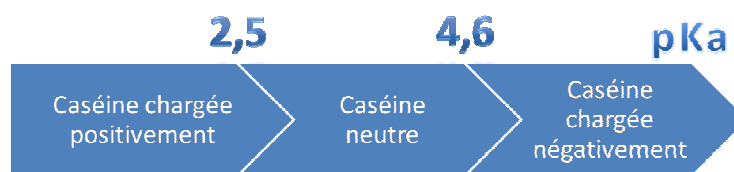


Figure III.11. Molécule de lécithine de soja.

La lécithine est une phosphatidylcholine (figure III.11.), c'est-à-dire un phospholipide formé à partir d'une choline, d'un phosphate, d'un glycérol et de deux chaînes aliphatiques d'acide gras. Elle possède une tête hydrophile constituée de la choline et du groupement phosphate, et une partie

hydrophobe. La lécithine est zwitterionique, la choline est chargée positivement tandis que le groupement phosphate est chargé négativement. Il existe plusieurs types de lécithine dont un type présent naturellement dans l'organisme au niveau des membranes cellulaires et du métabolisme cellulaire. Cela en fait un tensioactif biocompatible, très utilisé dans les préparations culinaires ou cosmétiques. La lécithine de soja est une lécithine naturelle, contrairement aux lécithines synthétiques, elle ne contient que des acides gras insaturés.

Le NaCas est une protéine extraite du lait qui peut être utilisée comme un tensioactif. Le lait est composé de 87% d'eau et de 13% de matières sèches. Les matières sèches sont formées elles-mêmes de 36% de glucides, 29% de matières grasses, 10% de matière saline et de 25% de matière azotée protéinique. La matière azotée protéinique comporte 80% de caséines, molécules amphiphiles qui ont été testées dans le cadre de cette étude. Selon le pKa, la caséine peut être chargée positivement, négativement ou être neutre.



**Figure III.12. Charge de la caséine en fonction du pKa.**

Les caséines se trouvent dans le lait sous forme d'un complexe de diverses caséines liées à du phosphate de calcium colloïdal. Ces protéines sont sensibles au pH du milieu. Lorsque le milieu est acidifié à  $\text{pH} < 4,6$ , les protéines coagulent et se séparent de la phase aqueuse. Les poudres de caséinate sont obtenues par précipitation du lait à  $\text{pH} = 4,6$ . Le caséinate de sodium (Sigma-Aldrich) est un mélange des caséines  $\alpha_{s1}$ ,  $\alpha_{s2}$ ,  $\beta$  et  $\kappa$ . Sa masse molaire moyenne est de 23,3 kDa. Il jouera à la fois le rôle d'émulsifiant et d'épaississant car il augmente la viscosité de la phase aqueuse.

Dans cette étude, les Isasomes ont été choisis pour leur capacité de stockage des molécules de PA, leur propriété thermosensible assez particulière (changement de structure) et leur très grande interface eau/huile. Dans un premier temps, la stabilité des suspensions d'Isasomes a été caractérisée en fonction du temps pour les trois différents tensioactifs.

Le lipide utilisé est un mélange commercial, le Dimodan® U/J (DU) provenant de DANISCO A/S, essentiellement à base de monoglycérides, voici sa composition :

- 96% de monoglycéride dont 62% de linoléate (monolinoléine) ;
- Diglycérides ;
- Acides gras.

Le DU étant un lipide alimentaire, aucune toxicité particulière n'est à signaler. Les dispersions ont été préparées en mélangeant tous les composants de l'émulsion -DU, *R-(+)-limonène*, émulsifiant, eau- à température ambiante de manière à ce que la phase hydrophobe représente 1% de la masse totale de l'émulsion. L'énergie nécessaire à la fragmentation de la mésophase en Isasomes est apportée par

intermittence d'une seconde à l'aide d'une sonde à ultrasons (Vibracell, Fischer Bioblock) de fréquence 20 kHz réglée à 30% de sa puissance maximale (500 Watt) pendant 10 minutes. L'étude de la stabilité des émulsions dans le temps s'est faite pour une quantité d'émulsifiant correspondant à  $\beta 8$  et s'est portée sur deux types d'Isasomes : des microémulsions émulsifiées (EME) à  $\delta 50$ , et des hexosomes à  $\delta 85$ . L'évolution du diamètre hydrodynamique moyen des gouttelettes d'émulsions a été suivie pendant plus de 2 mois par diffusion dynamique de la lumière à l'aide d'un granulomètre laser (Nanosizer, Malvern).

La diffusion de lumière dynamique est une méthode de caractérisation indirecte des tailles et non invasive ; elle permet de mesurer le diamètre de particules compris entre 10 et 500 nm. Le principe repose sur la mesure de la diffusion Brownienne des particules dans le solvant de viscosité  $\eta$  afin de pouvoir déterminer leur diamètre grâce à l'équation de Stokes-Einstein pour des faibles concentrations. Cette diffusion dépend directement du mouvement Brownien des particules, c'est-à-dire de leur déplacement aléatoire et irrégulier dû aux chocs avec les molécules de solvant. Pour éviter les mouvements de convection et n'avoir que du mouvement Brownien, la température est maintenue constante tout au long de la mesure et l'échantillon est laissé au repos 10 minutes avant chaque mesure. Chaque particule ne diffuse pas la même intensité selon sa forme et sa taille. Dans le cas de particules sphériques, la taille peut alors être directement reliée au coefficient de diffusion, dans un régime dilué, grâce à l'équation de Stokes-Einstein :

$$R_H = \frac{kT}{6\pi\eta D}$$

où  $R_H$  est le rayon hydrodynamique,  $k_B$  la constante de Boltzmann ( $k_B = 1,38.10^{-23} \text{ J.K}^{-1}$ ),  $T$  la température (K),  $\eta$  la viscosité du fluide (Pa.s) et  $D$  le coefficient de diffusion ( $\text{m}^2.\text{s}^{-1}$ ).

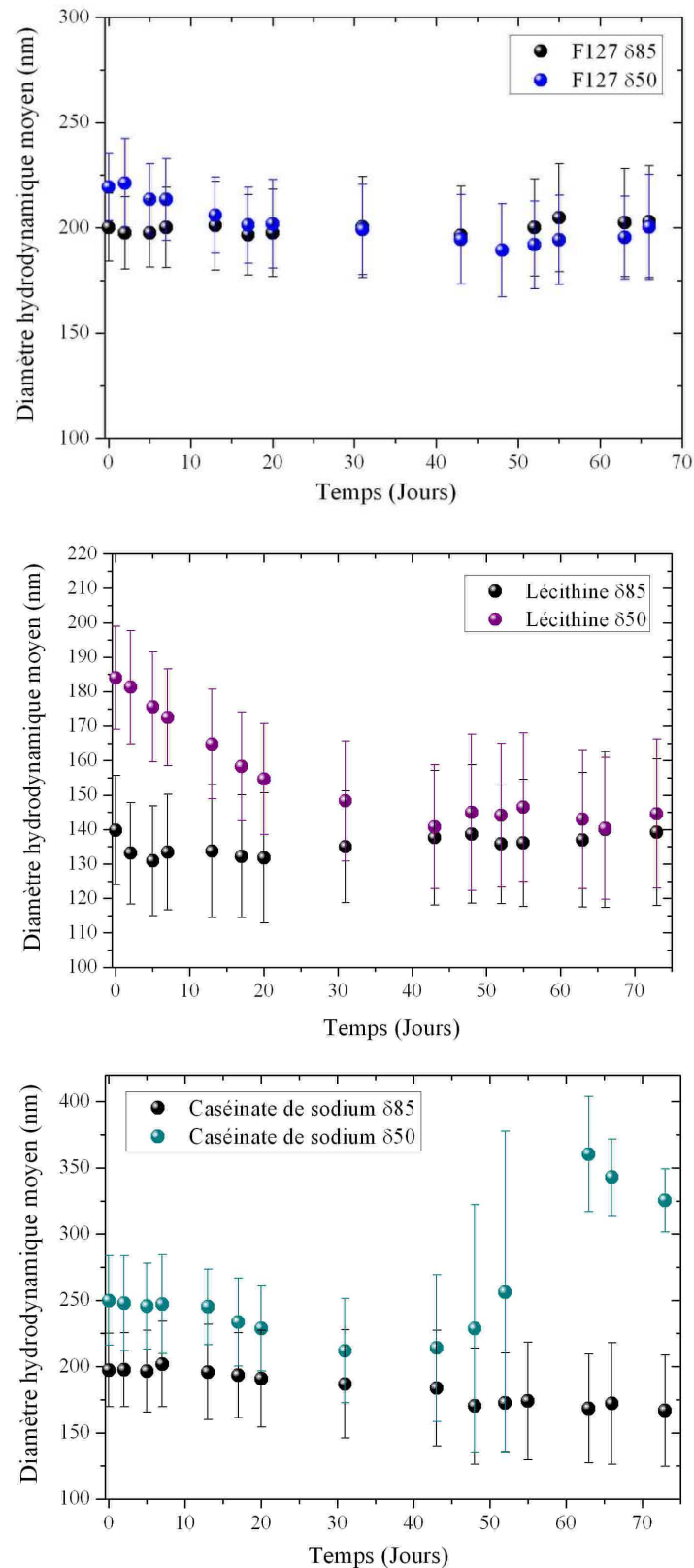
La fonction d'autocorrélation est moyennée sur 10 mesures. L'ajustement de cette fonction permet d'obtenir la distribution des rayons hydrodynamiques grâce à un calcul numérique de la transformée de Laplace inverse. Le résultat est un histogramme de l'occurrence des particules en fonction de leur taille. Les résultats en intensité ont été reportés sur les graphes de la figure III.13.

Les émulsions ont un rôle primordial dans cette étude, elles protègent le PA en le maintenant confiné à l'intérieur de leur structure. La nature des émulsions et leur taille submicronique permettent de solubiliser une grande quantité de molécules de diverses polarités dans un environnement très local. Il est donc important de contrôler leur stabilité dans le temps. Celle-ci a été suivie pour différents émulsifiants.

Le F127 permet une stabilisation purement stérique des dispersions puisque ce copolymère tribloc est neutre. Ce tensioactif s'adsorbe aux interfaces des Isasomes par sa partie hydrophobe composée d'unités PPO, et offre une très bonne stabilité des émulsions dans le temps comme le montre la figure III.13. Le diamètre hydrodynamique moyen des gouttelettes d'émulsions stabilisées par le F127 est de l'ordre de 200 nm à  $\delta 50$  et à  $\delta 85$  et ne fluctue pratiquement pas au cours du temps.

A  $\delta 50$ , pour les émulsions stabilisées par la lécithine, la diminution en taille le premier mois suggère une réorganisation de la distribution en taille des Isasomes jusqu'à atteindre un diamètre moyen de

150 nm qui demeure stable dans le temps. A  $\delta 85$ , le diamètre moyen des particules n'évolue pas au cours du temps, il est de 140 nm environ.



**Figure III.13. Stabilité dans le temps des Isasomes à  $\delta 50$  et à  $\delta 85$  avec le F127, la lécithine de soja et le caséinate de sodium.**

Dans le cas du caséinate de sodium, les émulsions sont stables le premier mois. Après 50 jours, on observe une forte évolution de la taille des Isasomes pour  $\delta 50$ . Il est possible que cette coalescence soit induite par le fort crémage de ces émulsions. En effet, la densification locale des gouttes par crémage augmente les interactions de surface et donc la probabilité de coalescence. C'est particulièrement le cas à  $\delta 50$  qui est une dispersion de phase micellaire qui peut être déstabilisée plus facilement qu'une phase hexagonale.

### III.2.1.d. Effet de l'émulsifiant sur la structure interne des Isasomes

L'utilisation de différents émulsifiants peut également induire un changement de la structure interne. Dans notre étude, le type de mésophase émulsifiée a été sondé par diffusion de rayonnement X aux petits angles (SAXS) au Synchrotron Delta de Dortmund en Allemagne (cf Annexe B).

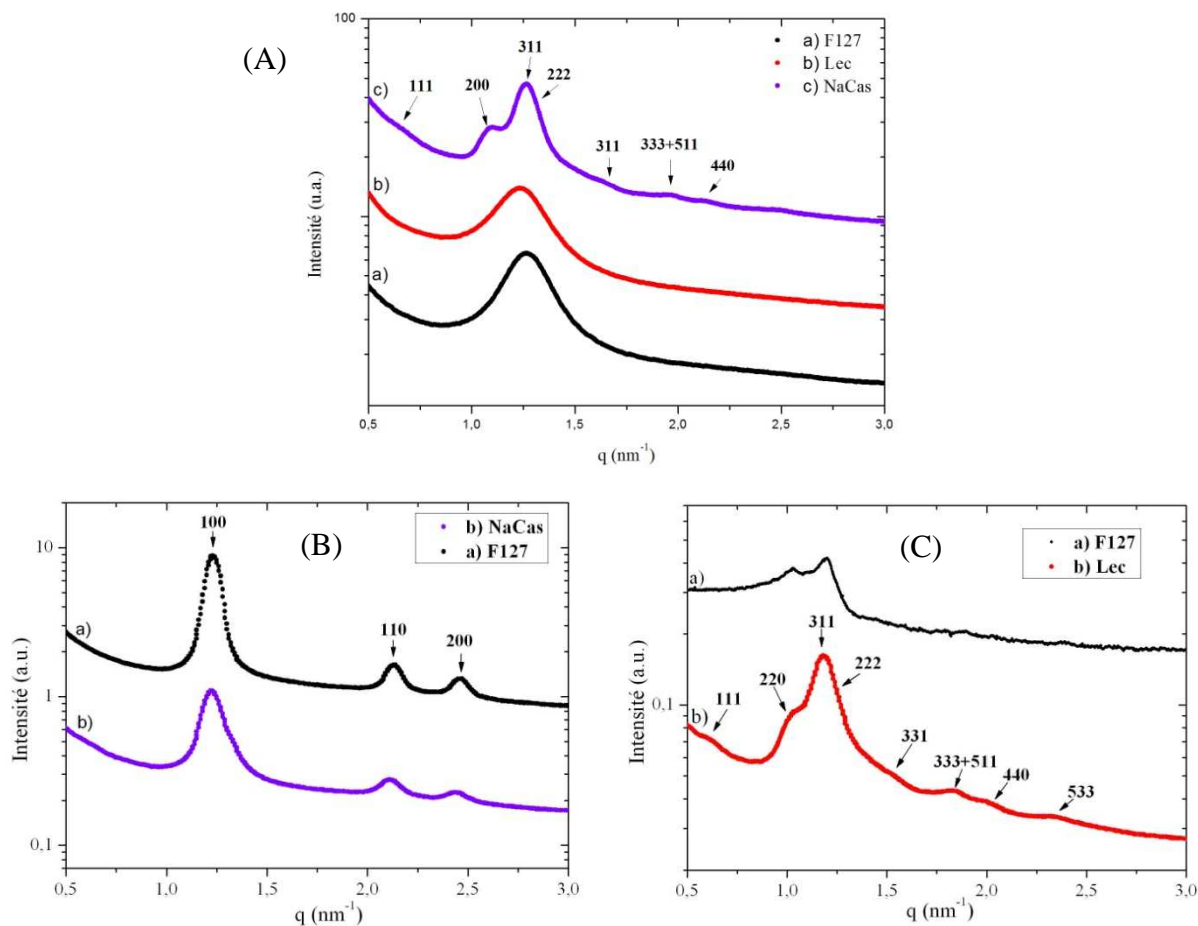
Les intensités diffusées ont été comparées aux intensités issues des émulsions stabilisées par le F127 dont le diagramme de phase est connu (cf. Figure III.3.(B)). Les dispersions ont été préparées à 5% en masse dans l'eau à  $\delta 50$  pour les trois tensioactifs,  $\delta 85$  pour le NaCas et le F127 et  $\delta 70$  pour la lécithine, la composition massique de chaque mélange est donnée dans le tableau III.1.

	Eau	DU	R-(+)-limonène	Emulsifiant
<b><math>\delta 50</math></b>	9,5g	0,2313g	0,2313g	0,0375g
<b><math>\delta 85</math></b>	9,5g	0,3931g	0,0694g	0,0375g
<b><math>\delta 70</math></b>	9,5g	0,3238g	0,1388g	0,0375g

Tableau III.1. Composition en masse de chaque émulsion à 5% dans l'eau pour différents  $\delta$  à  $\beta 8$ .

A  $\delta 50$ , les dispersions stabilisées par la lécithine ou le F127 sont des microémulsions émulsifiées contrairement au NaCas qui montre que les Isasomes sont déjà très structurés dès  $\delta 50$ . En effet, les pics de Bragg caractéristiques d'une phase cubique associée au groupe d'espace  $Fd\bar{3}m$  sont observés et indexés sur la figure III.15.(A). Nous en avons déduit un paramètre de maille de 16,5 nm.

A  $\delta 70$  avec la lécithine de soja, des Isasomes en phase micellaire cubique sont obtenus comme les dispersions stabilisées par le F127. A  $\delta 85$ , le remplacement du F127 par le NaCas ne provoque pas de changement de structure interne, les pics de la phase hexagonale sont indexés sur le spectre. Néanmoins, sur la figure III.15.(B) du NaCas, un épaulement est visible sur le pic du premier ordre qui pourrait correspondre à un mélange de phase hexagonale avec une phase micellaire cubique. De plus, les pics hexagonaux apparaissent légèrement à plus petits  $q$  pour le NaCas que le F127 donnant un paramètre de maille légèrement plus grand.



**Figure III.15. Influence de l'émulsifiant sur la structure interne à  $\beta 8$ , pour  $\delta 50$  (A),  $\delta 70$  (C) et  $\delta 85$  (B) à température ambiante ( $T=26,5^\circ\text{C}$ ).**

Il apparaît donc que le NaCas peut modifier drastiquement la structure interne en comparaison des autres émulsifiants. Ceci se comprend en considérant que le NaCas est un mélange de protéines qui peuvent s'insérer dans la structure de l'Isasome et ainsi modifier le paramètre d'empilement critique dans le sens d'une courbure moins négative, d'où la structuration à des plus faibles  $\delta$ .

	$\delta 50$	$\delta 70$	$\delta 85$
<b>F127</b>	<b>Microémulsion</b>	<b>Micellaire cubique</b>	<b>Hexagonal</b>
<b>Lécithine de soja</b>	<b>Microémulsion</b>	<b>Micellaire cubique</b>	
<b>NaCas</b>	<b>Micellaire cubique</b>		<b>Hexagonal</b>

**Tableau III.2. Récapitulatif des structures internes identifiées dans notre système en fonction de  $\delta$  pour  $\beta 8$  (émulsion à 5% dans l'eau).**

### III.2.2. Encapsulation de nanoparticules magnétiques hydrophobes dans les Isasomes

Dans notre système, nous voulons tirer avantage des transitions structurales qui ont lieu au sein des Isasomes par variation de la température pour expulser des molécules de PA hors de ces gouttelettes d'émulsion. La quantité de PA solubilisé dans l'émulsion varie en fonction de la structure

qui contient plus ou moins d'eau et d'interfaces [Salonen A. *et al.*, 2007]. Dans le système de délivrance envisagé ici, la température locale est contrôlée par la capacité des oxydes de fer nanométriques à s'échauffer par application d'un champ magnétique externe. Des NPM hydrophobes ont donc aussi été confinées dans les émulsions (en plus d'être présentes dans la matrice de l'hydrogel) afin que l'échauffement soit homogène dans l'ensemble de l'échantillon. La possibilité de polymériser un certain type d'Isasomes a permis de visualiser ce confinement au MET. Par ailleurs, ces gouttelettes d'émulsion ou particules de PS solides magnétiques s'avèrent être des systèmes intéressants pour des applications en guidage magnétique.

### III.2.2.a. Choix du PA et influence du PA sur la structure des émulsions

Le PA utilisé dans cette étude est un radical<sup>2</sup> nitroxyde qui peut être suivi par RPE. Ce radical est le 2,2,6,6-tétraméthyl-piperidin-1-oxy, de formule chimique  $(\text{CH}_2)_3(\text{CMe}_2)_2\text{NO}$ , plus communément appelé TEMPO (cf. fig. III.25.).

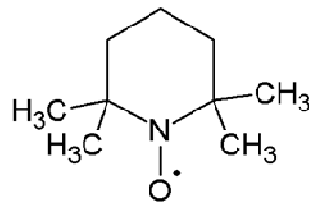


Figure III.25. Schéma d'une molécule de TEMPO.

Le TEMPO est un composé de la famille des nitroxydes (NO), radicaux très stables qui selon les groupements qu'ils comportent peuvent être hydrophile, hydrophobe ou amphiphile. Du fait de sa stabilité, cette molécule est très utilisée en combinaison de la RPE en tant que sonde environnementale pour les systèmes modèles biologiques [Subczynski W. K. *et al.*, 1994 ; Dixon N. *et al.*, 2004], en tant que médiateur dans l'étude des réactions de polymérisation radicalaire contrôlée [Gromadzki D. *et al.*, 2008 ; Karatzas A. *et al.*, 2009 ; Siu K. *et al.*, 2009] ou encore en tant que piège à radicaux libres [Lapchak P. A. *et al.*, 2001 ; Castagna R. *et al.*, 2009 ; Dobbs A. P. *et al.*, 2009]. Ces méthodes d'analyse consistent à placer les radicaux stables dans le système à étudier, que ce soit en les liant chimiquement à une molécule d'intérêt ou en les dissolvant juste dans le système. Elles agissent alors comme des sondes de spin ou « *spin-probe* ». Du fait que la plupart des milieux sont diamagnétiques, la signature RPE des groupements NO est caractéristique sur un spectre RPE.

L'ajout de composants supplémentaires aux Isasomes peut modifier la structure interne des gouttelettes, selon la concentration introduite ou simplement s'intégrer dans la structure en faisant juste évoluer le paramètre de maille [Seddon J. M. *et al.*, 1996 ; Guillot S. *et al.*, 2006 ; Yaghmur A. *et al.*, 2006 ; Uyama M. *et al.*, 2009 ; Amar-Yuli I. *et al.*, 2009]. Notre intérêt se portant sur l'utilisation des transitions de phase du système par variation de la température, il est donc essentiel de caractériser la structure initiale des Isasomes à l'ajout des divers composants de ce système. Le

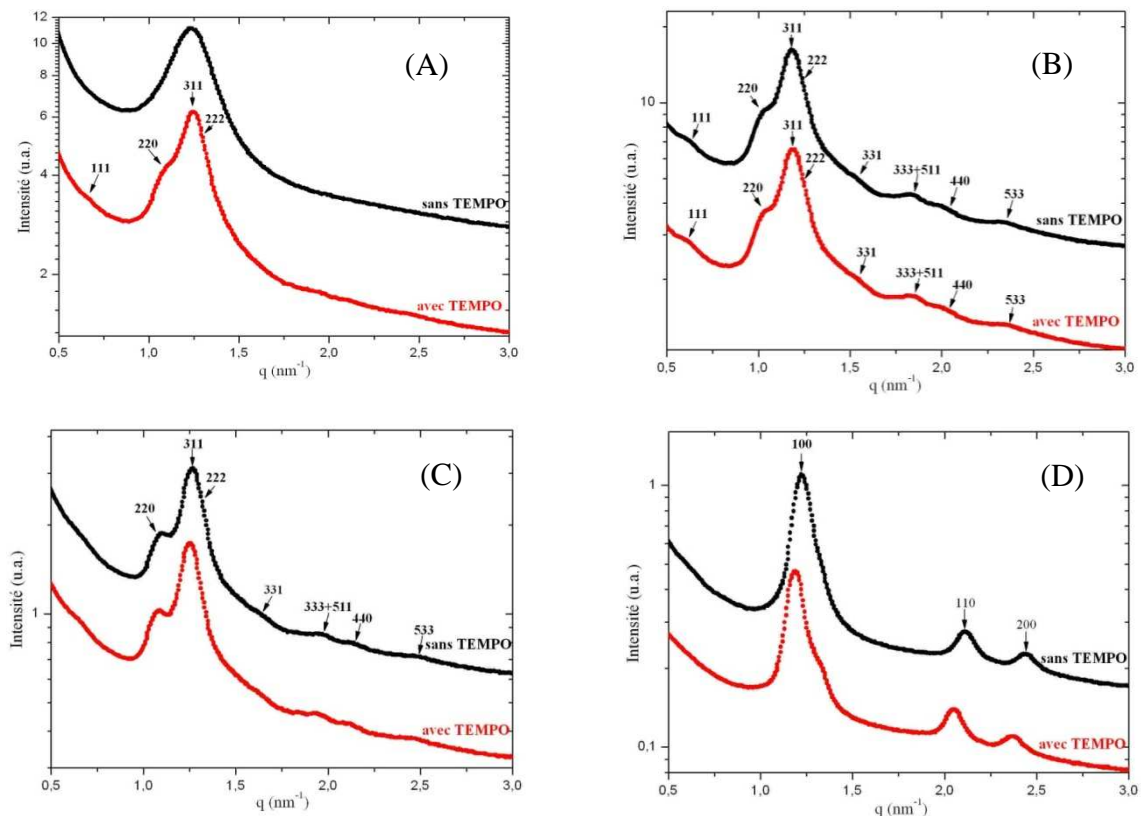
<sup>2</sup> Un radical ou radical libre est une entité chimique possédant un ou plusieurs électrons non-appariés sur sa couche externe. La plupart des radicaux libres sont très instables et donc très réactifs.



TEMPO est préalablement solubilisé dans le R-(+)-limonène à une concentration de  $3,3 \times 10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$ . Cette huile contenant le radical NO est ensuite ajoutée au DU pour préparer les Isasomes à 5% dans la phase continue à la valeur voulue de  $\delta$ .

Pour un mélange stabilisé par la lécithine à  $\delta 85$  avec TEMPO, l'émulsification n'a pas pu se faire. Un agglomérat hydrophobe s'est en effet formé dans la phase continue. Ce phénomène n'a pas eu lieu à  $\delta 70$  pour laquelle l'émulsification a réussi, nous avons donc poursuivi l'étude du confinement à  $\delta 70$ . La réussite de l'émulsification avec TEMPO stabilisée par le NaCas indique une interaction forte entre la lécithine et le TEMPO lorsque la quantité d'huile est réduite ( $\delta 85$ ).

Les figures suivantes représentent les résultats de diffusion X obtenus avec ou sans TEMPO pour les deux tensioactifs utilisés.



**Figure III.26. Intensités diffusées par des émulsions stabilisées par la lécithine de soja à  $\delta 50$  (A) et  $\delta 70$  (B) avec et sans TEMPO et stabilisées par la NaCas à  $\delta 50$  (C) et  $\delta 85$  (D).**

Sur la figure III.26., l'ajout du TEMPO au système DU/R-(+)-limonène influe fortement sur la structure interne des Isasomes à  $\delta 50$  pour les émulsions stabilisées par la lécithine de soja. En effet, le PA solubilisé dans la phase hydrophobe provoque la transformation d'une microémulsion émulsifiée à des cubosomes micellaires caractérisés par le groupe d'espace  $Fd\bar{3}m$ , dont les pics caractéristiques connus de cette structure sont annotés sur l'intensité diffusée (cf. fig.III.26.(A)). La position du TEMPO dans la structure agit donc sur le paramètre d'empilement critique. L'effet structurant du TEMPO dans le système MLO/R-(+)-limonène est la conséquence d'une variation de la courbure moyenne rendue moins négative. Le radical ne semble donc pas contribuer au volume hydrophobe des

chaînes aliphatiques (zone très hydrophobe) mais il se place plus probablement à l'interface proche des têtes polaires de la MLO (cf chap.I, fig. I.10., position 2).

En revanche, pour les émulsions stabilisées par la lécithine à  $\delta 70$  et pour celles stabilisées par la NaCas à  $\delta 50$  et  $\delta 85$ , les types de structures internes restent inchangés avec ou sans TEMPO. Sur le spectre de la figure III.26.(D), l'épaule de la possible sur-structure (contribution possible de la phase cubique bicontinue proche) est légèrement plus prononcée pour l'émulsion à  $\delta 85$  intégrant du TEMPO.

	Sans TEMPO	Avec TEMPO
Lécithine/ $\delta 50$	EME/5,07 nm	$Fd\bar{3}m$ / 16,7 nm
Lécithine/ $\delta 70$	$Fd\bar{3}m$ / 17,63 nm	$Fd\bar{3}m$ / 17,51 nm
NaCas/ $\delta 50$	$Fd\bar{3}m$ / 16,41 nm	$Fd\bar{3}m$ / 16,64 nm
NaCas/ $\delta 85$	$H_2$ / 5,94 nm	$H_2$ / 6,11 nm

**Tableau III.3. Paramètre de maille et distances caractéristiques des mésophases émulsifiées avec ou sans TEMPO.**

Les paramètres de maille pour la phase cubique ont été calculés à partir du pic de Bragg le plus intense, ils sont obtenus à partir de la relation  $a = d\sqrt{(h^2 + k^2 + l^2)}$  avec la distance interréticulaire  $d = \frac{2\pi}{q}$ . Pour la phase hexagonale, on a  $a = \frac{2}{\sqrt{3}}d\sqrt{(h^2 + k^2 + h.k)}$ . Pour les émulsions à  $\delta 50$  et  $\delta 85$  stabilisées par le NaCas, le paramètre de maille augmente lorsque le TEMPO est dissous dans la phase huile. Le paramètre de maille est connu pour augmenter avec le paramètre  $\delta$ . Ce résultat est donc en accord avec la courbure négative qui décroît par adjonction de TEMPO. Pour confirmer ce phénomène, il aurait été intéressant de faire une étude en fonction de la concentration en radical dans l'huile.

### III.2.2.b. Effet du confinement des NPM sur la structure interne des émulsions

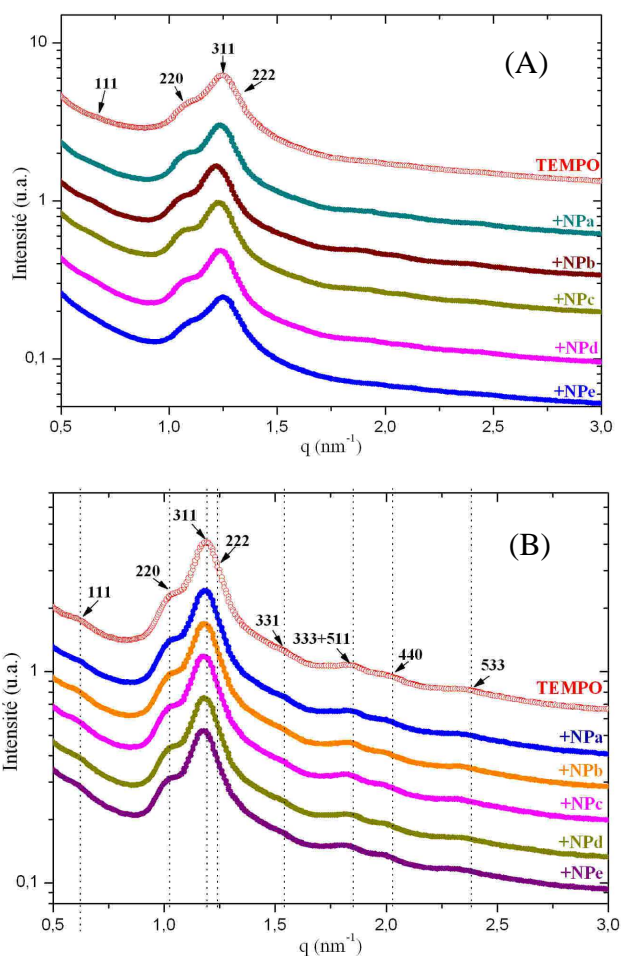
L'incorporation de NPM de 6 nm de diamètre, enrobées d'acide oléique, dans la phase hydrophobe de l'émulsion est une étape importante qui pourrait entraîner des modifications de la structure interne.

Le TEMPO ( $3,3 \times 10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$ ) et les NPM sont préalablement incorporés dans le R-(+)-limonène. L'huile et le DU sont ensuite mélangés en proportion désirée (paramètre  $\delta$ ) et dispersés à une fraction massique de 5% dans l'eau. Pour étudier l'effet des NPM sur la structure interne des émulsions, différentes concentrations (notées de NPa à NPe sur les graphes suivants) ont été utilisées : elles sont données dans le tableau III.4.

Echantillons	$C_{\text{NPM}} \text{ mère (mg/mL)}$	$C_{\text{NPM}} \delta 50 \text{ (mg/mL)}$	$C_{\text{NPM}} \delta 70 \text{ (mg/mL)}$	$C_{\text{NPM}} \delta 85 \text{ (mg/mL)}$
<i>NPa</i>	0,289	0,1445	0,0867	0,0434
<i>NPb</i>	0,578	0,289	0,1734	0,0867
<i>NPc</i>	0,867	0,4335	0,26	0,13
<i>NPd</i>	1,156	0,578	0,3468	0,1734
<i>NPe</i>	1,445	0,7225	0,4335	0,2168

**Tableau III.4. Concentration en NPM dans la phase hydrophobe. La concentration mère représente la concentration initiale en NPM dispersée dans le R-(+)-limonène avant préparation des dispersions à différents  $\delta$ .**

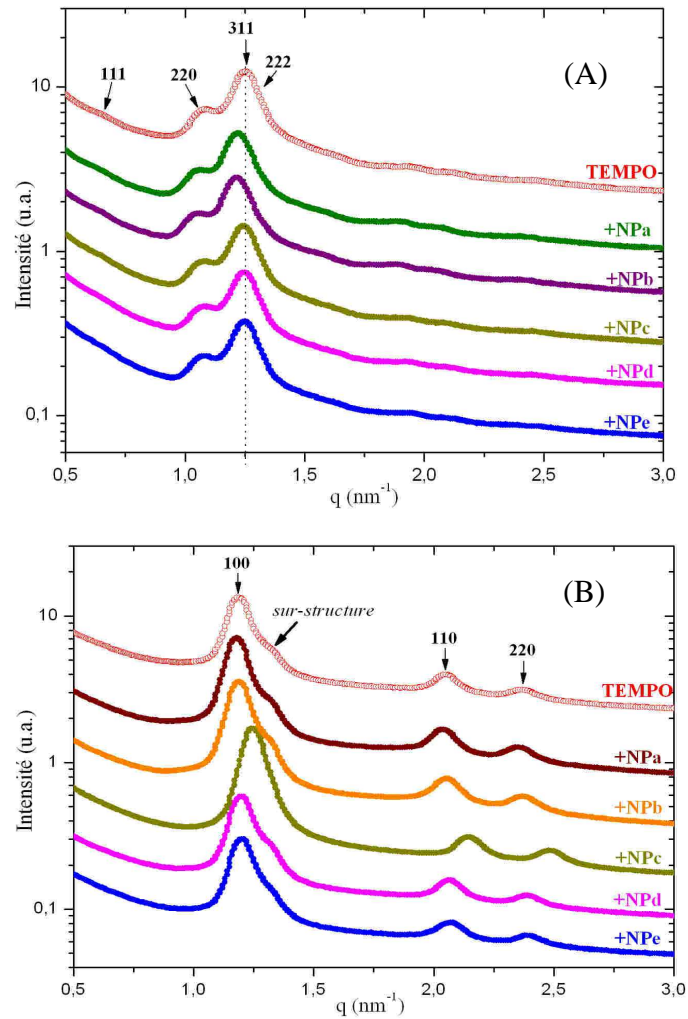
Ces échantillons ont été analysés par diffusion des rayonnements aux petits angles. Les résultats sont regroupés sur les figures III.27. et III.28.



**Figure III.27. Intensité diffusée (SAXS) pour des émulsions stabilisées par la lécithine à  $\delta 50$  et  $\delta 70$  avec TEMPO pour différentes concentrations de NP.**

L'ajout de NPM hydrophobes dans la phase dispersée n'entraîne apparemment aucun changement dans la structure interne des Isasomes et ne modifie pas la position des pics de Bragg (c'est-à-dire le paramètre de maille). A  $\delta 50$  et à  $\delta 70$  pour les émulsions stabilisées par la lécithine, les pics caractéristiques du groupe d'espace  $Fd\bar{3}m$  sont présents. De même, sur les spectres de la figure III.28. (A) et (B), quelle que soit la concentration en NP, nous conservons une phase micellaire

cubique pour les émulsions à  $\delta 50$  et une phase hexagonale à  $\delta 85$  avec le NaCas. Concernant les émulsions à  $\delta 85$ , comme précédemment, nous remarquons un mélange de structure caractérisé par un épaulement résiduel sur le pic (100) de la phase hexagonale.



**Figure III.28. Intensité diffusée (SAXS) pour des émulsions stabilisées par le NaCas à  $\delta 50$  et  $\delta 85$  avec TEMPO pour différentes concentrations en NP.**

Les paramètres de maille déduits à partir de la position des pics de diffusion aux petits angles sont regroupés dans le tableau III.5.

	Lec $\delta 50$	Lec $\delta 70$	NaCas $\delta 50$	NaCas $\delta 85$
<i>TEMPO</i>	16,70 nm	17,51 nm	16,64 nm	6,11 nm
+NP <i>a</i>	16,87 nm	17,57 nm	17,07 nm	6,16 nm
+NP <i>b</i>	17,18 nm	17,63 nm	17,14 nm	6,10 nm
+NP <i>c</i>	16,85 nm	17,68 nm	16,75 nm	5,84 nm
+NP <i>d</i>	16,74 nm	17,63 nm	16,71 nm	6,05 nm
+NP <i>e</i>	16,57 nm	17,74 nm	16,68 nm	6,05 nm

**Tableau III.5. Influence de la concentration en NPM sur le paramètre de maille.**

Les paramètres de maille sont relativement constants suite à l'ajout des NP dans la dispersion. En conclusion la présence des NPM hydrophobes dans la phase dispersée des émulsions présentées ne semble pas modifier la structure interne des Isasomes. Ceci va dans le sens des observations faites par MET des émulsions polymérisées où les NPM semblaient se disposer à la surface des émulsions.

### III.2.2.c. Effet du confinement sur la taille des émulsions

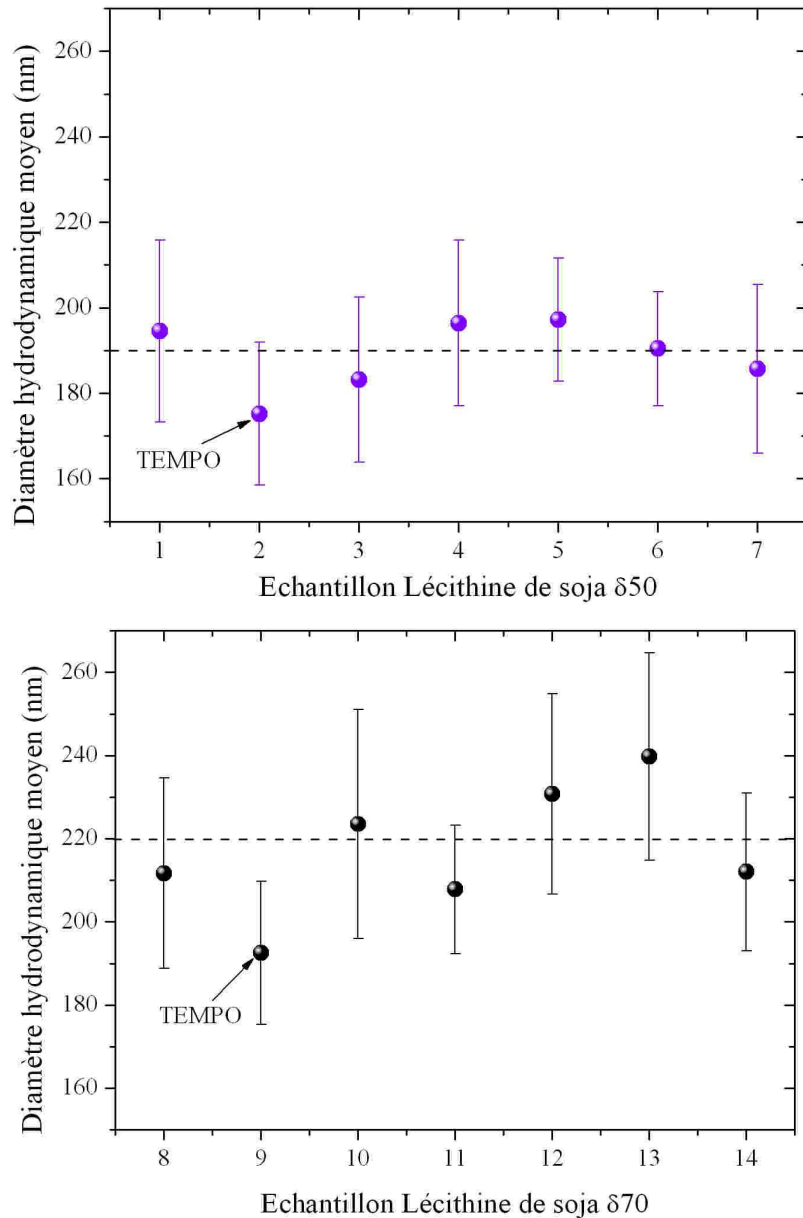
L'influence du confinement des NPM sur le diamètre moyen des gouttelettes d'émulsion a été suivie. L'ensemble des compositions est résumé dans le tableau III.6.

	<i>Composition (<math>\beta</math>8)</i>
1	<b><math>\delta</math>50</b> DU/R-(+)-limonène seuls
2	<b><math>\delta</math>50</b> DU/R-(+)-limonène + TEMPO
3	<b><math>\delta</math>50</b> DU/R-(+)-limonène + TEMPO + NPM à 0,289 mg/mL
4	<b><math>\delta</math>50</b> DU/R-(+)-limonène + TEMPO + NPM à 0,578 mg/mL
5	<b><math>\delta</math>50</b> DU/R-(+)-limonène + TEMPO + NPM à 0,867 mg/mL
6	<b><math>\delta</math>50</b> DU/R-(+)-limonène + TEMPO + NPM à 1,156 mg/mL
7	<b><math>\delta</math>50</b> DU/R-(+)-limonène + TEMPO + NPM à 1,445 mg/mL
8	<b><math>\delta</math>70</b> (lécithine) ou <b><math>\delta</math>85</b> (NaCas) DU/R-(+)-limonène seuls
9	<b><math>\delta</math>70</b> (lécithine) ou <b><math>\delta</math>85</b> (NaCas) DU/R-(+)-limonène + TEMPO
10	<b><math>\delta</math>70</b> (lécithine) ou <b><math>\delta</math>85</b> (NaCas) DU/R-(+)-limonène + TEMPO + NPM à 0,289 mg/mL
11	<b><math>\delta</math>70</b> (lécithine) ou <b><math>\delta</math>85</b> (NaCas) DU/R-(+)-limonène + TEMPO + NPM à 0,578 mg/mL
12	<b><math>\delta</math>70</b> (lécithine) ou <b><math>\delta</math>85</b> (NaCas) DU/R-(+)-limonène + TEMPO + NPM à 0,867 mg/mL
13	<b><math>\delta</math>70</b> (lécithine) ou <b><math>\delta</math>85</b> (NaCas) DU/R-(+)-limonène + TEMPO + NPM à 1,156 mg/mL
14	<b><math>\delta</math>70</b> (lécithine) ou <b><math>\delta</math>85</b> (NaCas) DU/R-(+)-limonène + TEMPO + NPM à 1,445 mg/mL

**Tableau III.6. Composition des échantillons étudiés.**

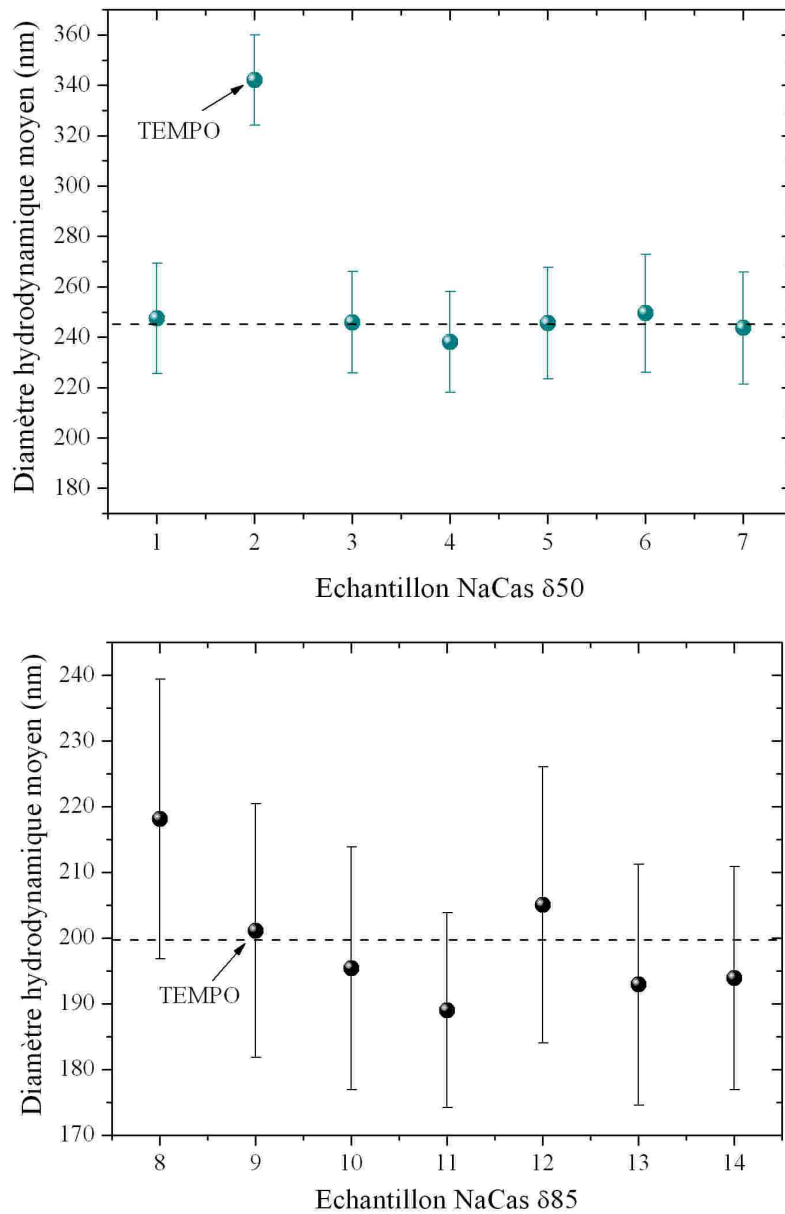
Les émulsions ont été préparées à 5% en masse, une goutte d'émulsion est versée dans une cellule de mesure contenant quelques millilitres d'eau déionisée. La mesure de taille en diffusion dynamique de la lumière est reproduite à cinq reprises, chacune moyennée sur 10 mesures.

Sur la figure III.29., les Isasomes stabilisés par la lécithine de soja ont un diamètre moyen de 190 nm à  $\delta$ 50 et de 220 nm à  $\delta$ 70. Aucune variation significative de la taille n'est observée quelle que soit la concentration en NPM. Néanmoins, une réduction de 20 nm est observée après ajout du TEMPO dans les deux cas de  $\delta$  exposés. Une étude plus détaillée en fonction de la concentration de TEMPO aurait été intéressante afin de conclure sur le rôle du radical sur la taille.



**Figure III.29. Taille la plus probable des émulsions stabilisées par la lécithine à  $\delta 50$  et  $\delta 70$**

Sur la figure III.30., l'ajout de TEMPO dans une dispersion stabilisée par le NaCas provoque une forte augmentation de la taille des Isasomes à  $\delta 50$  (cf échantillons 1 et 2) et le volume est presque multiplié par 2,5 pour une gouttelette. En ajoutant des particules magnétiques dans la phase hydrophobe, ce phénomène s'estompe et les gouttelettes reprennent les tailles mesurées sans TEMPO, c'est-à-dire 245 nm environ. Les NPM contribueraient à la stabilité en taille des émulsions contenant du TEMPO. Il existe donc une interaction forte entre les différents constituants de l'émulsion magnétique qui peut donner des caractéristiques physico-chimiques très différentes selon les concentrations utilisées. A  $\delta 85$ , les résultats en taille obtenus ne permettent pas de conclure quant à l'effet du TEMPO et des NPM hydrophobes.



**Figure III.30. Taille des émulsions stabilisées par le NaCas à δ50 et δ85.**

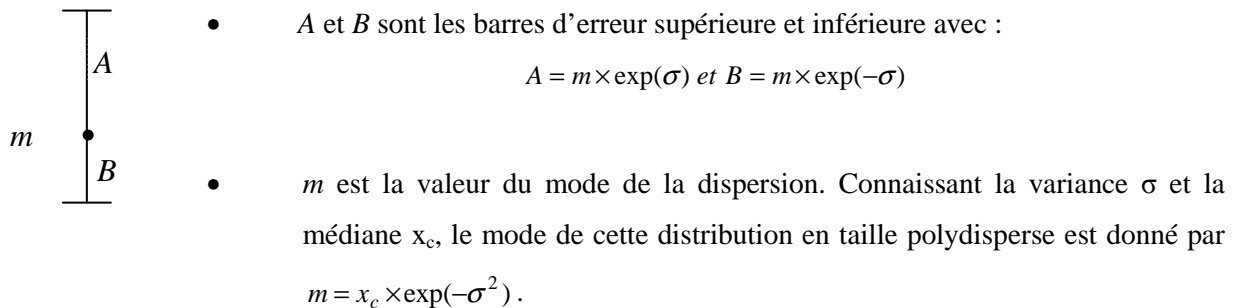
#### **III.2.2.d. Polymérisation des émulsions**

Cette partie du travail avait pour but d'explorer une façon simple et originale de synthétiser des particules de polystyrène (PS) à porosité contrôlée en polymérisant les Isasomes.

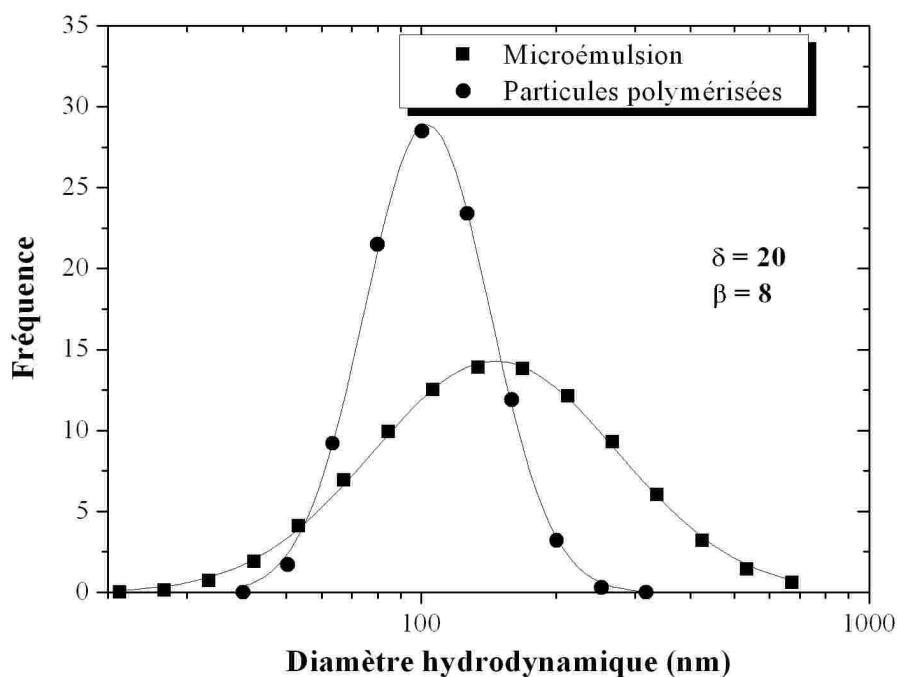
Pour ce faire, le R-(+)-limonène a été remplacé par un monomère hydrophobe polymérisable, le styrène. Les émulsions initiales (avant polymérisation) étaient donc composées d'un mélange de 5% de phase hydrophobe à base de DU/styrène stabilisé par le F127, et dispersé dans 95% d'eau par une sonde à ultrasons pendant 12 minutes à température ambiante. Un photoinitiateur, le 2-hydroxy-2-méthylpropiophénone, a été ajouté au styrène à 7% en masse pour initier la polymérisation par UV. La phase dispersée a été polymérisée à l'aide d'une lampe ultraviolette (UV) à une longueur d'onde de 365 nm pendant deux jours. Nous avons systématiquement mesuré le diamètre hydrodynamique moyen des dispersions avant et après polymérisation à l'aide d'un granulomètre laser. Ces résultats ont été corrélés avec les observations des particules solides par MET.

Les histogrammes obtenus par diffusion de la lumière dynamique ont été ajustés par une loi de distribution de type log-normal permettant d'obtenir la médiane ( $x_c$ ), la variance ( $\sigma$ ) et au mode ( $m$ , valeur maximale du pic).

Les résultats sont présentés sur les graphiques de la figure III.17. ainsi que les barres d'erreur dérivant l'asymétrie d'une loi log-normale. Les barres d'erreur ont été calculées sur la moyenne de chaque distribution en taille grâce aux formules suivantes:



Dans un premier temps, une étude du contrôle en taille des émulsions initiales et des particules de PS résultantes a été menée en faisant varier la quantité de F127 définie par  $\beta$ .



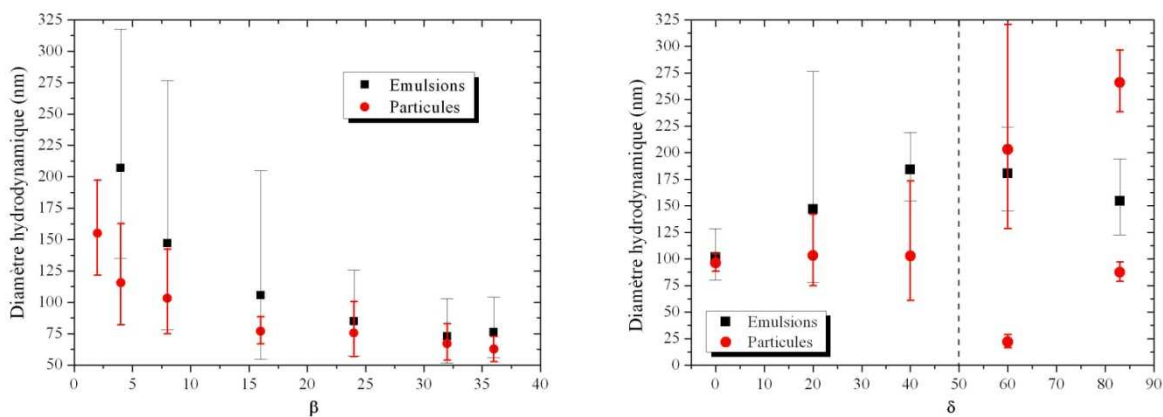
**Figure III.16. Distribution en taille des phases dispersées avant et après polymérisation. On remarque qu'après polymérisation il y a contraction de la taille conformément à ce qu'il a été observé dans le bulk.**

Sur la figure III.16., la distribution en taille avant et après polymérisation à  $\delta 20$  et  $\beta 8$  montre que le diamètre moyen des particules polymérisées est inférieur aux gouttelettes d'émulsion non polymérisées. De plus, la distribution en taille des particules solides apparaît plus étroite que pour l'émulsion. Pour comprendre ce phénomène, des phases non dispersées composées de styrène uniquement ou d'un mélange MLO/styrène ont aussi été polymérisées. Nous observons suite à la polymérisation que le volume occupé par le styrène polymérisé (ou polystyrène) est inférieur au



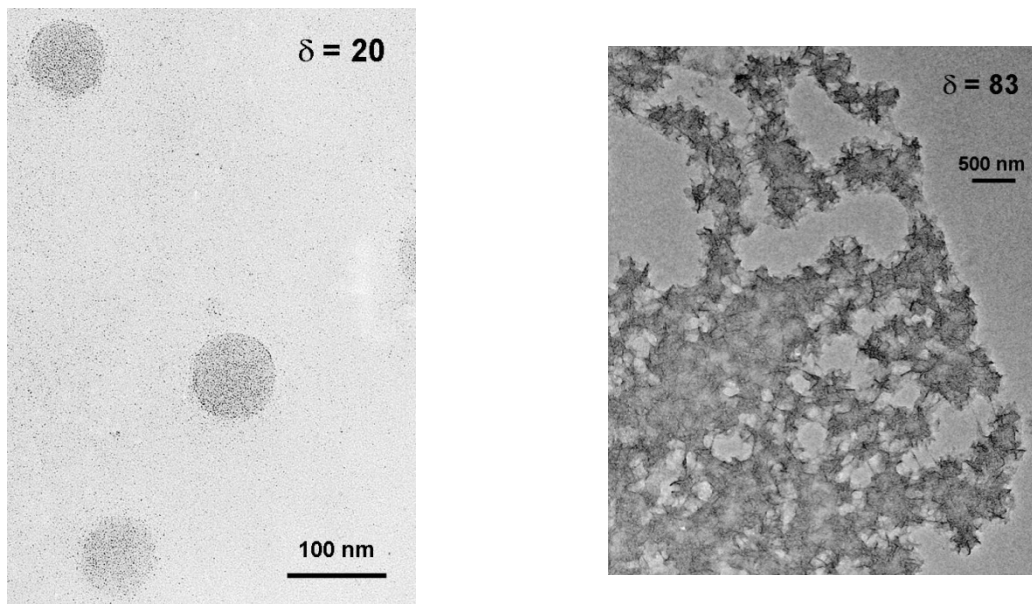
volume occupé par le liquide monomérique avant polymérisation. De plus, lorsque le mélange DU/styrène est polymérisé, une couche visqueuse au-dessus du solide apparaît qui pourrait correspondre à l'expulsion partielle du DU hors de la phase solide. Nous avons donc supposé que la contraction lors de la transition liquide à solide et l'expulsion du DU ont pour conséquence directe une diminution du diamètre moyen des particules après polymérisation.

La figure III.17. de gauche représente l'évolution de la taille moyenne des gouttelettes d'émulsion et des particules solides en fonction du paramètre  $\beta$ . Plus  $\beta$  augmente, c'est-à-dire plus la quantité de F127 est importante, plus le diamètre moyen des particules diminue. Au-dessus de  $\beta 30$ , le diamètre moyen est quasi-constant et inférieur à 60 nm pour les particules de PS. Comme précédemment, la taille des particules après polymérisation est toujours inférieure aux particules avant polymérisation mais elles tendent vers une même valeur aux grandes valeurs de  $\beta$ .



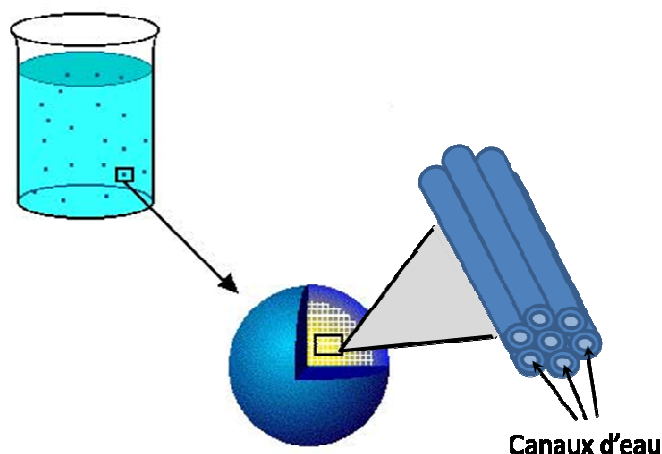
**Figure III.17. Taille des émulsions et des particules polymérisées en fonction de la valeur de  $\beta$  et de la valeur de  $\delta$ . Les barres d'erreur sont issues de l'ajustement par une loi log-normale.**

Par la suite, l'étude a été conduite à  $\beta 8$  pour plusieurs valeurs de  $\delta$  afin de partir d'Isasomes de structures internes différentes (voir le cas des Isasomes à base de R-(+)-limonène offrant un polymorphisme en fonction de  $\delta$ ). Sur le graphique de la figure III.17. de droite, pour des valeurs de  $\delta$  inférieures à 50, c'est-à-dire où la quantité de styrène est supérieure à la quantité de DU, nous observons une seule taille représentative pour les émulsions polymérisées. Par contre, pour les valeurs de  $\delta$  supérieures à 50, les mesures ont révélées des distributions en taille multimodales pour les particules polymérisées. En complément de la diffusion dynamique de lumière, les particules ont été observées par MET pour deux valeurs de  $\delta$  (cf. fig. III.18.).



**Figure III.18. Clichés de MET de particules polymérisées à partir d'Isasomes à  $\delta 20$  et  $\delta 83$  ( $\beta 8$ ).**

Les clichés de MET confirment les résultats précédents. A  $\delta 20$ , les particules sont sphériques avec des tailles monomodales d'environ 100 nm. A  $\delta 83$ , on peut s'attendre à polymériser des particules contenant une phase hexagonale. Cependant, le cliché de MET ne révèle pas de particules homogènes mais des amas d'aiguilles localisés. Ceci s'explique par le fait qu'à  $\delta 83$ , l'émulsion ne contient que 17% de matière polymérisable contre 83% de DU. A cette valeur de  $\delta$ , les gouttelettes d'émulsions contiennent une phase hexagonale composée de canaux d'eau formée à partir de l'auto-assemblage des molécules de MLO schématisé sur la figure III.19. Le styrène ajouté au système se positionne entre ces canaux d'eau.



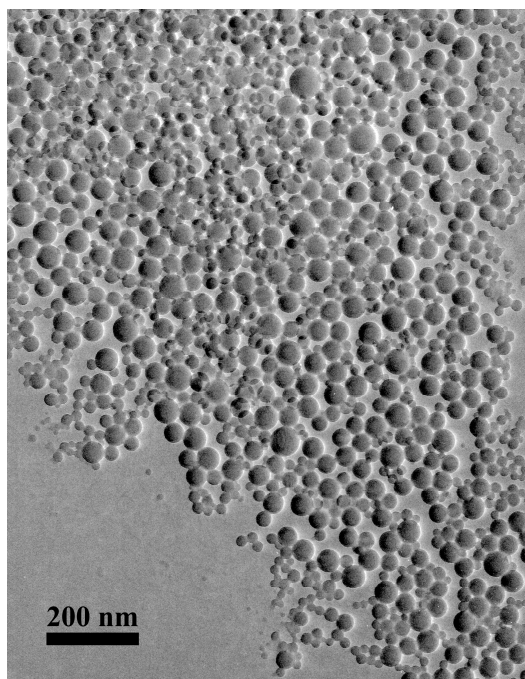
**Figure III.19. Représentation schématique d'une phase hexagonale inverse.**

Lorsque l'émulsion à  $\delta 83$  est soumise à polymérisation, seul le styrène contenu dans les gouttelettes est polymérisé car le lipide n'est pas polymérisable. Le styrène étant présent uniquement dans la phase hydrophobe entre les canaux d'eau, seuls les espaces entre les canaux sont polymérisés, c'est la raison pour laquelle après polymérisation nous observons des amas de particules allongées et non des

particules structurées isolées. Pour polymériser de telles particules ayant une structure interne, il faudrait également pouvoir polymériser la MLO ou bien remplacer la MLO par un lipide structurant et polymérisable [Khiew P. S. *et al.*, 2004 ; Yan F. *et al.*, 2006].

### ***III.2.2.e. Confinement des NPs dans les émulsions polymérisées***

Dans un second temps, une étude du confinement des NPM dans les émulsions à base de DU/styrène et dans les particules solides de PS a été menée. Des NPM hydrophobes de taille moyenne 6,2 nm issues de la synthèse par décomposition thermique de composés organométalliques ont été précipitées et redispersées dans une solution de styrène. La suspension de NPM dans le styrène et 7% de photoinitiateur ont été ajoutés à la MLO de façon à obtenir une émulsion à 5% dans l'eau. Le F127 a été utilisé comme stabilisant. Une partie de l'émulsion à  $\delta 20$  a ensuite été polymérisée durant deux jours sous UV. A l'issue de la polymérisation, des particules de PS ont été formées. Cependant, un dépôt noir de NPM est visible au fond du flacon dans le cas de l'émulsion avant et après polymérisation. Sur le cliché de MET de la figure III.20., la présence de NPM sur la grille n'est pas détectée, montrant que les NPM au bout de deux jours ne sont plus en suspension dans l'eau. Les NPM ont été expulsées hors des émulsions.



**Figure III.20. Particules de PS issues de la polymérisation UV des émulsions magnétiques stabilisées par le F127.**

Les molécules de F127 s'adsorbent à la surface des gouttelettes d'émulsion pour les stabiliser à l'aide de leur partie centrale hydrophobe. Cette absorption est réversible et il existe un équilibre entre l'adsorption et la désorption des molécules de tensioactif et une fraction de F127 qui reste libre ou sous forme de micelle en solution. Les NPM étant enrobées par des molécules d'acide oléique, le F127 va par conséquent s'adsorber naturellement sur ces surfaces hydrophobes. Cette propriété a d'ailleurs

été exploitée dans des travaux de Jain *et al.* dans le but de transférer les NPM d'un solvant apolaire à un solvant polaire [Jain T. K. *et al.*, 2005].

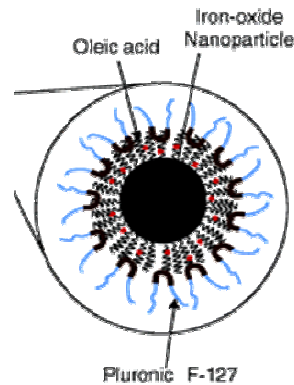


Figure III.21. Illustration de l'adsorption du F127 sur les NPM enrobées d'acide oléique d'après Jain *et al.* [Jain T. K. *et al.*, 2005].

Le tensioactif entourant les NPM hydrophobes va entraîner leur précipitation et empêcher leur intégration au sein des Isasomes.

Le F127 est un émulsifiant à proscrire dans le cas du confinement de NPM dans nos émulsions. Divers travaux de Landfester *et al.* nous ont amené à faire le choix d'un autre agent de surface qui n'interagit pas avec les NPM, le dodécylsulfate de sodium (SDS) [Landfester K., 2001 ; Landfester K. *et al.*, 2003 ; Ramirez L. P. *et al.*, 2003]. Dans ces travaux, ils rapportent l'encapsulation d'une grande quantité de NPM *via* une synthèse en microémulsion en plusieurs étapes schématisée ci-dessous :

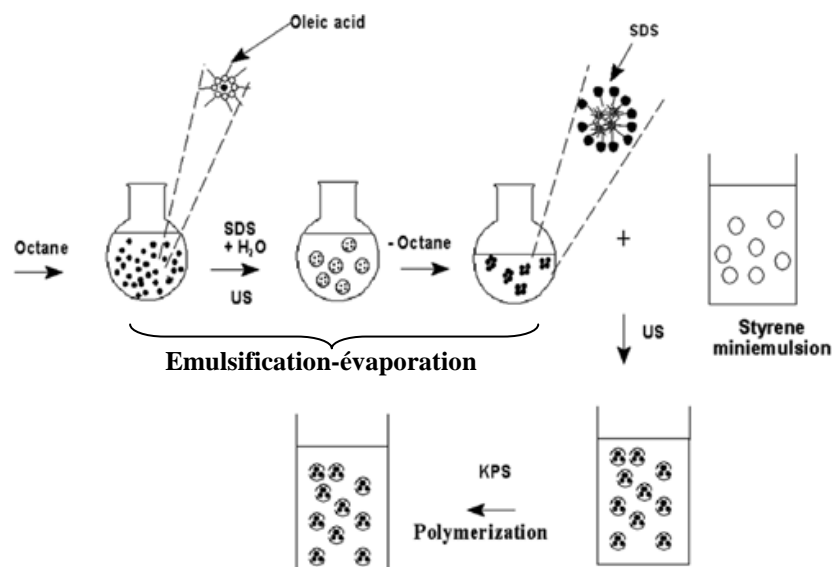


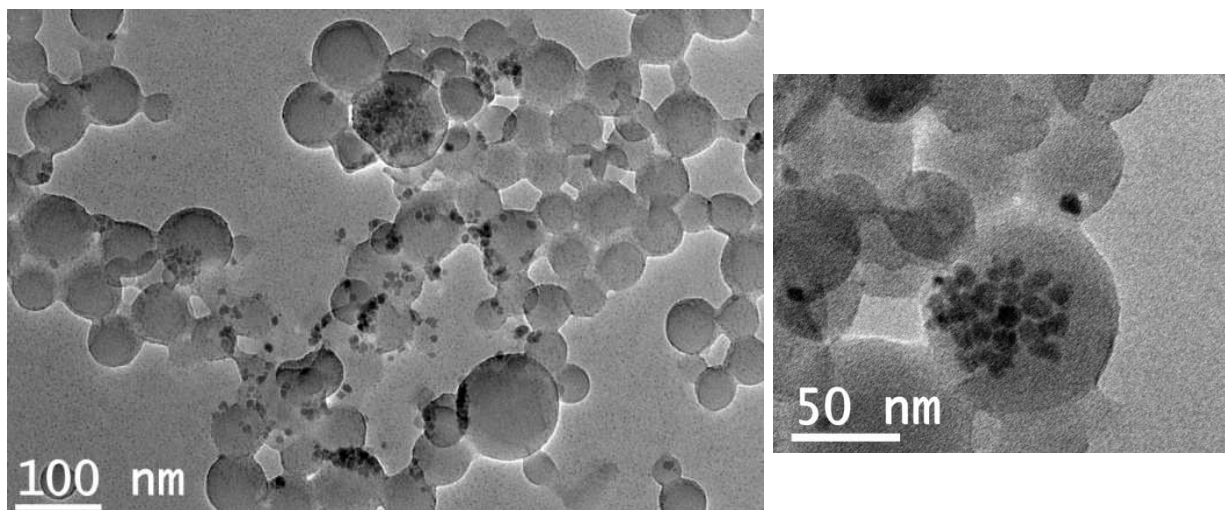
Figure III.22. Schéma du principe de l'encapsulation des NPM dans des particules polymériques par le processus de miniémulsion de Ramirez *et al.* [Ramirez L. P. *et al.*, 2003].

Nous avons suivi le schéma général de cette synthèse en y apportant quelques modifications : les NPM ont été précipitées et dispersées directement dans la solution de monomère sans passer par une étape

d'émulsification-évaporation, le DU a été utilisé dans notre étude à la place de l'hexadécane ; enfin la polymérisation a été initialisée par UV.

Cette préparation a lieu en trois étapes. Tout d'abord, 2 g de la suspension magnétique de styrène, 0,17 g de photoinitiateur et 104 mg de DU sont pesés et ajoutés à 10 g d'eau contenant 30 mg de SDS. Tous ces composants sont mélangés dans un bain de glace à l'aide d'un agitateur magnétique à 500 rpm pendant 1 heure pour former une émulsion grossière. Ensuite, une sonde à ultrasons est plongée dans la solution toujours dans un bain de glace et les ultrasons sont appliqués pendant 2 minutes à 90% de la puissance totale de l'appareil. Cette émulsion sera notée « émulsion 1 ». En parallèle, une seconde émulsion est préparée en mélangeant 2 g de styrène sans NPM, 0,17 g de photoinitiateur, 10 g d'eau contenant 30 mg de SDS. De même, préalablement aux US, le mélange est agité pendant 1 heure à 500 rpm puis soumis 2 minutes aux US à 90% de puissance dans un bain de glace : c'est « l'émulsion 2 ». Enfin, les émulsions 1 et 2 sont co-soniquées pendant 1 minute aux US à 50% d'amplitude dans un bain de glace. Le bain de glace évite une éventuelle polymérisation de l'émulsion induite par la chaleur générée par les ultrasons qui n'est pas négligeable (cf. annexe A). L'émulsion obtenue est légèrement brunâtre du fait de la présence de NPM.

Cette dispersion est polymérisée pendant 2 jours sous UV à 365 nm et caractérisée en MET.



**Figure III.23. Gouttelettes d'émulsion magnétique stabilisées par du SDS et polymérisées par UV.**

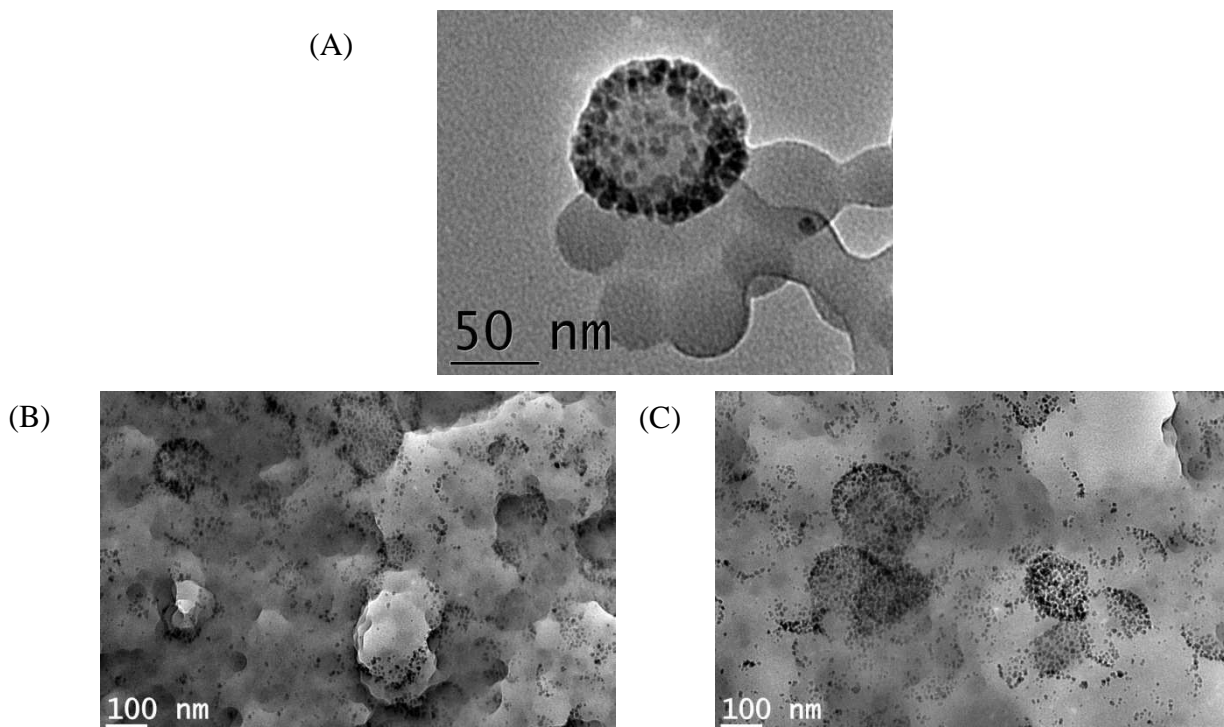
Les photos prises au MET confirment la présence de particules d'émulsion polymérisées sphériques et de NPM. La taille des particules de PS est conforme à une loi de type log-normale, les plus grosses ayant un diamètre d'environ 100 nm et les plus petites mesurant à peine 20 nm. Les particules semblent être connectées les unes aux autres, comme si elles étaient sur le point de fusionner. Les NPM sont localisées aussi bien à l'intérieur des particules de PS qu'à leur surface. La répartition des NPM au sein des particules est très inhomogène, si bien qu'un bon nombre de particules de PS n'en comporte aucune.

Le SDS semble néanmoins un tensioactif approprié à la stabilisation de particules de PS magnétiques contrairement au F127. Malheureusement, c'est aussi un produit toxique qui ne peut être utilisé pour

des applications médicales. D'autres tensioactifs ont alors été testés en utilisant un autre protocole : la lécithine de soja et le caséinate de sodium (NaCas).

Des émulsions à  $\delta 20$  ont été préparées en mélangeant une suspension magnétique de styrène, le photoinitiateur et du DU dans 95% d'eau contenant de la lécithine de soja ou du NaCas préalablement dissous à  $\beta 8$  dans l'eau. Tout d'abord, une émulsion grossière a été réalisée à 500 rpm pendant 1 heure dans un bain de glace avant de soumettre ce mélange aux ultrasons à 40% de la puissance maximale pendant 10 minutes dans un bain de glace. L'émulsion a été placée sous la lampe UV pendant 2 jours et la dispersion finale a été visualisée au MET. La couleur brune de l'émulsion et l'absence de culot suggère que les NPM sont toujours en suspension.

Dans le cas de la NaCas, au bout de 2 jours sous la lampe UV l'émulsion était inexploitable car le NaCas s'est agrégé à l'instar du caillage du lait. Les résultats de microscopie concernant la lécithine de soja sont présentés ci-dessous :



**Figure III.24. Clichés de MET montrant la polymérisation de l'émulsion magnétique à  $\delta 20$  stabilisée par la lécithine de soja ( $\beta 8$ ).**

Très peu de particules polymériques sont isolées car la lécithine forme une gangue dont il est difficile de s'affranchir lors du séchage sur la grille de MET. L'image de la figure III.24. (A) montre néanmoins la formation de particules de type framboise (raspberry-like). Les NPM ont tendance à se positionner à la surface des particules de PS. De plus les NPM ont conservé l'acide oléique qui les entoure puisqu'elles ne sont pas agrégées. Sur les clichés de la figure III.24. (B) et (C), la gangue épaisse de lécithine nous empêche de voir les particules polymérisées de façon précise. Malgré tout, on devine les limites des particules de PS car les NPM suivent les contours, confirmant leur présence à la surface des particules. Ces particules composites sont similaires à celles obtenues par Landfester *et al.*

et par Isojima *et al.* avec du SDS [Landfester K. *et al.*, 2003 ; Isojima T. *et al.*, 2009]. La présence des NPM entourées d'acide oléique en surface et non à l'intérieur des particules revient à dire que le solvant ne leur convient pas, ni même l'intérieur des particules. Soit elles participent à la stabilisation des gouttelettes d'émulsion en s'intercalant entre les molécules de lécithine pour former une sorte d'émulsion stabilisée par des particules colloïdales ou « Pickering » [Pickering S. U., 1907 ; Arditty S., 2004 ; Frelichowska J., 2009], soit les NPM migrent de l'intérieur vers sa surface pendant le processus de polymérisation. Malheureusement cette connaissance ne peut se faire que par une étude complète en cryo-MET.

Finalement, la polymérisation des émulsions et leur visualisation a permis de mettre au point le protocole de préparation des émulsions magnétiques qui suit :

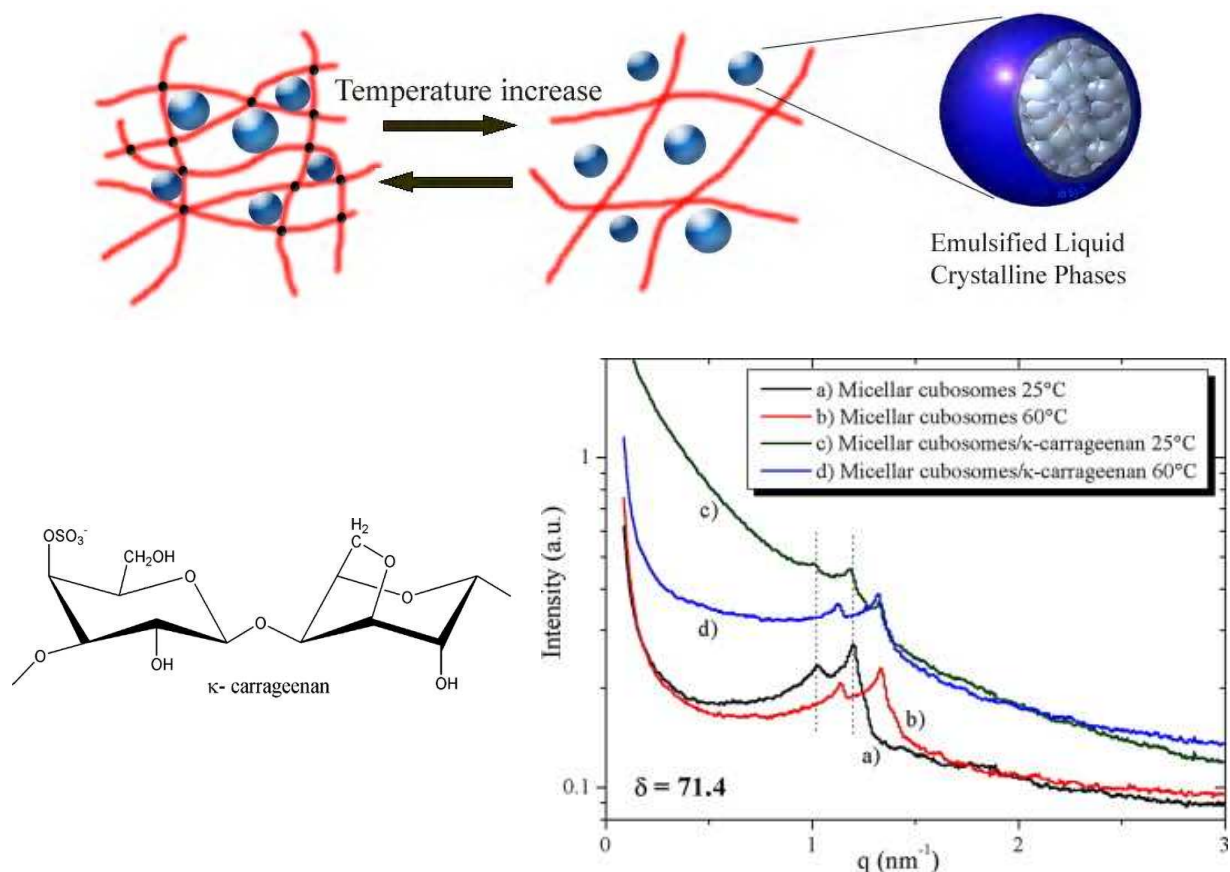
Les NPM hydrophobes sont extraites du solvant apolaire dans lequel elles sont conservées et dispersées dans le R-(+)-limonène. Cette « huile magnétique » est ensuite ajoutée au DU pour obtenir la valeur de  $\delta$  désirée. Parallèlement, l'eau contenant le tensioactif à  $\beta 8$  est préparée. Tous les composants sont enfin mélangés afin d'obtenir une émulsion à 5% dans l'eau et soumis aux US le temps nécessaire pour disperser correctement la phase hydrophobe.

### III.2.3. Les hydrogels magnétiques

#### III.2.3.a. Choix du polymère et préparation des hydrogels magnétiques

Le système que nous avons choisi d'élaborer est un hydrogel physique couplé à des NPM et contenant des Isasomes. Les gels « physiques » sont obtenus à une concentration élevée de polymère du fait des interactions interchaînes ou en augmentant la température en utilisant un polymère thermosensible à LCST (ou à basse température pour des polymères à UCST). Ces interactions incluent les forces de Van Der Waals, les liaisons hydrogènes, les interactions hydrophobes. Elles assurent la cohésion du gel. Le choix de l'hydrogel est primordial à ce stade. En effet, il doit se conformer à certaines caractéristiques pour la délivrance par stimulation thermomagnétique et donc être à UCST. Il doit pouvoir contenir les NPM et confiner les Isasomes sans en modifier la structure, être biocompatible et avoir une UCST assez haute c'est-à-dire supérieure à la température d'échauffement pour rester sous forme de gel. Une récente étude a montré que la dispersion des Isasomes dans un gel de  $\kappa$ -carrageenan à la concentration de 20 g/L permettait de figer des Isasomes dans la matrice de polymère sans interaction forte sur la structure puisque les émulsions conservent leur structure interne avant ou après gélification réversible (cf. figure III.31.) [Guillot S. *et al.*, 2009 ; Tomsic M. *et al.*, 2009]. Ce biopolymère est un polysaccharide extrait d'algues rouges très utilisé dans l'industrie alimentaire comme gélifiant et épaississant, mais aussi pour des applications en délivrance de PA [Sjoberg H. *et al.*, 1999 ; Coviello T. *et al.*, 2007]. Il existe plusieurs variétés de carrageenan mais seul les  $\kappa$  et  $\iota$  forment des gels par transition d'un état désordonné (pelote statistique) à un état ordonné (hélice) par diminution de la température ou en ajoutant des sels. Le  $\kappa$ -carrageenan est un polymère biocompatible et thermosensible ayant une température de transition à 60°C pour une concentration de 20 g/L [van de Velde F. *et al.*, 2002].





**Figure III.32. En haut : schéma montrant le piégeage des Isasomes dans le réseau de polymère. En bas : formule chimique du  $\kappa$ -carrageenan et comparaison des mesures de SAXS entre émulsion et émulsion piégée dans le  $\kappa$ -carrageenan à 25°C et à 60°C [Guillot S. *et al.*, 2009].**

Outre les propriétés pré-citées, le carrageenan a par ailleurs été utilisé en tant qu'hydrogel gonflé par des solutions de NPM [Mitsumata T. *et al.*, 2005 ; Liang Y. Y. *et al.*, 2007 ; Daniel-da-Silva A. L. *et al.*, 2007 ; Daniel-da-Silva A. L. *et al.*, 2008]. La préparation d'un tel système est simple et ne nécessite pas de chimie particulière.

#### **Méthode de préparation du gel contenant les Isasomes :**

Dans un premier temps, le  $\kappa$ -carrageenan est solubilisé seul dans 5 mL d'eau à 60°C à une concentration de 40 g/L. Parallèlement, une émulsion à 5% dans l'eau déionisée est préparée en mélangeant le DU, le R-(+)-limonène à la valeur de  $\delta$  voulue et contenant TEMPO ( $2.10^{-4}$  M) et NP hydrophobes enrobées d'acide oléique. Nous avons systématiquement préparé des émulsions à  $\delta 50$  et  $\delta 70$ . L'émulsifiant utilisé est la lécithine de soja à  $\beta 8$ . L'émulsion magnétique précédente et une solution de NPM citratées à une concentration en fer connue sont mises dans une étuve à 60°C, de sorte que toutes les solutions à mélanger soient à la même température.

Une fois le polysaccharide entièrement solubilisé dans l'eau, on y ajoute 2,5 mL de ferrofluide citraté et 2,5 mL d'émulsion à 60°C pour assurer un aspect liquide à l'ensemble. Puis, le mélange est agité au



vortex pendant 10 à 20 secondes pour homogénéiser ; il est immédiatement refroidi à 4°C pour figer les constituants répartis de manière homogène et former le gel.

### III.2.3.b. Capacité d'absorption des hydrogels mixtes

Des mesures de gonflement par absorption d'eau ont été effectuées sur nos hydrogels. Après avoir versé dans une boîte de pétri de diamètre 5 cm le mélange visqueux encore chaud, il est refroidi à 4°C et le film de gel obtenu à partir de 10 g de solution est séché dans la boîte de pétri sous cloche pendant une semaine sur gel de silice. Deux types de gel ont été analysés, le gel de  $\kappa$ -carrageenan seul à 20 g/L et le gel à 20 g/L contenant 1,25% d'émulsion et 2,2 gFe/L. Les gels secs sont plongés dans l'eau déionisée et sont pesés toutes les 10 minutes jusqu'à atteindre la masse de gonflement maximal.

Le taux d'absorption d'eau dans les hydrogels est calculé en utilisant l'équation suivante :

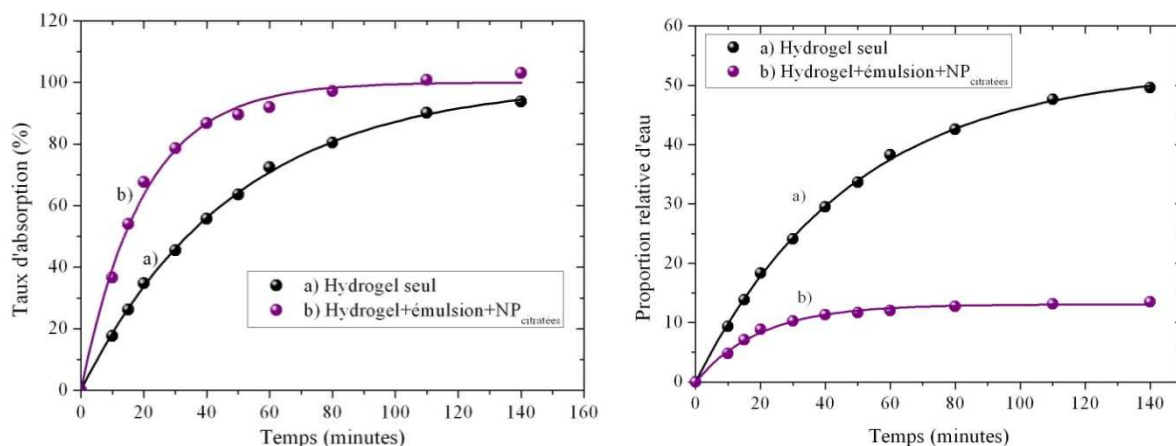
$$\text{Taux d'absorption} = \left( \frac{W_t - W_s}{W_e^\infty} \right) \times 100$$

où  $W_t$  est la masse du gel à l'instant  $t$ ,  $W_s$  est la masse du gel sec et  $W_e^\infty$  est l'eau contenue dans le gel au temps infini à une température donnée.

La proportion relative d'eau dans l'hydrogel en fonction du temps est définie par l'équation suivante :

$$\text{Proportion relative d'eau} = \frac{W_e}{W_s}$$

avec  $W_e = W_t - W_s$ , est la masse d'eau contenu dans l'échantillon à un instant  $t$  donné.



**Figure III.32. Cinétiques d'absorption d'eau dans les hydrogels seul et mixte. A gauche : taux d'absorption d'eau (%) ; à droite : proportion relative d'eau dans le gel.**

Les données expérimentales montrant l'évolution de la proportion d'eau relative dans l'hydrogel ont été ajustées par les courbes d'équation  $52,87 \times (1 - e^{-t/\tau})$  avec  $\tau = 36,58$  minutes ( $\tau$ , temps caractéristique d'absorption) pour l'hydrogel seul et  $13,06 \times (1 - e^{-t/\tau})$  avec  $\tau = 20,16$  minutes pour l'hydrogel mixte. La mesure du taux d'absorption d'eau montre que le temps caractéristique d'absorption  $\tau$  est plus important dans le cas de l'hydrogel seul. Le gel mixte absorbe 75% de moins d'eau et plus rapidement que le  $\kappa$ -carrageenan seul. Les NPM et les Isasomes à l'intérieur de la structure polymérique limitent

la quantité d'eau absorbée sur les chaînes de  $\kappa$ -carrageenan de par l'encombrement des émulsions et des particules au sein du gel. Les chaînes n'étant pas liées chimiquement, les gels se dégradent au bout d'un certain temps. Ce phénomène intervient lorsque le gel atteint sa valeur maximale de gonflement. En conséquence, il a été observé que le gel contenant émulsion et NPM se dégrade plus rapidement. Les rapports de gonflement des hydrogels peuvent aussi être calculés :

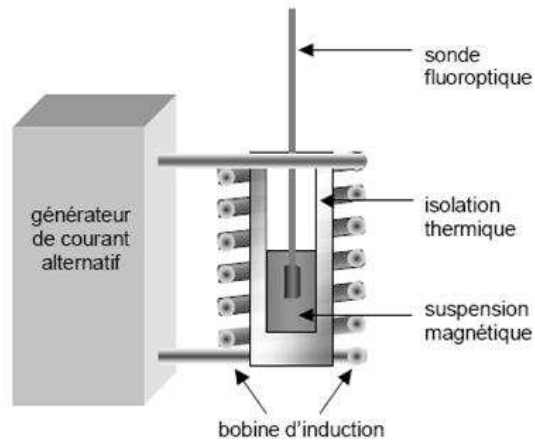
$$\text{Rapport de gonflement} = \frac{W_t^\infty}{W_s} = \frac{W_e^\infty}{W_s} - 1$$

Nous obtenons des rapports de gonflement à température ambiante pour l'hydrogel seul de 51,87 et de 12,06 pour l'hydrogel mixte.

### ***III.2.3.c. Echauffement des NPM sous champ magnétique alternatif***

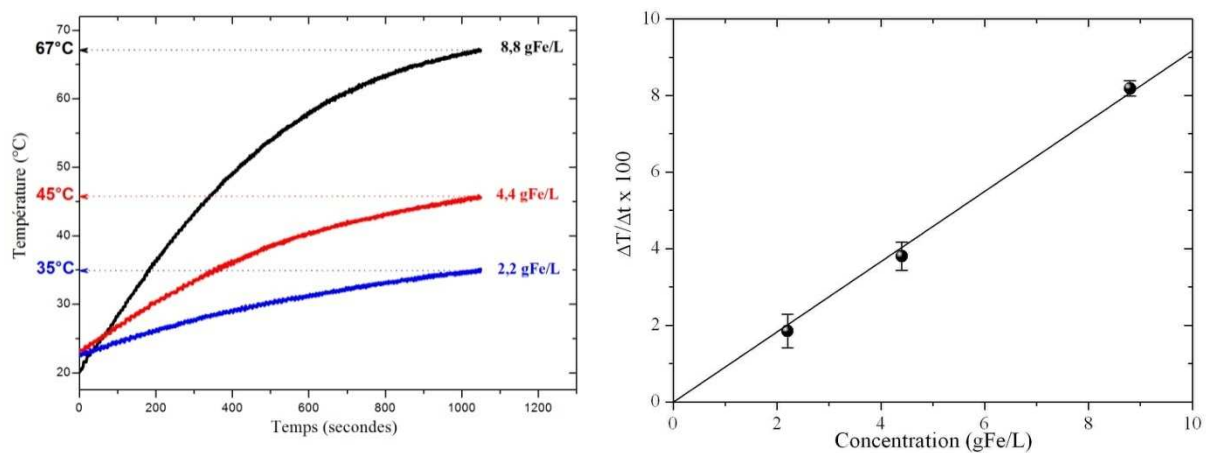
L'échauffement des NPM soumises à un champ magnétique alternatif est la conséquence de différents processus de pertes de chaleur : les pertes par hystérésis [Lacroix J. M. *et al.*, 2009], et les pertes par relaxation de Néel et de Brown [Rosensweig R. E., 2002]. C'est la taille et les propriétés magnétiques des NPM qui discriminent le processus physique qui va dominer. Pour des NPM monodomaines superparamagnétiques, comme c'est le cas de nos NPM, la chaleur générée résulte de l'effet combiné de la rotation de la particule (agitation Brownienne) et des fluctuations internes du moment magnétique (Néel). La viscosité du fluide porteur ( $\tau_B = \frac{3\eta V_h}{k_B T}$ ), la taille des NPM, l'anisotropie magnétique, l'amplitude du champ magnétique et sa fréquence sont autant de paramètres qui déterminent l'efficacité d'échauffement des NPM. Ils ont été explorés indépendamment et chacune de leur influence a été mise en évidence dans une étude en 2007 [Fortin J.-F. *et al.*, 2007].

La capacité à s'échauffer des ferrofluides et des hydrogels magnétiques préparés a été testée grâce au dispositif d'hyperthermie magnétique de l'*Institut de Chimie de la Matière Condensée de Bordeaux* (ICMCB). Un schéma du principe est représenté sur la figure III.33. Les mesures d'hyperthermie consistent à placer un matériau magnétique sous un champ magnétique alternatif haute fréquence et à mesurer l'élévation de température induite. Les expériences d'échauffement magnétique effectuées lors de cette thèse ont été menées à l'ICMCB à Bordeaux avec l'appareil d'induction Celes 6/400 (Celes S.A., France), de fréquence d'accord 108 kHz pour la bobine utilisée (7 tours, diamètre moyen des spires : 5,3 cm, pas des spires : 0,63 cm), générant un champ magnétique alternatif d'amplitude 88 mT (70 kA/m).



**Figure III.33. Schéma du montage permettant de mesurer l'élévation de température de l'échantillon sous champ magnétique alternatif [Mornet S. *et al.*, 2006 ; Vasseur S., 2007].**

Environ 1 g de ferrofluide (FF) citraté ou de gel magnétique est versé dans un tube en polypropylène de diamètre 1 cm. En ce qui concerne le gel magnétique, il est préparé et versé dans le tube alors qu'il est encore chaud, la gélification a lieu en refroidissant le tube à 4°C. Le tube est ensuite placé au centre du solénoïde pour être au maximum du champ magnétique. Un culot en polystyrène est fixé au fond du tube pour minimiser les échanges thermiques avec l'extérieur. L'élévation de température de l'échantillon au cours du temps est mesurée par l'intermédiaire d'une sonde fluoroptique<sup>3</sup> Luxtron STF-2 (Bfi OPTiLAS S.A.S., France), de sorte à éviter tout échauffement parasite de l'appareil de mesure de la température dans le champ magnétique alternatif. L'information est convertie en signal électrique par le module de conversion Luxtron m600 (Bfi OPTiLAS S.A.S., France), puis acquise par port RS232, récupérée et convertie en données exploitables *via* le logiciel HyperTerminal Windows.



**Figure III.34. Hyperthermie magnétique sur un ferrofluide d'oxyde de fer à différentes concentrations en NPM et variation de la pente initiale de la courbe en fonction de la concentration de FF.**

<sup>3</sup> Le principe de la sonde de température fluoroptique repose sur la mesure de la décroissance de la fluorescence d'un cristal luminescent en fonction du temps, le temps caractéristique de cette décroissance étant directement corrélé à la température du milieu. L'avantage d'une telle sonde, par rapport à un thermocouple, réside dans le fait qu'elle ne présente aucun élément magnétique ou métallique susceptible de s'échauffer spontanément dans le champ magnétique alternatif [Vasseur S., 2007].

Les cinétiques de la figure III.34. relatives à un ferrofluide citraté montre que l'augmentation de température par hyperthermie magnétique est directement reliée à la concentration de nanoparticules dans le ferrofluide. En diluant le ferrofluide (FF) une fois puis deux, la température atteinte au bout de 1000 secondes varie de 67°C à 45°C et 35°C respectivement.

L'efficacité des NPM à chauffer est déterminée par la SAR, comme nous l'avons vu dans le chapitre I. La SAR est directement proportionnelle à la pente initiale de la courbe d'hyperthermie comme le montre la figure III.35. puisque  $SAR = C \times \left( \frac{\Delta T}{\Delta t} \right)$ , C étant la capacité calorifique spécifique avec

$$C = \frac{C_{\text{solvant}}}{x_{\text{matériau}}} \text{ (cf. chapitre I, §I.1.b.)}$$

	Concentration en Fe	8,8gFe/L	4,4gFe/L	2,2gFe/l
<b>Ferrofluide</b>	$\frac{\Delta T}{\Delta t}$ (°C/s)	$8,19.10^{-2}$	$3,81.10^{-2}$	$1,85.10^{-2}$
	<b>SAR<sub>magn</sub></b> (W/gFe)	<b>39</b>	<b>36</b>	<b>35</b>
<b>Gel</b>	$\frac{\Delta T}{\Delta t}$ (°C/s)	/	$3,01.10^{-2}$	$1,56.10^{-2}$
	<b>SAR<sub>gelmagn</sub></b> (W/gFe)	/	<b>19</b>	<b>19</b>

**Tableau III.7. Valeurs de  $\frac{\Delta T}{\Delta t}$  calculées à partir de la pente initiale des différentes courbes**

**correspondants aux différentes concentrations de ferrofluide et SAR associées en prenant**

$C_{\text{solvant}}=4,18 \text{ J.g}^{-1}.\text{K}^{-1}$ , le solvant étant l'eau et  $C_{\text{gel}}=2,72 \text{ J.g}^{-1}.\text{K}^{-1}$  pour le  $\kappa$ -carrageenan (voir annexe C).

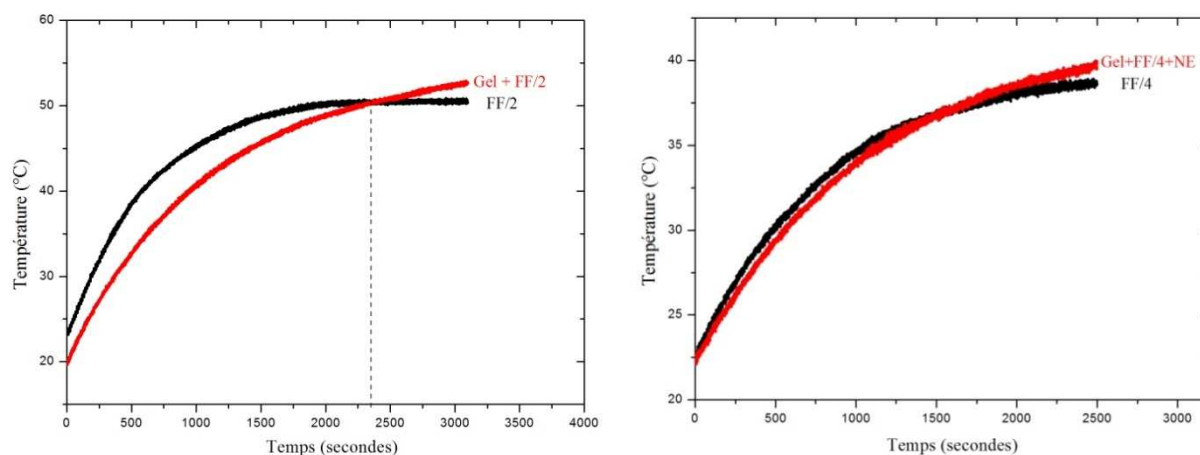
La capacité à chauffer des FF a été comparée à celle des FF incorporés et piégés dans le gel de  $\kappa$ -carrageenan en présence ou non des émulsions. Des concentrations identiques de FF ont été reportées sur la figure III.35.

Les mesures d'hyperthermie ont été faites sur des temps plus longs pour la comparaison avec les gels. Nous remarquons qu'en 2000 secondes le FF à la concentration de 4,4 gFe/L a déjà atteint un plateau de saturation de température tandis que pour le gel à la même concentration de FF, le système met plus de temps à atteindre la saturation (plus de 50 minutes). De même, pour le FF à 2,2 gFe/L et le gel contenant le FF à la même concentration et l'émulsion à 1,25%, au bout de 2500 secondes, ce plateau n'est toujours pas atteint. Ce plateau est en fait dû aux pertes de chaleur ayant lieu entre le gel ou le FF et le milieu extérieur.

Les pentes initiales des courbes ont été calculées pour les gels magnétiques. Le gel à 4,4 gFe/L a une pente de  $3,01.10^{-2} \text{ °C/s}$ . Pour le gel à 2,2 gFe/L et 1,25% d'émulsion,  $\frac{\Delta T}{\Delta t}$  est égal à  $1,56.10^{-2} \text{ °C/s}$ .

Dans ces deux cas, les SAR sont inférieures aux FF seuls à la même concentration. Pourtant, à des temps longs, la température enregistrée au sein du gel est légèrement plus importante que la température dans le FF. Le  $\kappa$ -carrageenan semble avoir un effet calorifuge<sup>4</sup> sur le système, il agit comme une sorte d'isolant thermique.

<sup>4</sup> Réduit les déperditions de chaleur.



**Figure III.35. Hyperthermie magnétique : comparaison des FF et des gels magnétiques.**

Ainsi pour notre système complexe les temps d'application du champ extérieur devront être plus important que pour un FF simple afin d'atteindre la température désirée. Ceci reste vrai jusqu'à ce que la courbe du système mixte coupe celle du FF seul. En effet, pour des temps longs, les températures de saturation sont plus importantes pour les systèmes « gel+FF » et « gel+FF+Isasomes » que dans le cas du FF seul.

### III.3. Utilisation de la RPE pour suivre la diffusion de PA

#### III.3.1. Principe de la RPE

Contrairement à la RMN qui est sensible au spin nucléaire, la RPE repose sur le comportement d'un électron non apparié dans un champ magnétique. L'échantillon à analyser est placé dans une cavité située au centre d'un champ magnétique externe de norme constante  $B_0$ , destiné à lever la dégénérescence des niveaux électroniques par effet Zeeman<sup>5</sup>. En plus du champ constant, il est soumis à un champ magnétique oscillant (micro-onde) destiné à induire la transition des spins entre les niveaux énergétiques [Eaton G. R. et al., 1998].

En faisant varier le champ appliqué ou la fréquence de l'onde excitatrice, il est possible de mesurer l'énergie entre les niveaux, qui est souvent perturbée par l'environnement local des spins c'est-à-dire la structure et la chimie locale du matériau. Une manière courante de concevoir ce problème est de prendre le modèle classique des moments magnétiques, qui ont un mouvement de précession autour du champ appliqué à la fréquence dite de Larmor. Si l'on applique un petit champ oscillant à cette fréquence, et perpendiculaire au champ constant, le moment magnétique va fortement accroître l'amplitude de sa précession ; il se produit un phénomène de résonance. La résonance se produit lorsque  $\hbar\nu = g\mu_B B_0$  avec  $g$  le facteur de Landé,  $\mu_B$  le magnéton de Bohr,  $B_0$  la valeur du champ magnétique à la condition de résonance,  $\hbar = h/2\pi$  avec  $h$  la constante de Planck, et  $\nu$  la fréquence de résonance. Lorsque cette condition de résonance est satisfaite, les électrons absorbent de

<sup>5</sup> Découvert par Pieter Zeeman, Prix Nobel de Physique en 1902.

l'énergie et transitent des bas niveaux d'énergie vers les hauts. L'énergie électromagnétique absorbée par le système durant la résonance doit être dissipée, sinon le système sature. Elle est dispersée *via* des processus de relaxation complexes, puisqu'ils mettent en jeu les fluctuations locales de l'état du système telles que les vibrations thermiques du réseau ou encore les fluctuations des densités électroniques, les fluctuations d'ondes de spins, etc. L'influence de ces fluctuations se traduit par un temps de relaxation, qui est une grandeur phénoménologique. Traditionnellement, on peut distinguer deux types de relaxation : une relaxation de type spin-réseau à laquelle on associe le temps caractéristique T1 (compris entre 0,1 et 1 $\mu$ s) et une relaxation de type spin-spin auquel on associe T2. Dans le premier cas, le réseau cristallin va permettre à un état excité de spin de se désexciter, dans le second, les états de spins voisins vont perdre leur cohérence du fait des fluctuations du champ local.

Prenons le cas le simple d'un seul électron non apparié de la figure III.37. Lorsque celui-ci est placé dans un champ magnétique externe  $B_0$ , son moment magnétique va s'aligner de façon parallèle ou antiparallèle au champ magnétique avec l'état de spin correspondant :  $m = \pm \frac{1}{2}$ . Cette levée de dégénérescence crée une différence d'énergie entre les deux niveaux d'énergie correspondants aux deux états de spin. L'éclatement des niveaux d'énergie est proportionnel au champ magnétique appliqué. En se servant de la dégénérescence des niveaux d'énergie des spins électroniques dans un champ magnétique (effet Zeeman), la RPE mesure l'absorbance entre ces niveaux d'énergie.

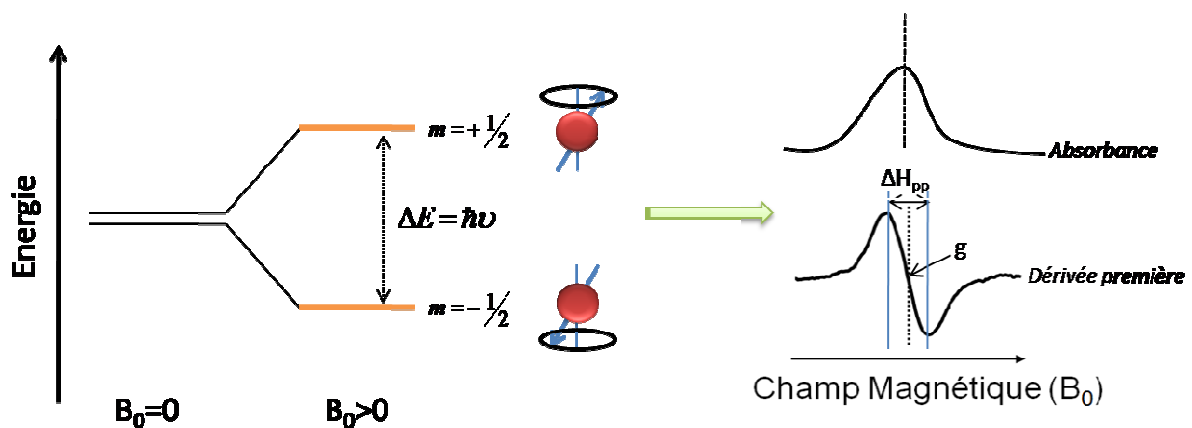


Figure III.37. Effet Zeeman et signal RPE associé.

Pour des raisons de sensibilité, c'est la dérivée première qui est enregistrée et non la courbe d'absorbance. Les paramètres essentiels à considérer pour l'analyse d'un spectre RPE sont :

- Le **facteur de Landé, g** ou facteur de décomposition spectroscopique. Il permet d'apprécier le degré de localisation des centres paramagnétiques (position de résonance). La valeur de g est voisine de 2 pour les radicaux libres et vaut 2,0023 pour l'électron libre.
- La **largeur pic à pic du spectre de la dérivée première  $\Delta H_{pp}$**  donne des informations sur les interactions des porteurs de spin avec leur environnement, et donc leur localisation. Les facteurs qui influencent la largeur sont les interactions spin-réseau, les interactions spin-spin (les spins voisins créent des champs magnétiques locaux qui s'ajoutent aux champs

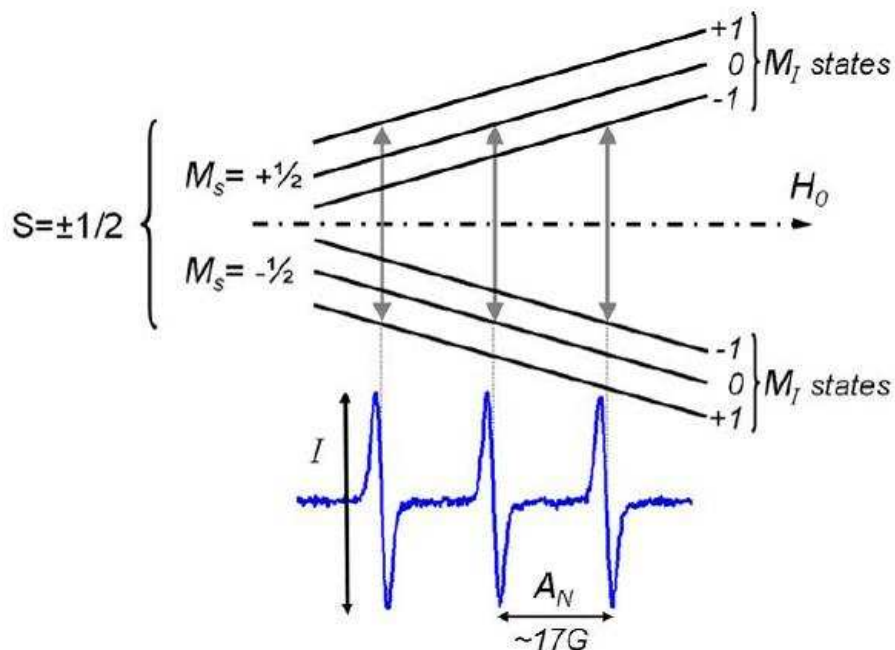
extérieurs), et les interactions d'échange (quand la concentration en spins est grande, ceux-ci sont alors très proches les uns des autres et leurs orbitales atomiques se recouvrent).

- L'**intensité des spectres** (donnée par la double intégration du signal RPE) est proportionnelle au nombre de spins présents dans l'échantillon multiplié par le moment de spin au carré.

### III.3.2. Caractérisation du signal RPE du TEMPO

Les radicaux nitroxydes font partie d'une classe de radicaux libres qui est très utilisée en tant que sonde de spin (*spin-probe*) ou marqueur de spin (*spin-label*) [Axel F. S., 1976 ; Lurie D. J. *et al.*, 2005 ; Martini G. *et al.*, 2009]. Plusieurs informations peuvent être extraites de l'analyse du signal RPE. Tout d'abord, la concentration de spin NO peut être déduite du calcul de l'aire du spectre. Ensuite, la position et la forme des lignes du signal RPE des radicaux NO peut donner des informations essentielles sur le temps de relaxation du marqueur, la structure, l'ordre, la viscosité et la polarité du milieu hôte. Ainsi, le TEMPO est une sonde très performante de son environnement local. De plus, les radicaux NO peuvent aussi être incorporés directement dans les systèmes vivants [Kuppusamy P. *et al.*, 1998], ce qui permet d'envisager des études *in vitro* et *in vivo*. Un autre avantage de cette technique est la très grande sensibilité de la RPE puisqu'il est possible de détecter des concentrations de radicaux libres allant jusqu'à  $10^{-6}$  M. Toutefois, il n'est pas possible d'utiliser ces molécules à pH acide de même qu'en présence d'acide ascorbique car les radicaux se protonent.

Les spectres RPE sont la plupart du temps composés de plus d'une ligne de résonance. Ce phénomène de résonances multiples est dû à la présence de noyaux atomiques ayant des moments magnétiques dans la même molécule. Les interactions du ou des électrons célibataires avec ces noyaux magnétiques sont connus sous le nom d'interactions hyperfines et ont pour conséquence l'éclatement hyperfin du signal RPE. Dans les radicaux nitroxydes, l'électron non apparié est situé au niveau du groupement NO. Il est donc à proximité du noyau de l'azote  $^{14}\text{N}$ , qui a un spin nucléaire  $S=1$ . Conformément à la théorie quantique, les spins peuvent prendre trois orientations possibles lorsqu'un champ magnétique est appliqué (cf fig. III.38.).



**Figure III.38. Signal RPE classique obtenu pour des radicaux libres de type nitroxyde. Le spin de l'azote  $^{14}N$  est égal à 1, soit  $2S+1=3$  états de spin [Vileno B., 2006].  $I$  est l'intensité du signal RPE et  $A_N$  est la constante de couplage hyperfin.**

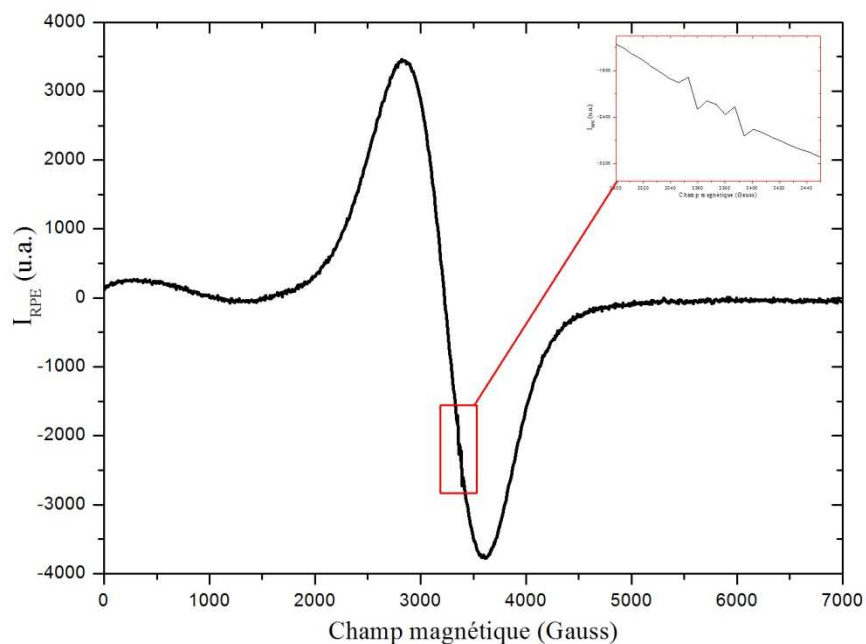
Par conséquent, le signal obtenu pour le TEMPO sera un triplet dû au couplage hyperfin entre l'électron non apparié et les trois différentes orientations de l'azote dans l'espace. La RPE est très sensible à la nature isotrope ou anisotrope des mouvements. Quand les molécules sont libres en solution, les trois raies sont d'intensité identique puisque les mouvements sont isotropes.

Notre système comporte des NPM porteuses de spins magnétiques qui sont susceptibles de modifier le signal des radicaux dans les émulsions. En RPE, ces nanoparticules sont caractérisées par la résonance ferromagnétique [Respaud M. *et al.*, 1998]. En effet, dans le cas d'un composé ferromagnétique, les entités excitées sont des ondes de spins, qui vont interagir avec les phonons pour produire une relaxation spin-réseau, ou entre elles pour produire une relaxation spin-spin. Comme les nanoparticules magnétiques ne sont pas toutes identiques, et orientées dans la même direction, il n'existe pas qu'un seul champ de résonance, ni une seule largeur de raie. Toutes les particules produisent une résonance ferromagnétique avec une largeur de raie qui leur est propre. C'est la somme de toutes les conditions de résonance qui donne un spectre mesurable expérimentalement [Fleurier R., 2006].

En premier lieu, nous avons tenu à vérifier le comportement du signal RPE de radicaux libres en solution aqueuse en présence de NPM (stabilisées ici par le TMAOH en milieu basique) à une concentration massique en fer de 2,61 gFe/L (cf. § II.2.1.). Pour ce faire, un radical similaire au TEMPO mais à caractère hydrophile, le TEMPOL (ou 4-hydroxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidinyloxy), a été solubilisé dans l'eau à une concentration de 0,6 mM. Un spectre large a d'abord été enregistré sur la gamme de 0 à 7000 Gauss à température ambiante, comprenant la superposition du signal

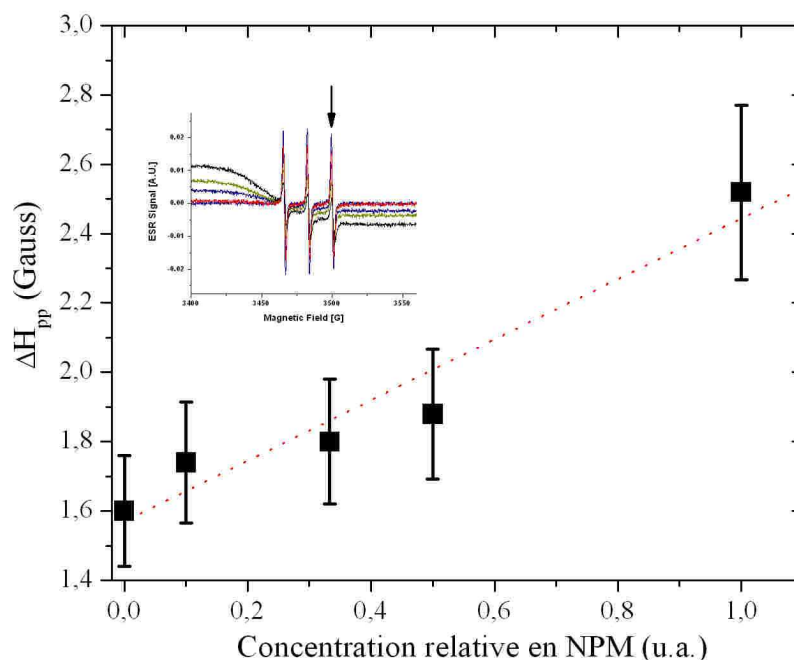


ferromagnétique des NPM et du triplet associé au TEMPOL. Le spectre de ce dernier est situé dans la pente descendante de la résonance ferromagnétique comme indiqué dans l'encadré la figure III.39.



**Figure III.39. Spectre large RPE du système NPM/TEMPOL dans l'eau.**

En réduisant la concentration en NPM dans la solution à concentration fixe de TEMPOL, l'évolution de la largeur de raie du spectre du radical en fonction de la concentration relative en NPM a été suivie (figure III.40.).



**Figure III.40. Influence de la concentration relative (dilution à partir d'un FF à 2,61 gFe/L) en NPM sur la largeur du signal RPE du TEMPOL à ( $C_{\text{TEMPOL}}=0,6$  mM).**

La largeur de raie des spectres RPE de radicaux nitroxydes s'exprime de la façon suivante :

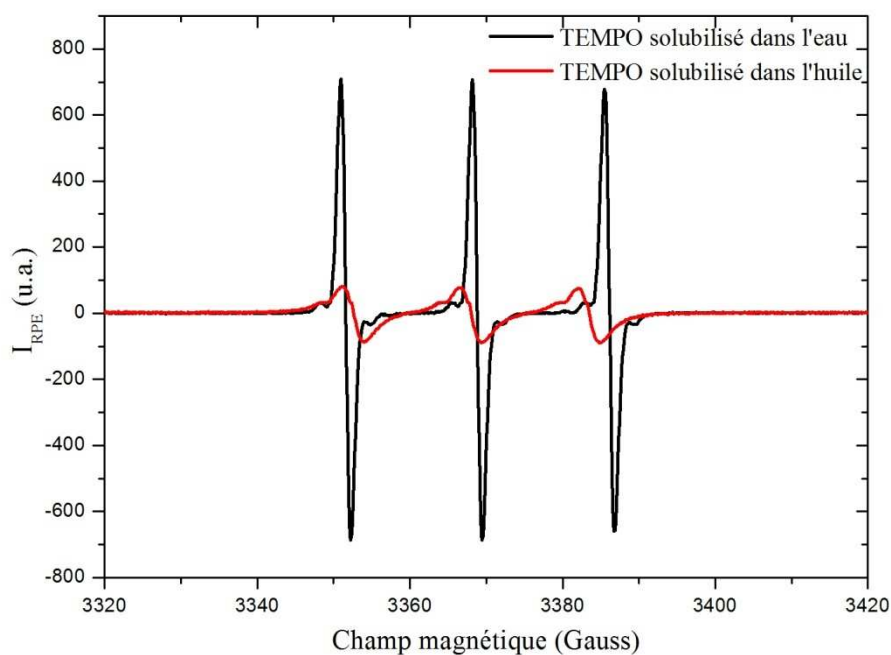
$$\Delta H_{pp} = \Delta H_0 + \Delta H_{\text{échange}} + \Delta H_{\text{dipôle}}$$

où  $\Delta H_0$  est la somme des contributions indépendantes de la concentration en radicaux (élargissement inhomogène, élargissement dû à la présence d'oxygène, etc.),  $\Delta H_{\text{échange}}$  la contribution de l'interaction d'échange de spin entre les radicaux, et enfin  $\Delta H_{\text{dipôle}}$  la contribution des interactions dipôle-dipôle entre les particules.

La largeur pic à pic  $\Delta H_{pp}$  a été mesurée sur la troisième raie du spectre. Comme le montre le graphe de la figure III.40., plus la concentration relative en nanoparticules est grande, plus les lignes RPE sont élargies, et donc plus le  $\Delta H_{pp}$  est grand :  $\Delta H_{pp}$  suit une loi linéaire en fonction de la concentration en NPM. La position des raies reste néanmoins inchangée, quelle que soit la concentration. Ces résultats sont en accord avec les observations faites par Kovarskii *et al.*, indiquant que l'élargissement mesuré est la conséquence directe de l'interaction dipôle-dipôle (ou spin-spin) [Kovarskii A. L. *et al.*, 2007] et non des interactions d'échange qui auraient élargi les raies tout en les déplaçant vers le centre du spectre. Cette expérience préliminaire nous a permis de confirmer l'influence des NPM sur la ligne RPE d'un radical nitroxyde soluble dans l'eau. De plus, nous avons montré qu'il est possible par RPE de suivre à la fois les radicaux mais aussi les NPM.

Dans l'étude menée, le radical NO est utilisé en tant que marqueur de la diffusion après stimulation thermomagnétique. Pour cela, le TEMPO est solubilisé dans la phase dispersée hydrophobe et des nanoparticules d'oxyde de fer sont parsemées dans la matrice de polymère mais aussi dans les émulsions. Alors que l'influence des NPM sur le signal d'un radical NO a clairement été mise en évidence au sein de solvant de même polarité, qu'en est-il de l'interaction des molécules de TEMPO solubilisées dans un milieu apolaire par rapport aux NPM qui les entourent ?

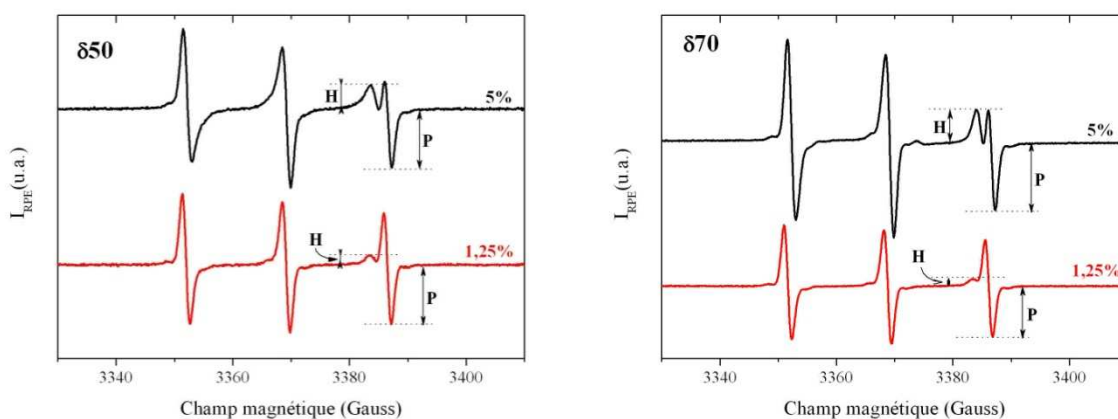
Tout d'abord, il convient de souligner que le signal RPE d'une sonde de spin dépend avant tout du solvant dans lequel il se trouve. Ceci se traduira sur le spectre à travers la constante de couplage hyperfin  $A_N$ , qui correspond à la séparation entre deux lignes de résonance adjacentes. Le TEMPO, bien qu'étant de nature plutôt hydrophobe, a une solubilité non nulle dans l'eau. Nous avons dissous le TEMPO dans le R-(+)-limonène et dans l'eau déionisée à la même concentration ( $2 \cdot 10^{-7}$  M), leurs spectres RPE (Figure III.41.) ont été enregistrés sur la gamme de champ magnétique de 3320 à 3420 Gauss.



**Figure III.41. Signal RPE du TEMPO dans l'eau (en noir) et dans le R-(+)-limonène (en rouge).**

Pour une même concentration en composé radicalaire, les lignes obtenues diffèrent. La ligne du TEMPO dans l'huile (milieu apolaire) est moins intense et plus large que celle du TEMPO dans l'eau où les raies sont plus fines et intenses, on obtient  $\Delta H_{pp}^{huile} = 2,9 G$  et  $\Delta H_{pp}^{eau} = 1,3 G$ . Par ailleurs, la constante de couplage hyperfin est différente puisque  $A_N$  change de 17,2 Gauss dans l'eau à 15,4 Gauss dans l'huile. Grâce à ces larges différences, les molécules de TEMPO pourront être localisées très distinctement dans la phase dispersée ou la phase aqueuse de l'émulsion.

Pourtant, lorsque le TEMPO est solubilisé dans les émulsions, le signal RPE résultant est encore différent. Le spectre du TEMPO dans une émulsion à 5% dans l'eau et le spectre du TEMPO dans la même émulsion diluée à 1,25% figurent ci-après :



**Figure III.42. Signal RPE du TEMPO dans des émulsions en phase micellaire cubique ( $\delta 50$  et  $\delta 70$ ) à 5% et à 1,25%. Les émulsions sont stabilisées par la lécithine à  $\beta 8$ .**

Les spectres ne sont plus constitués du triplet caractéristique, la troisième raie du spectre est ici dédoublée. Par ailleurs, les trois raies ne sont plus identiques en intensité et sont asymétriques. Ceci est en fait la conséquence de la partition du TEMPO entre deux environnements de polarités différentes (l'eau et l'huile). Selon son affinité structurale et chimique, le radical va se positionner préférentiellement dans l'un ou l'autre des milieux [Ahlin P. *et al.*, 2000 ; Jores K. *et al.*, 2003]. Cette propriété du TEMPO à se partager entre deux milieux de différentes polarités a été largement exploitée en biophysique pour l'étude de systèmes biologiques, de bicouche lipidique ou encore d'hydrogel [Hsia J. C. *et al.*, 1973 ; Shimshick E. J. *et al.*, 1973 ; Polnaszek C. F. *et al.*, 1978 ; Sankaram M. B. *et al.*, 1984 ; Maksina A. G. *et al.*, 1991 ; Baranovskii V.Y. *et al.*, 2006 ; Junk M. J. N. *et al.*, 2008].

Cette observation corrobore les résultats obtenus de la diffusion aux petits angles (SAXS) où en présence du TEMPO, nous avons observé un changement de structure interne qui indiquait que le radical se situait probablement à la limite entre les têtes polaires et les queues apolaires. Chaque signal obtenu est une superposition des deux lignes RPE de la figure III.41. ayant des constantes de couplage hyperfin différentes. Sur la raie dédoublée, la première composante correspond à celle du TEMPO dans l'huile et la deuxième à celle du radical dans l'eau.

A partir des spectres, un paramètre de solubilisation  $f$  peut être calculé. Il est défini par H et P annotés sur la figure III.42. avec  $f = \frac{H}{H + P}$  [Maksina A. G. *et al.*, 1991]. Le facteur  $f$  représente la fraction de TEMPO solubilisé dans la dispersée hydrophobe. En mesurant H et P sur les spectres et en les normalisant par la concentration de la phase hydrophobe par rapport à la phase hydrophile, nous avons calculé les valeurs de  $f$  correspondantes dans le tableau suivant.

	$\delta 50$	$\delta 70$
5%	0,88 <sup>6</sup>	0,90
1,25%	0,93	0,92

**Tableau III.8. Valeurs du paramètre  $f$  du TEMPO en fonction de  $\delta$  et de la concentration de la phase dispersée hydrophobe.**

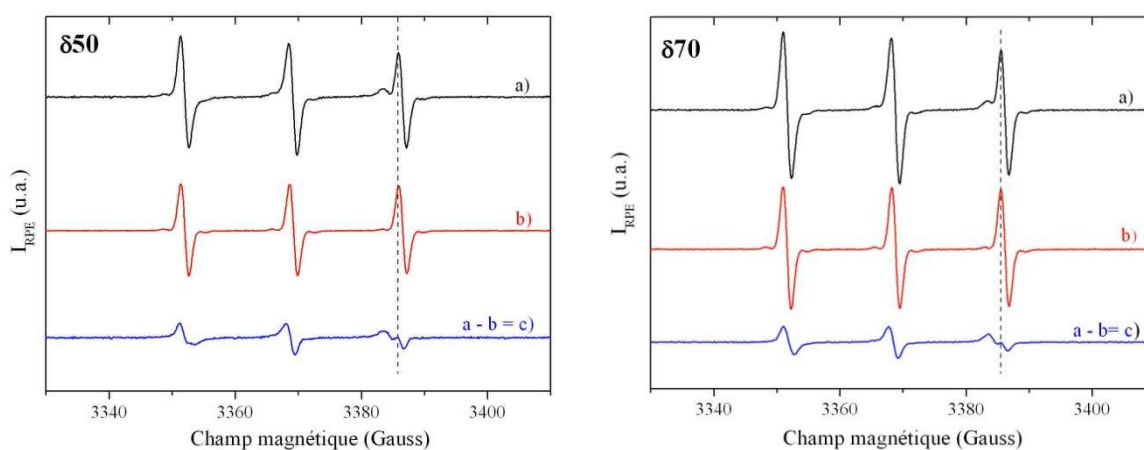
Ces valeurs semblent indiquer que les molécules de TEMPO préfèrent se solubiliser dans la phase hydrophobe. Le paramètre  $f$  ne donne aucune indication quant à la présence du TEMPO à l'interface huile/eau ce qui pourtant joue certainement un rôle important dans notre système.

Le coefficient de partition  $K$  est constant et est donné par le rapport des concentrations d'un composé aussi nommé soluté dans un mélange de deux phases non miscibles (en général, eau/octanol) à l'équilibre pour une température et une pression donnée [Leo A. *et al.*, 1971]. Il correspond à la distribution du soluté entre ces deux phases dans lesquelles il est soluble et permet de déterminer son

---

<sup>6</sup> Exemple de calcul à  $\delta 50$  et 5% en émulsion,  $f_{5\%}^{\delta 50} = \frac{H/5\%}{H/5\% + P/95\%} = \frac{1455/5\%}{(1455/5\% + 3675/95\%)} = 0,88$ .

hydrophobicité. Ce coefficient est largement utilisé en pharmacologie car il est un moyen de prédire l'aptitude d'une molécule de PA à pénétrer dans les cellules et la peau : les molécules les plus hydrophobes sont plus facilement absorbées. Les méthodes les plus usuelles pour mesurer le coefficient de partition sont le dosage de chaque phase après mélange, l'HPLC, ou encore l'électrochimie. Dans le cas présent, l'analyse du signal RPE permet d'accéder à cette information puisque les deux composantes (huile et eau) apparaissent sur la troisième raie du spectre [Bales B.L. *et al.*, 1970 ; Bottle S. E. *et al.*, 1999 ; Ma J. W. *et al.*, 2001 ; Cimato A. N. *et al.*, 2004 ; Viriyaraj A. *et al.*, 2005 ; Herrmann W. *et al.*, 2007 ; Aliaga C. *et al.*, 2009]. En soustrayant de manière numérique le signal du TEMPO dans l'eau au signal du TEMPO dans l'émulsion *via* le logiciel Origin<sup>®</sup>, le signal du TEMPO dans la phase hydrophobe est obtenu. Le signal résultant permet de donner une valeur approximative du coefficient de partition du TEMPO et de la comparer aux valeurs issues de la littérature. De manière générale, on parle plutôt en valeur logarithmique du coefficient de partition. Lorsque  $\log K=0$ , le composé étudié a autant d'affinité pour l'une ou l'autre des phases. Si  $\log K < 0$ , le soluté est hydrophile et si  $\log K > 0$ , le soluté est hydrophobe.



**Figure III.43. Pour des émulsions à 1,25%, soustraction numérique du signal du TEMPO dans l'eau *via* Origin<sup>®</sup>. Le signal RPE du TEMPO dans l'émulsion est noté a, le signal du TEMPO dans l'eau pure est b (signal renormalisé) et enfin c est la soustraction numérique.**

Le coefficient de partition  $K$  est défini par l'équation suivante :

$$K = \frac{C_{huile}}{C_{eau}}$$

avec  $C_{huile}$  et  $C_{eau}$  les concentrations de TEMPO dans l'huile et dans l'eau.

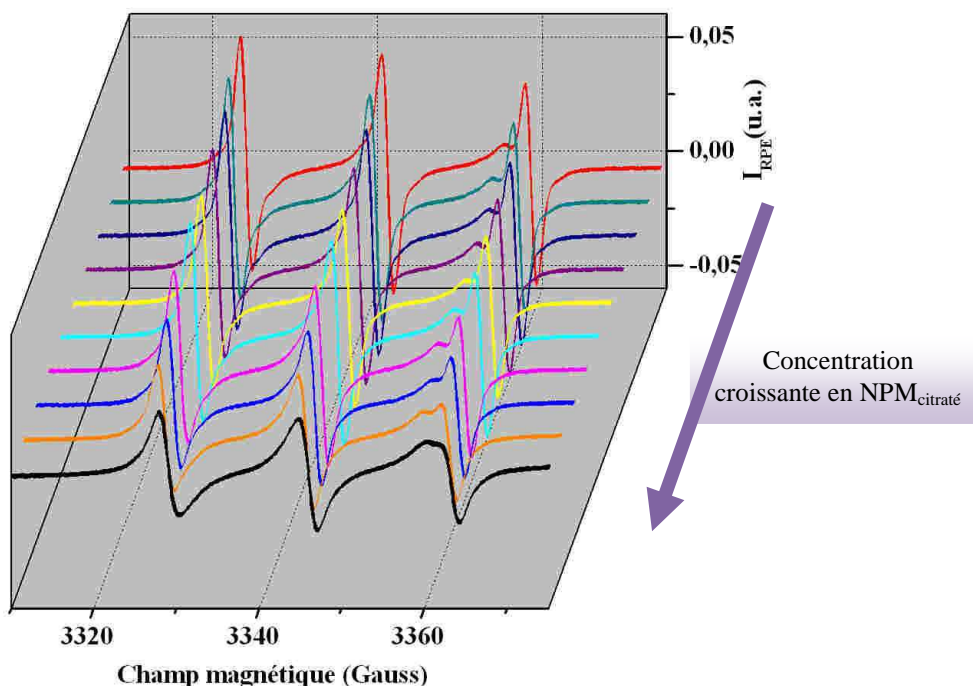
La double intégration du signal RPE étant proportionnelle au nombre de spin et connaissant le

pourcentage de chacune des phases, nous pouvons en déduire :  $K = \frac{I_{huile}/1,25\%}{I_{eau}/98,75\%}$  avec  $I_{huile}$  et  $I_{eau}$ , les

valeurs de la double intégration du signal dans l'huile (phase hydrophobe) et dans l'eau (phase continue aqueuse). Pour une émulsion à 1,25%, à  $\delta 50$  ( $[TEMPO]=2,1 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ ) nous obtenons

$K_{\delta 50} = 40$  et à  $\delta 70$  ( $[\text{TEMPO}] = 1,3 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ ),  $K_{\delta 70} = 39$ . Ainsi,  $\log K_{\delta 50} = \log K_{\delta 70} = 1,60$ , cette valeur signifie que dans le mélange DU/R-(+)-limonène-eau, le TEMPO aura plus d'affinité pour la phase hydrophobe. Le coefficient de partition est un paramètre important, c'est une valeur qui est maintenue constante tout au long de l'étude de la diffusion de PA en préservant l'équilibre du système. De plus, la nature hydrophobe du TEMPO est un facteur crucial pour de futures études *in vitro* et *in vivo*.

L'évolution du signal RPE du TEMPO dans les émulsions a été suivie en fonction de la concentration relative d'un ferrofluide citraté (cf. § II.2.1.). Les résultats sont présentés sur la figure III.44.

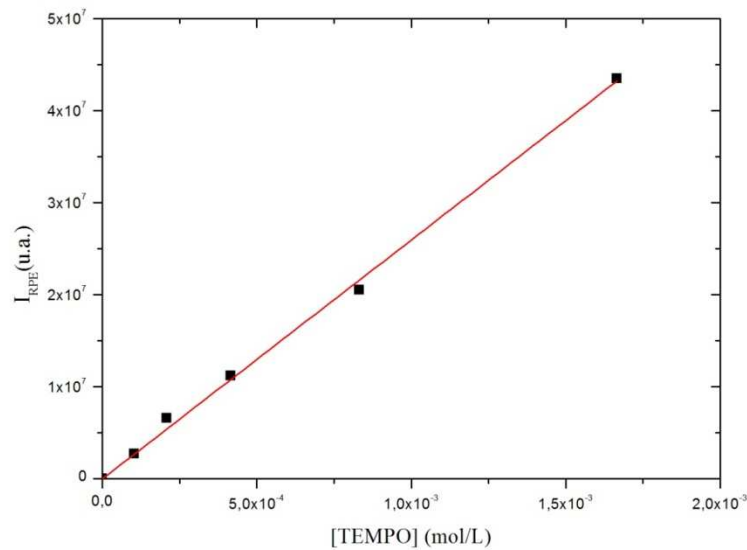


**Figure III.44. Evolution du signal RPE du TEMPO dans les Isasomes en fonction de la concentration relative en NPM citratés.**

Bien que la ligne RPE soit complexe dans ce cas de par la partition du TEMPO, il est clair que les spins des NPM modifient le signal RPE. Plus leur concentration augmente, plus les lignes se déforment. A la concentration en oxyde de fer la plus grande, les raies se sont tellement élargies que le dédoublement est masqué. A la simple observation de ces spectres, il n'est pas possible de dire si l'élargissement des raies ne concerne que la contribution du TEMPO dans l'eau ou dans les deux milieux. Le découplage des deux contributions sur de tels signaux RPE s'avère compliqué.

Dans la suite, nous nous sommes intéressés à la diffusion du TEMPO hors du gel. Dans un tube à essai en polypropylène (le même qui sert pour le chauffage par hyperthermie magnétique), le gel magnétique est introduit encore chaud de façon à ce qu'il moule le fond du tube. Il est refroidi pendant une heure à  $4^{\circ}\text{C}$  pour que le système (les Isasomes plus particulièrement) revienne dans son état d'équilibre. Ensuite, 1 mL d'eau déionisée est versé au-dessus du gel, une infime quantité de cette eau sera prélevée dans un demi-capillaire en quartz de 0,8 mm de diamètre interne et analysée en RPE.

La double intégration de la ligne RPE est directement proportionnelle au nombre de spins. En calculant pour des concentrations en TEMPO connues, nous avons pu calibrer cette sonde de spin.



**Figure III.45. Calibration de la concentration de TEMPO dans l'eau, droite d'équation**

$$I_{RPE} = 2,59472 \times 10^{10} \times [TEMPO].$$

A tout moment, nous pouvons connaître la concentration exacte de TEMPO en solution grâce à cette courbe de calibration. Des cinétiques de diffusion à différentes températures ont pu être entreprises sur notre système. D'autre part, une comparaison des systèmes avec ou sans émulsion a pu être effectuée. Ces résultats sont présentés dans les paragraphes suivants.

### III.3.3. Etude de la diffusion du PA hors du gel dans des systèmes avec et sans émulsion

Cette étude a été menée sur deux types de gels, les températures ont été régulées par un bain thermostaté externe. Deux types de gel ont été utilisés :

- un gel de  $\kappa$ -carrageenan contenant  $NPM_{\text{citratées}}$ , émulsion à  $\delta 50 + TEMPO + NP$  enrobées d'acide oléique ;
- un gel de  $\kappa$ -carrageenan avec  $NPM_{\text{citratées}}$  mais sans émulsion. Dans ce cas, le TEMPO a été dissous dans l'eau du gel à la même concentration que dans l'émulsion à  $\delta 50$ .

Sur les graphiques de la figure III.46. et III.47., ces gels seront simplement nommés « avec émulsion » et « sans émulsion ». La diffusion du TEMPO hors des gels magnétiques a été suivie à température ambiante fixée à 20 et à 30°C. A 30°C, la mesure au temps zéro a été faite une fois que le bain thermostaté est stabilisé à cette température. Des prélèvements dans la phase aqueuse au-dessus du gel ont été effectués toutes les 30 minutes à l'aide d'un capillaire de 0,8 mm de diamètre. Le capillaire est ensuite placé dans la cavité RPE, à chaque fois nous avons fait un spectre large de 7000 Gauss pour vérifier si des NPM se sont échappées de la matrice polymérique et un spectre pour le TEMPO. Le programme winEPR nous a permis de collecter et analyser les données. La courbe de calibration et la

double intégration du signal du TEMPO nous a permis de remonter à sa concentration exacte dans le capillaire. L'intensité du signal RPE de NPM est proportionnelle à la susceptibilité magnétique, qui est elle-même proportionnelle au nombre de particules. L'intensité du signal de résonance ferromagnétique est directement proportionnelle à la quantité de nanoparticules en solution. Le rapport signal/bruit étant très important pour les mesures aux temps inférieurs à 60 minutes, il n'a pas été possible de mesurer l'intensité sur ces spectres, les graphiques de la figure III.47. commencent donc à 60 minutes.

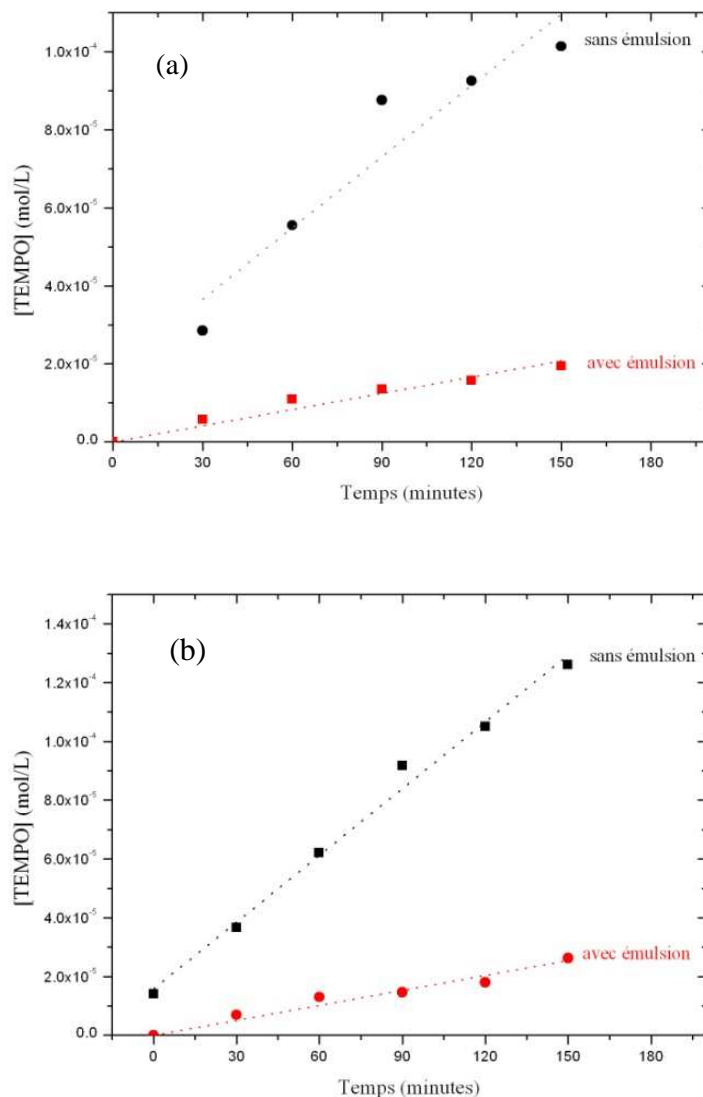
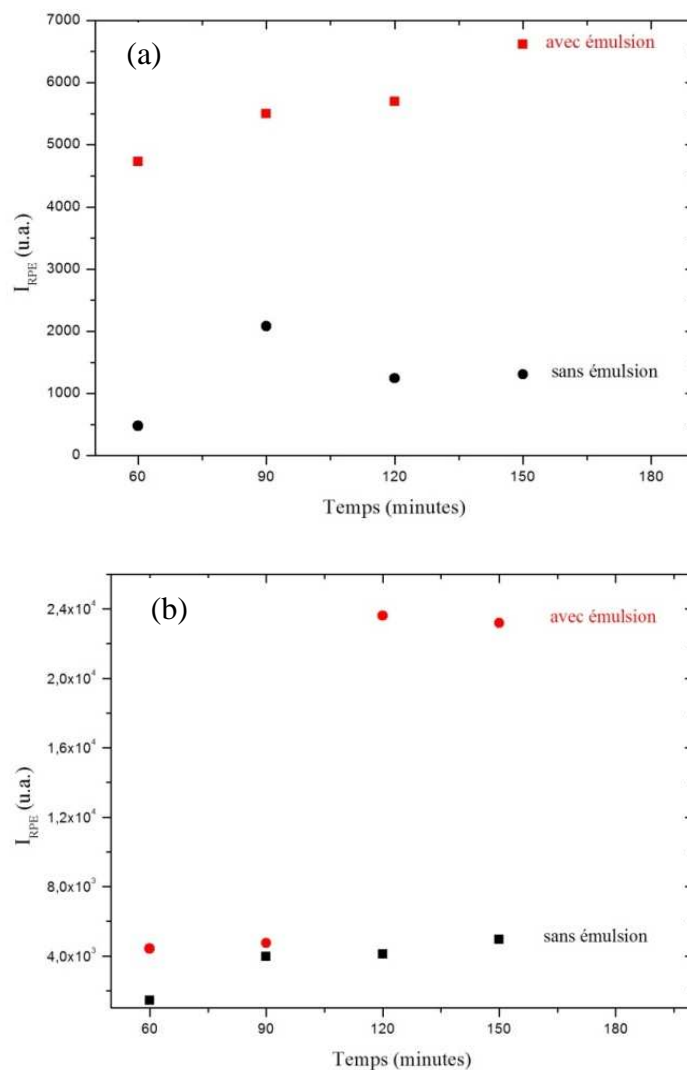


Figure III.46. Diffusion du TEMPO avec et sans émulsion à 20°C (a) et à 30°C (b).





**Figure III.47. Diffusion des NPM avec et sans émulsion à 20°C (a) et à 30°C (b).**

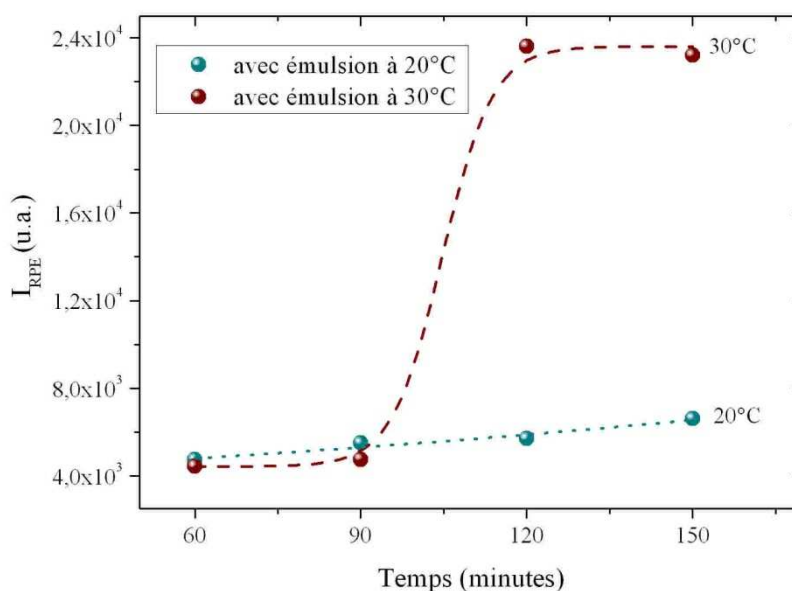
Tout d'abord, il est important de souligner que le signal obtenu dans la phase aqueuse au-dessus du gel correspond exactement à la ligne du TEMPO dans l'eau signifiant que les Isasomes demeurent piégés dans la matrice de  $\kappa$ -carrageenan. Pour le gel sans émulsion, dès l'instant zéro, la diffusion a commencé, ce qui n'est pas le cas pour le gel avec émulsion où la diffusion hors du gel est ralentie. Les Isasomes constituent une barrière et retiennent les molécules de TEMPO avant activation et limite leur diffusion. En plus de cette barrière lipidique, les molécules de tensioactifs adsorbées à la surface des émulsions sont elles aussi une barrière. Les molécules de TEMPO confinées dans les Isasomes doivent donc franchir tous ces « obstacles » avant de se trouver dans la phase aqueuse de l'hydrogel. Dans l'hydrogel sans émulsion, les radicaux nitroxydes sont déjà solubilisés dans la phase aqueuse, les seuls paramètres entrant en compte sont la mobilité et le libre parcours moyen des molécules à travers l'hydrogel. D'après les graphiques de la figure III.46., la diffusion du TEMPO suit une loi relativement linéaire en fonction du temps.

	Avec émulsion	Sans émulsion
20°C	$1,38 \cdot 10^{-7}$ M/s	$6,09 \cdot 10^{-7}$ M/s
30°C	$1,70 \cdot 10^{-7}$ M/s	$7,57 \cdot 10^{-7}$ M/s

**Tableau III.9. Vitesse de diffusion du TEMPO hors des gels avec ou sans émulsion à 20 et 30°C.**

La pente des droites donne une vitesse de diffusion du TEMPO (cf tableau III.9.). La vitesse de diffusion du TEMPO hors des gels sans émulsion est à peu près 4,5 fois plus importante que dans les gels avec émulsion. Les émulsions dans l'hydrogel freinent la diffusion, elles sont une sorte de barrière. La présence des Isasomes dans le gel même à 1,25% en masse influence la quantité de NPM qui sort du gel. En effet, leur signal est beaucoup plus intense pour les gels avec émulsions que pour les gels sans émulsions. A 20°C, plus de particules magnétiques sont sorties du gel en présence d'émulsion que sans, bien que leurs vitesses soient comparables.

A 30°C, la pente est plus abrupte qu'à 20°C, montrant ainsi qu'augmenter la température accroît la vitesse de diffusion du TEMPO.



**Figure III.48. Diffusion des NPM hors du gel à 20 et 30°C.**

L'augmentation de température influe peu aux temps courts (<90 minutes, voir figure III.48.) sur la diffusion des NPM. Au-delà de 90 minutes l'intensité varie de manière abrupte et augmente d'un facteur 6. Le signal des NPM passe de 7000 à 20°C à  $2,4 \times 10^4$  à 30°C pour des temps supérieurs à 180 minutes. Cette variation brusque semble indiquer une modification structurale agissant sur la diffusion des NPM. La diffusion du TEMPO n'étant pas influencée, il ne s'agit pas d'une transition structurale au sein des Isasomes, mais plutôt dans la conformation des chaînes de  $\kappa$ -carrageenan (gel physique non réticulé).

### III.3.4. Etude de la diffusion du PA hors du gel en fonction du temps et de la température régulée par un bain externe

Préalablement aux essais thermomagnétiques, nous avons voulu déterminer l'effet exact de la température sur la diffusion du TEMPO hors du gel dans la phase eau. Une étude en temps et en température a donc été effectuée en se servant d'un bain thermostaté qui ajuste la température du gel. Trois températures ont été examinées 20°C, 30°C et 37°C. Le gel a été placé dans un tube en polypropylène avec 1 mL d'eau au-dessus du gel et le tube plongé à hauteur du gel dans le bain-marie à la température désirée. Pour les températures de 30 et 37°C, nous avons attendu que la température du bain soit stable avant la première mesure.

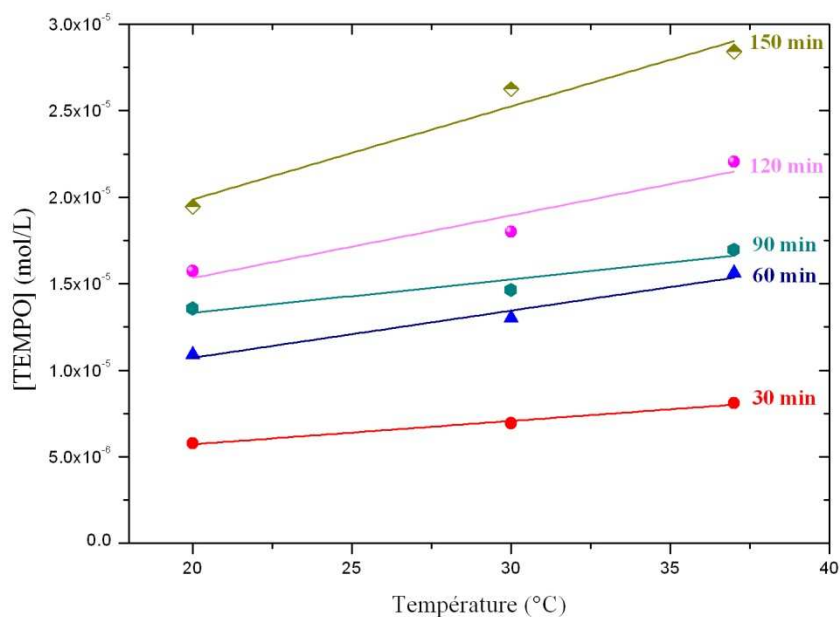
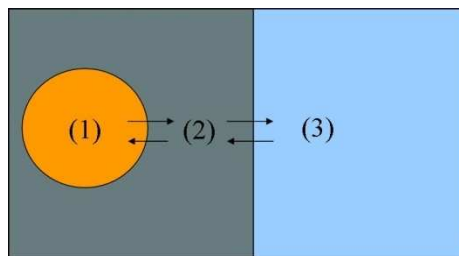


Figure III.49. Diffusion du TEMPO hors des Isasomes en phase micellaire cubique (stabilisées par la lécithine).

La cinétique de diffusion du TEMPO dépend de la température de façon linéaire. La concentration initiale en TEMPO à l'intérieur du gel contenant 1,25% d'Isasomes est de  $2,1 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ . Après 150 minutes à 37°C, seulement 14% des molécules de TEMPO sont sorties du gel, la cinétique de diffusion est donc très lente. En suivant ce régime linéaire, le TEMPO (PA) pourra diffuser pendant presque 18 heures, alors qu'il serait rapidement épuisé dans le gel sans émulsion (4,5 fois plus vite, soit 4 heures). Ceci fait de notre système de délivrance, un système performant dans la durée d'application. Cette cinétique lente est la conséquence d'équilibres multiples au sein de notre système. Le TEMPO sort de l'émulsion au fur et à mesure que l'équilibre du milieu est perturbé à partir du système extérieur (l'eau (3)) comme le montre le schéma de la figure III.50.



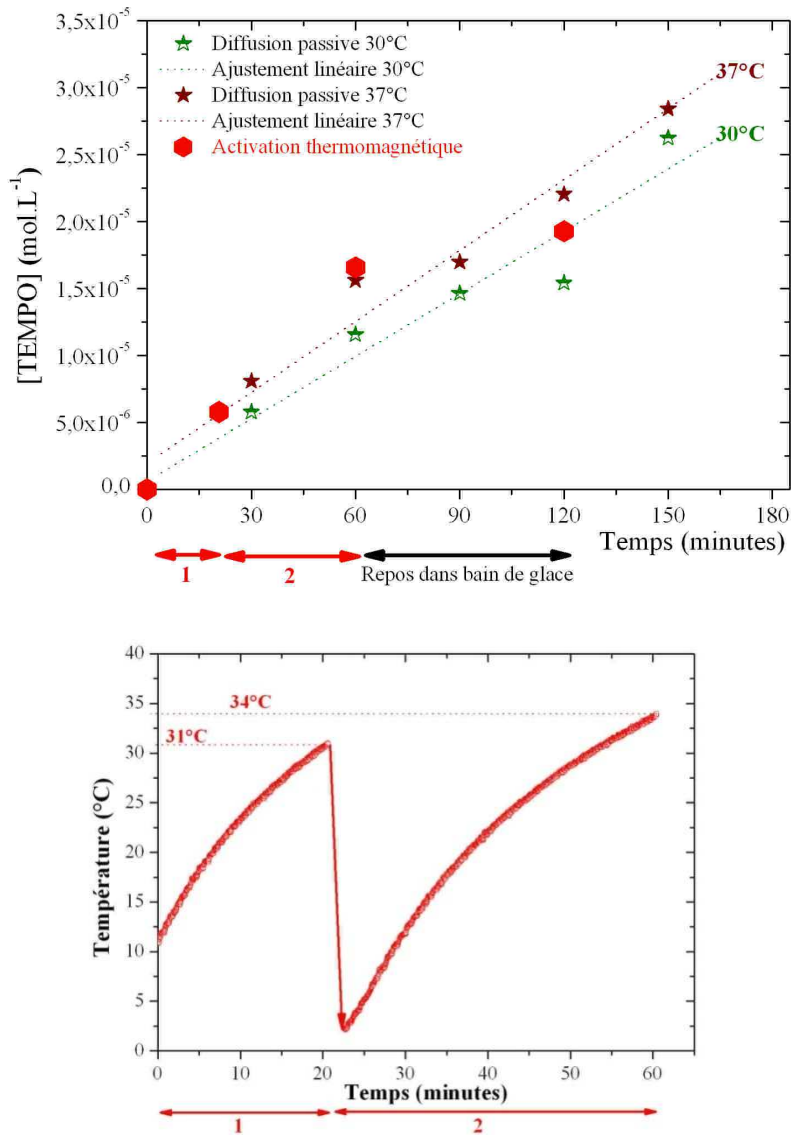
**Figure III.50. Système d'équilibre entre un Isosome (1), le gel (2) et l'eau (3).**

Un gradient de concentration s'installe au sein du système et déplace l'équilibre de celui-ci. Le coefficient de partition calculé précédemment nous indique que l'équilibre au sein des Isosomes doit être conservé pour maintenir le coefficient constant. En rajoutant de l'eau au-dessus de l'hydrogel, la concentration de TEMPO au sein du gel diminue, donc la concentration du TEMPO dans la phase hydrophobe va aussi diminuer pour équilibrer le système. En augmentant la température, la mobilité des molécules de radicaux augmentent agissant sur la vitesse de diffusion.

### **III.3.5. Etude de la délivrance du PA hors du gel par activation thermomagnétique**

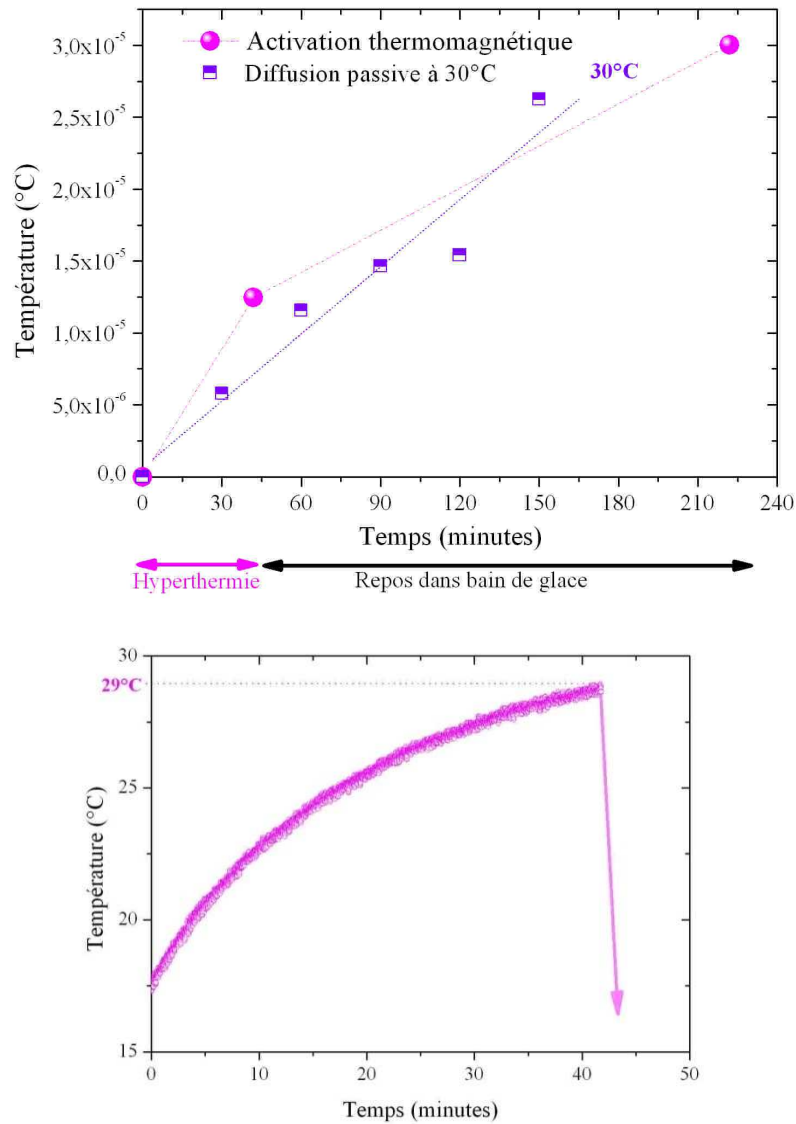
Nous venons de voir qu'il est possible de libérer les molécules de TEMPO sous l'effet d'une élévation de la température régulée par un bain externe thermostaté. Dans cette étude, la diffusion a été suivie par RPE après activation par échauffement magnétique des NPM. Le gel est placé sous champ magnétique alternatif de fréquence 108 kHz et d'amplitude 88 mT dans le tube en polypropylène avec l'eau au-dessus du gel. La sonde fluoroptique est plongée dans le gel. La température est enregistrée en fonction du temps. Lorsque l'hyperthermie magnétique est arrêtée, le prélèvement de la phase aqueuse est effectué à une température connue et à un temps donné. Lorsque le gel est à nouveau au repos (c'est-à-dire sans champ magnétique), il est plongé dans un bain de glace dans le but de ralentir voire stopper la diffusion. Les essais par activation thermomagnétique ont été comparés aux résultats obtenus avec la régulation par un bain thermostaté.

Dans l'exemple de la figure III.51., deux hyperthermies successives ont été pratiquées au sein de l'hydrogel. La première a duré 20 minutes pour une température finale de 31°C et la seconde a duré un peu moins de 40 minutes pour aboutir à 34°C. La conséquence directe de l'échauffement local du aux NPM est la diffusion des molécules de TEMPO hors du gel dans la phase eau. La comparaison de la diffusion thermomagnétique dite « active » à la diffusion « passive » (régulation par bain) à températures fixes n'indique aucun autre effet notable de l'activation magnétique que l'influence de la température sur la libération du PA. Ainsi le système répond de la même manière (même quantité de TEMPO libérée aux différences de température près) que par contrôle externe de la température. Lorsque le gel est par la suite maintenu dans un bain de glace, la diffusion est ralentie comme supposé par la baisse de température.



**Figure III.51. Diffusion du TEMPO hors du gel magnétique (contenant des Isasomes en phase micellaire cubique) activé par stimulation thermomagnétique. La phase eau au dessus du gel a été analysée par RPE à l'issue de chacun des deux échauffements magnétiques (région 1 et 2) et après repos du gel dans un bain de glace.**

La figure III.52. est un exemple supplémentaire de l'effet de l'activation thermomagnétique sur le gel magnétique. L'échauffement magnétique du gel a atteint 29°C au bout de 40 minutes sous champ magnétique alternatif. Une fois le prélèvement effectué, le tube est placé dans un bain de glace.



**Figure III.52. Diffusion du TEMPO hors du gel magnétique (contenant des Isasomes en phase micellaire cubique) activé par stimulation thermomagnétique. Le prélèvement de la phase eau est effectué à l'issue de l'échauffement magnétique à 29°C et après une période de repos dans un bain de glace.**

On peut ainsi observer par RPE la libération des molécules de TEMPO hors du gel par échauffement des nanoparticules magnétiques. L'échauffement magnétique est comparable à l'élévation de température en bain thermostaté. La libération du PA en est la conséquence, on peut donc parler de libération de PA stimulée par l'échauffement des NPM sous champ magnétique alternatif. Après avoir stoppé le champ, les molécules de TEMPO continuent à sortir du gel au repos (bain de glace) ce qui correspond à la diffusion passive à cette température.

### **III.4. Conclusion du chapitre III**

Le gel thermosensible composé de  $\kappa$ -carrageenan, de NPM et d'Isasomes s'avère être un système très intéressant pour la libération prolongée de PA. Les Isasomes ont pour rôle de stocker des molécules de PA et ont permis de réguler leur libération. Dans cette étude, nous avons montré que la stimulation thermomagnétique a pour effet le déclenchement de la diffusion en fonction de la température d'échauffement des NPM dans le gel. Même si la méthode mise en place pour l'étude de la diffusion demande des améliorations, ce travail a permis de valider le concept d'utilisation du TEMPO et de la RPE dans les mesures de diffusion de PA.





# Chapitre IV

## Hydrogel réticulé par les nanoparticules magnétiques

---

*« Qu'est-ce que la vie? L'usufruit d'une agrégation de molécules. »*

*Les frères Goncourt*

---

<b>Chapitre IV</b>	
<b>Hydrogel réticulé par les nanoparticules magnétiques.....</b>	<b>113</b>
<b>IV.1. Introduction.....</b>	<b>115</b>
<b>IV.2. Modification de surface des NPM.....</b>	<b>116</b>
<b>IV.2.1. Etat de surface des NPM.....</b>	<b>116</b>
<b>IV.2.2. Méthodes de silanisation : Comparaison de la silanisation par US et par traitement thermique.....</b>	<b>118</b>
<i>IV.2.2.a. Détermination du point isoélectrique.....</i>	<i>120</i>
<i>IV.2.2.b. Analyse par spectrométrie IRTF des nanoparticules silanisées....</i>	<i>121</i>
<i>IV.2.2.c. Microscopie électronique en transmission.....</i>	<i>123</i>
<i>IV.2.2.d. Analyse thermogravimétrique.....</i>	<i>125</i>
<b>IV.2.3. Modification de surface des NPM silanisées par des fonctions carboxyliques.....</b>	<b>126</b>
<i>IV.2.3.a. Détermination du PI par zétamétrie.....</i>	<i>126</i>
<i>IV.2.3.b. Analyse par spectrométrie IRTF.....</i>	<i>127</i>
<i>IV.2.3.c. Microscopie électronique en transmission.....</i>	<i>128</i>
<b>IV.3. Réticulation des chaînes d'acide hyaluronique par les NPM modifiées.....</b>	<b>129</b>
<b>IV.3.1. Hydrogel magnétique d'acide hyaluronique : principe de la réticulation.....</b>	<b>129</b>
<b>IV.3.2. Liaison des NPM à l'hydrogel.....</b>	<b>130</b>

---

## IV.1. Introduction

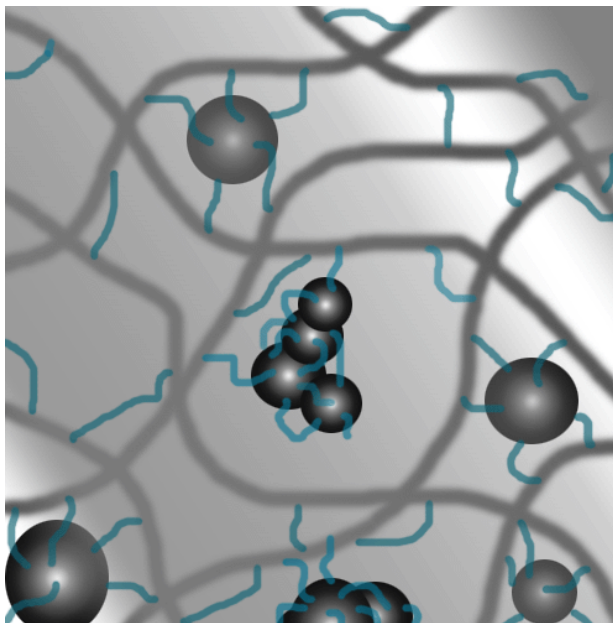


Figure IV.1. Schéma de la réticulation de l'hydrogel par les NPM.

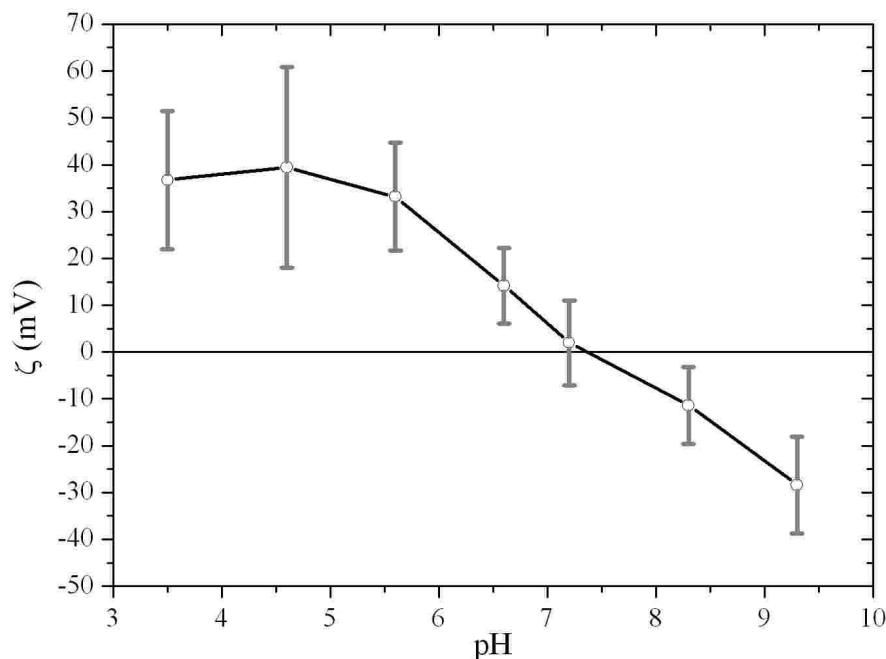
Cette partie de mon travail de thèse est consacrée à la modification de surface des nanoparticules magnétiques d'oxyde de fer dans le but d'y greffer différents groupes fonctionnels. Ces groupes devront permettre une interaction avec l'acide hyaluronique (HA) pour créer cette fois un gel réticulé. L'HA a été isolé en 1934 par Meyer et Palmer de l'humeur vitreuse bovine [Meyer K. *et al.*, 1934]. Il est l'une des principales composantes de la matrice extracellulaire et est présent en concentration élevée dans un certain nombre de tissus (le cartilage, le liquide synovial, la peau, le cordon ombilical, le cerveau, les muscles etc.). Ses fonctions biologiques sont entre autres le maintien de la viscoélasticité des tissus, de la lubrification (dans les cartilages, les muscles) et de l'hydratation (grâce à sa capacité de rétention d'eau). Il entre aussi en jeu dans la mitose, la migration cellulaire, le développement des tumeurs et des métastases, ainsi que dans les processus d'inflammation [Necas J. *et al.*, 2008]. Depuis, l'HA est largement utilisé dans les formulations cosmétiques, pharmacologiques, dans l'ingénierie tissulaire et semble prometteur en tant qu'agent de la délivrance de PA [Nishinari K. *et al.*, 2003 ; Yun Y. H. *et al.*, 2003 ].

Jusqu'à présent, les travaux existants montrent l'adsorption de l'HA sur des nanoparticules d'oxydes de fer (sans lien chimique) par interactions électrostatiques jouant ainsi sur les propriétés polyélectrolytiques de l'HA [Kumar A. *et al.*, 2007 ; Yang P. F. *et al.*, 2007 ; Lee Y. *et al.*, 2008]. La fonctionnalisation des NPM ainsi que sa caractérisation sont d'importance primordiale dans les applications biomédicales. Le fait d'attacher chimiquement des molécules aux cœurs magnétiques évite au matériau de se déliter en milieu biologique. Nous avons opté pour une modification de surface multiétape permettant à tout moment de la synthèse de récupérer les hybrides magnétiques possédant de nouveaux groupements fonctionnels. Cette chimie à plusieurs étapes, bien que plus contraignante dans la durée, a permis et permettra dans le futur d'explorer une plus large gamme de macromolécules greffées. Ce chapitre présente essentiellement les résultats de la fonctionnalisation.

## IV.2. Modification de surface des NPM

### IV.2.1. Etat de surface des NPM

La stabilité d'une suspension colloïdale chargée est directement liée à la double couche électrique (composée de la couche de Stern et de la couche diffuse séparées par le plan d'Helmholtz) présente autour de chaque particule. La valeur du potentiel au plan d'Helmholtz est le potentiel zeta  $\zeta$ , seule valeur accessible expérimentalement. Il est déterminé par la mobilité électrophorétique en appliquant l'équation de Henry dans un solvant polaire :  $U_E = \frac{\varepsilon\zeta}{\eta}$  où  $U_E$  est la mobilité électrophorétique,  $\varepsilon$  la constante diélectrique,  $\eta$  la viscosité du milieu,  $\zeta$  le potentiel (mV). Pour chaque valeur de pH, le potentiel  $\zeta$  a été mesurée à 5-6 reprises à l'aide du zetasizer Nanoseries de Malvern. Une distribution de potentiel autour de la valeur la plus probable, en ajustant les données par une loi de type gaussien, on obtient la valeur du potentiel  $\zeta$  que l'on moyenne sur l'ensemble des mesures. La largeur à mi-hauteur correspond à l'erreur indiquée sur les graphes.

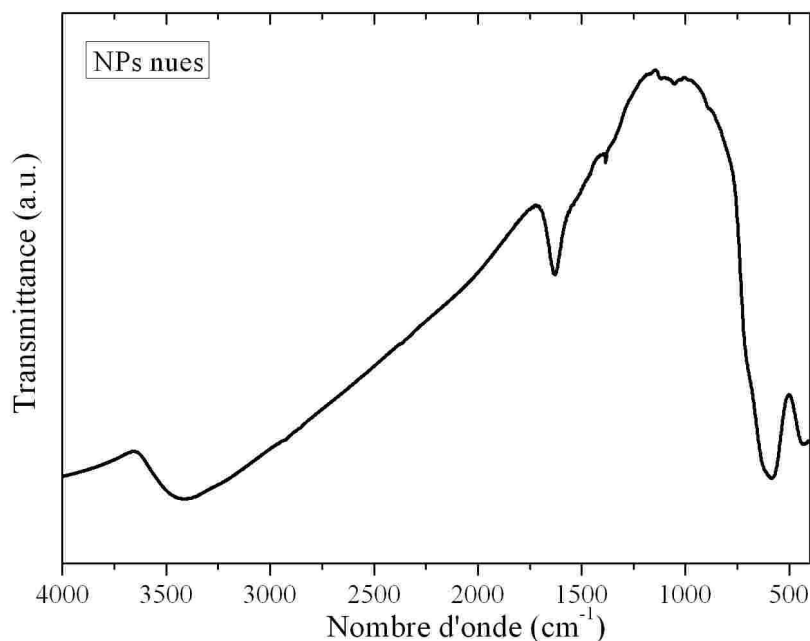


**Figure IV.2. Potentiel zêta ( $\zeta$ ) des NPs non enrobées (nues) dispersées dans l'eau à pH acide ( $\text{HNO}_3$ ). Le PI des NPs nues est proche de 7 conformément à ce qu'il a été observé dans la littérature [Vayssières L. *et al.*, 1998 ; Mornet S., 2002].**

En général, une suspension colloïdale soumise à des interactions électrostatiques est considérée stable lorsque le potentiel  $\zeta$  est supérieur 30 mV en valeur absolue. D'après la figure IV.2., le ferrofluide est stable à pH très acide ou très basique et le point isoélectrique (PI), valeur pour laquelle le potentiel est nul est atteint à  $\text{pH}=7,1$ , en accord avec les données de la littérature [Vayssières L. *et al.*, 1998 ; Mornet S., 2002].

Les spectres infrarouge (IR) sont collectés sur un spectromètre Thermo Scientific Nicolet™ FT-IR. Un échantillon du ferrofluide floculé, séché puis broyé est mélangé à du KBr (3% en masse de NPM). La

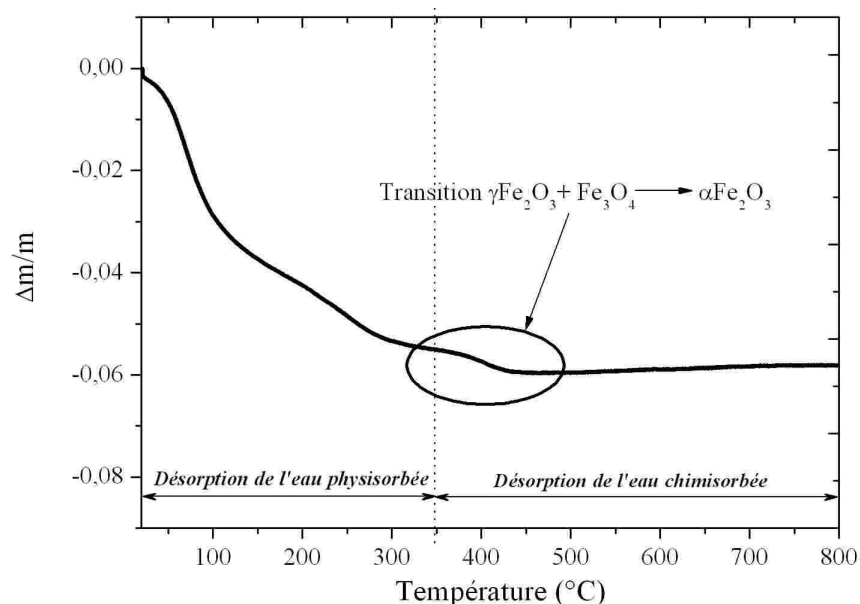
poudre est comprimé de sorte à faire une pastille que l'on va placer dans le porte-échantillon pour l'analyse IR en transmission. La figure IV.3. montre le spectre infrarouge à transformée de Fourier (IRTF) mesuré, qui est caractéristique des oxydes de structure spinelle. Deux larges bandes sont visibles vers 580 et 630  $\text{cm}^{-1}$  des vibrations des liaisons Fe-O.



**Figure IV.3. Spectre IRTF des nanoparticules d'oxyde de fer nues.**

La large bande autour de 3400  $\text{cm}^{-1}$  est due aux vibrations d'élongation des hydroxyles et de l'eau physisorbée à la surface. La coordinence des cations ferriques et ferreux en surface des particules est satisfaite par la présence de groupements hydroxyles qui sont soumis aux contraintes physico-chimiques de leur environnement local. En solution aqueuse, ces groupes de surface interagissent très fortement avec l'eau : des couches d'eau se forment en surface des nanoparticules.

Dans la technique d'analyse thermogravimétrique, l'échantillon est chauffé depuis la température ambiante jusqu'à 800°C à une vitesse constante de montée en température de 2°C par minute. Grâce au dispositif utilisé, une électrobalance Setaram TG-DTA 92-18, la perte de masse liée à l'eau ou à d'éventuelles réactions chimiques est mesurée suivant la montée en température. La faible rampe de température utilisée permet d'éviter les effets d'inertie de la perte de masse par rapport à la température réellement appliquée, on mesure donc les pertes de masse induites par les réactions de décomposition à leur température thermodynamique. Dans le four, l'échantillon est placé sous un flux d'oxygène. En faisant des hypothèses sur les réactions chimiques possibles et les produits de décomposition, cette technique permet d'évaluer de manière quantitative les différents composés dont est constitué l'échantillon.

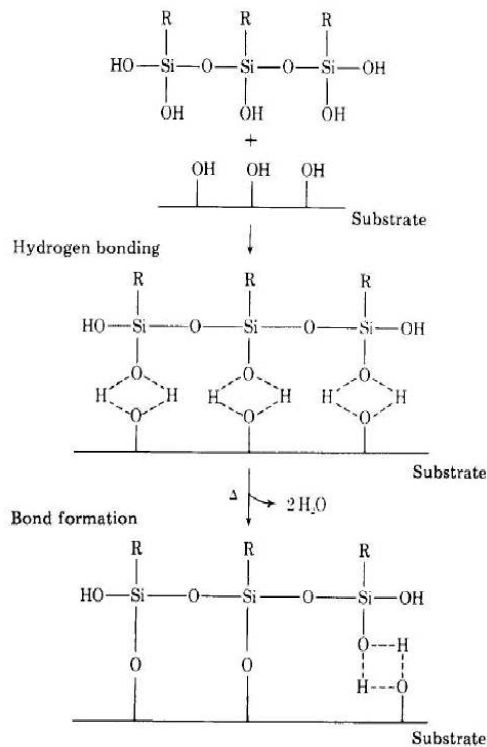


**Figure IV.4. Courbe de perte de masse relative d'un échantillon de nanoparticules d'oxyde de fer.**

La perte de masse observée pour l'échantillon de NPM non fonctionnalisées peut être attribuée essentiellement à la présence de molécules d'eau adsorbées en surface de la nanoparticule. Deux processus entrent en jeu dans le cas présent, et sont présentés sur la figure IV.4. : la désorption de l'eau physisorbée jusqu'à 350°C et la désorption de l'eau chimisorbée au-delà de cette température. Vers 420°C, une transition de phase de la magnétite/maghémite à l'hématite est observée ; elle est accompagnée de l'élimination d'une grande quantité d'eau due à la réorganisation des atomes de fer de surface [Mornet S., 2001].

#### **IV.2.2. Méthodes de silanisation : Comparaison de la silanisation par US et par traitement thermique**

Des études récentes se sont portées sur la modification des NPs par des agents de couplage silaniques [Xu Z. *et al.*, 1997 ; Mornet S. *et al.*, 2005 ; Flesh C. *et al.*, 2005 ; Sonvico F. *et al.*, 2005 ; Steitz B. *et al.*, 2007 ; Wu W. *et al.*, 2008 ; Hervé K. *et al.*, 2008]. Le mécanisme de greffage de ces molécules en solution aqueuse à la surface d'un oxyde se décrit en trois étapes [Arkles B., 1977] et conduit à la formation d'un film polysiloxane autour des NPM par condensation avec les hydroxyles à leur surface.



**Figure IV.5. Dernières étapes de formation d'un film de polysiloxane sur un substrat présentant des groupes hydroxyles en surface selon Arkles B. [Arkles B., 1977].**

Nous avons choisi d'utiliser des alcoxysilanes aminés de type aminopropyltriéthoxysilane (APS) du fait que les amines présentent un grand choix de réactions chimiques mettant en jeu des liaisons covalentes tout en conservant une surface hydrophile. Les propriétés de l'APS pur en solution aqueuse ont été étudiées précédemment [Ishida H. *et al.*, 1978].

La simplicité de la réaction de greffage de l'APS avec les hydroxyles de surface des NPM se heurte néanmoins aux problèmes d'interaction et de repliement de ces fonctions amines avec la surface des oxydes. Ce problème a largement été étudié dans les travaux de Mornet S. *et al.*, et il semblerait qu'un traitement thermique modéré sous vide permette d'optimiser le greffage et de retourner les groupes amines vers l'extérieur du film polysiloxane [Mornet S., 2002]. Deux méthodes de greffage ont été utilisées dans cette étude : la silanisation par ultrasons (US) et la silanisation par traitement thermique.

- **Protocole de silanisation par US dans l'éthanol absolu:**

Les nanoparticules synthétisées par coprécipitation sont lavées et dispersées à la concentration de  $3,5 \cdot 10^{-2}$  mol/L dans 50 mL d'une solution d'éthanol absolu à l'aide d'US pendant une heure. Cette suspension est versée dans un ballon de 100 mL placée sur un agitateur magnétique à une vitesse de 500 rpm et dégazée à l'argon 10 minutes. Par la suite, 1,5 mL d'APS (98%, Aldrich) sont ajoutés à l'aide d'une seringue à travers un septum en caoutchouc. Le mélange est agité magnétiquement pendant 12 heures et une heure aux US. Les NPM silanisées sont récupérées à l'aide d'un aimant en néodyme et lavées à l'éthanol puis à l'acétone.

- **Protocole de silanisation par traitement thermique modéré dans un mélange eau/méthanol [Mornet S., 2001]:**

Dans le second protocole de greffage, un volume de 100 mL de ferrofluide peptisé par l'acide nitrique à pH=2 dans l'eau déionisée (3,5 mmol de fer) est versé dans un ballon bicol sous agitation magnétique (500 rpm). 100 mL de méthanol anhydre sont ajoutés au ferrofluide, le mélange est homogénéisé et bullé à l'argon pendant 10 minutes. L'APS (10,5 mmol, 4,2 mol/L, 3 équivalents molaires) est prélevé avec une seringue et ajouté à la solution. La réaction est conduite pendant 12 heures sous agitation. Au bout de 12 heures, 100 mL de glycérol (99,9%, Aldrich) sont versés et la dispersion est homogénéisée. Le méthanol et l'eau sont extraits à l'aide d'un évaporateur rotatif sous vide connecté à un piège à azote (méthanol, 40°C et eau, 80°C) pendant 1 heure. Le traitement thermique est prolongé dans une étuve sous vide à 100°C pendant 2 heures. Après refroidissement, les NPM modifiées sont extraites par lavage avec un mélange éthanol/acétone (1 : 2) sous agitation lente de sorte à éliminer l'excès de silanes oligomérisés. Les NPM sont décantées magnétiquement et lavées trois fois par un mélange eau-acétone 30-70.

#### ***IV.2.2.a. Détermination du point isoélectrique***

La modification des groupements de surface entraîne un changement de la charge de surface des NPs et qui s'accompagne d'une variation du potentiel  $\zeta$ . L'efficacité d'un greffage peut donc être suivie en mesurant ce potentiel en fonction du pH, ce qui permet de déterminer le point isoélectrique (PI)<sup>7</sup> caractéristique des groupements superficiels des molécules greffées. Les deux lots de NPM silanisées ont été dispersés dans l'eau par peptisation acide (HNO<sub>3</sub>, pH 2-3, 1,82 gFe/L). Le ferrofluide acide est dilué 5 fois dans une solution à 10<sup>-4</sup> mol/L de NaCl, l'ajustement du pH se fait par addition de soude dans la solution. Le potentiel  $\zeta$  en fonction du pH est mesuré à force ionique constante.

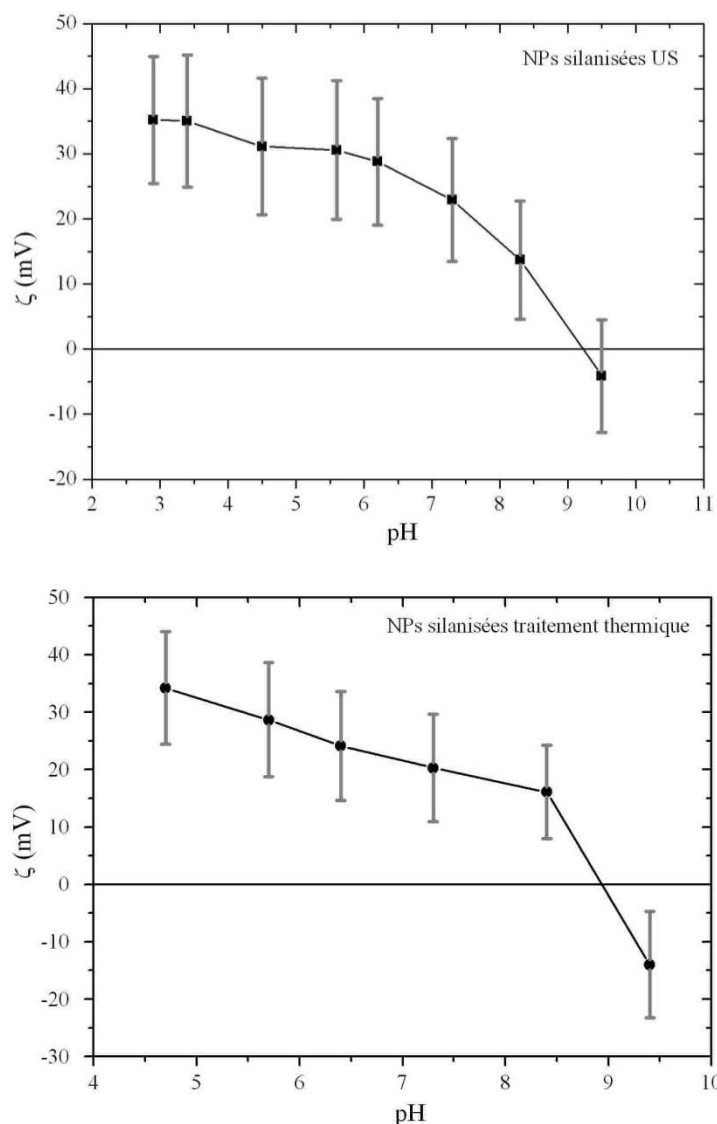
Les propriétés physicochimiques des surfaces des NPM ont été modifiées suite à la réaction de fonctionnalisation par l'APS. En comparant les figures IV.2 et IV.6., on constate un déplacement de la valeur du PI vers un pH supérieur à 9 dans les deux cas, indiquant ainsi la présence de nouvelles fonctions en surface.

Le pK<sub>a</sub> de l'aminopropyl étant de 10,4, on s'attendait à un PI plus proche de cette valeur. Cette plus faible valeur du PI laisse à penser que la présence de silanol en surface ainsi que d'autres interactions mettant en jeu les amines de l'APS greffé (les repliant notamment vers les hydroxyles de surface) abaissent ce PI idéal de 10,4 [Mornet S., 2001]. Aucune différence significative n'est observée en zétamétrie entre les deux protocoles de greffage.

---

<sup>7</sup> pH où les NPs en solution ont un potentiel électrique neutre par compensation des charges (autant de charges positives que négatives).

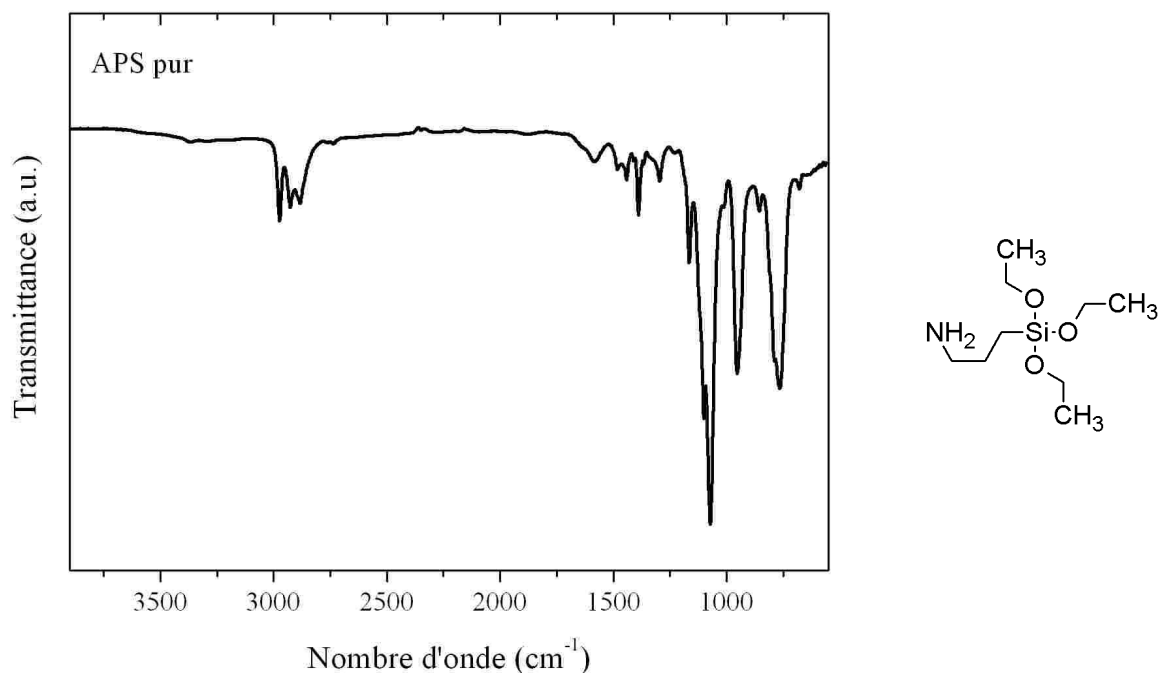




**Figure IV.6. Potentiel  $\zeta$  des NPM silanisées selon les deux protocoles en fonction de pH du milieu. Les valeurs de PI sont décalées vers les pH>9 (le PI des NP nues étant proche de 7) indiquent une modification de surface.**

#### ***IV.2.2.b. Analyse par spectrométrie IRTF des nanoparticules silanisées***

L'IR permet de mettre en évidence la présence des espèces adsorbées et/ou greffées à la surface des NPM au travers de vibrations caractéristiques. Dans un premier temps, nous avons caractérisé les bandes de l'APS pur présenté sur la figure IV.7. Pour cela, une goutte d'APS pur a été déposée sur le cristal en Ge du module de réflexion du spectromètre Nicolet.

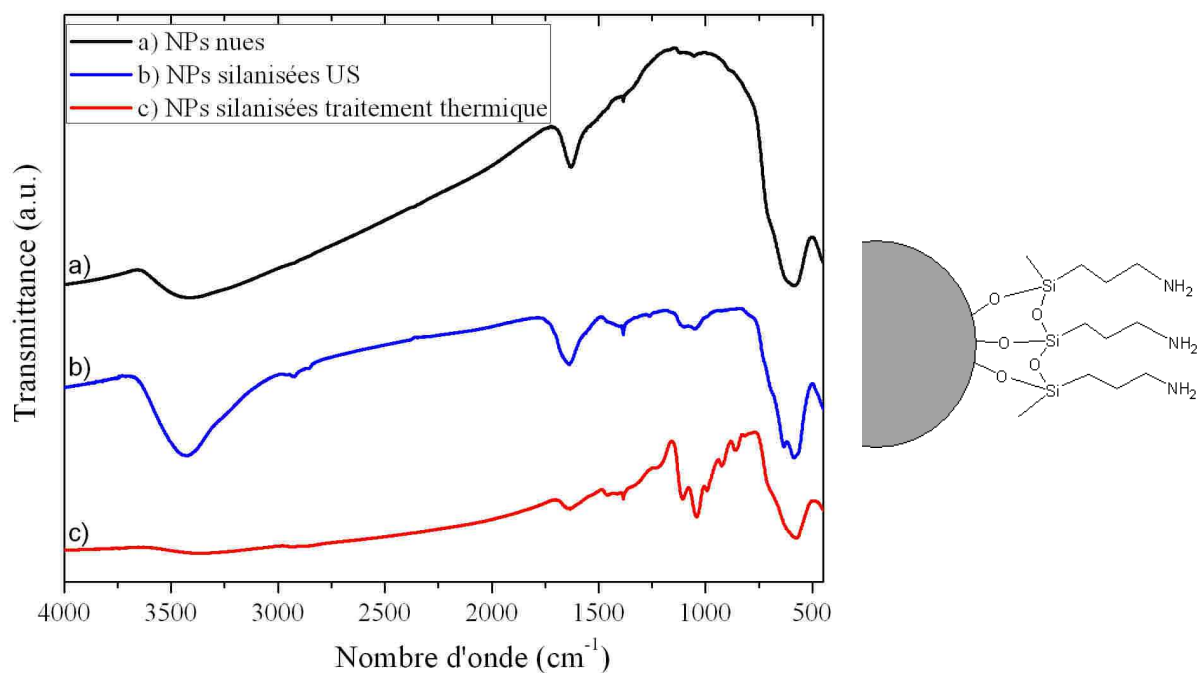


**Figure IV.7. Spectre infrarouge en réflexion de l'aminopropyltriéthoxysilane (APS) pur (120 accumulations, résolution 4 cm<sup>-1</sup>).**

Parmi les bandes caractéristiques de l'APS certaines nous intéressent plus particulièrement. Les modes d'élongation et de cisaillement des fonctions amines sont situés à 3290, 3370 et 1580 cm<sup>-1</sup>. Dans la zone de 800 cm<sup>-1</sup>, la bande est attribuée aux vibrations d'élongation symétrique de Si-O-CH<sub>3</sub>, à 1080 et 1170 cm<sup>-1</sup> les vibrations sont également dues aux groupes éthyloxy de l'APS, plus précisément aux vibrations de valence de Si-O-C et de déformation de O-CH<sub>3</sub>, respectivement.

Sur la figure IV.8. sont présentées les spectres IRTF en transmission (par la méthode de la pastille 3% de NPM dans KBr) correspondants aux NPM modifiées par les aminosilanes.

Tout d'abord, nous remarquons que le spectre (c) des NPM modifiées par traitement thermique est de loin celui qui diffère le plus par rapport au spectre des NPM nues et qui met le plus en évidence l'APS. En effet, sur le spectre (b) des NPM issues de la silanisation par US, les bandes caractéristiques de l'enrobage par l'aminosilane apparaissent peu, bien que la zétamétrie suggère que la fonctionnalisation a eu lieu.

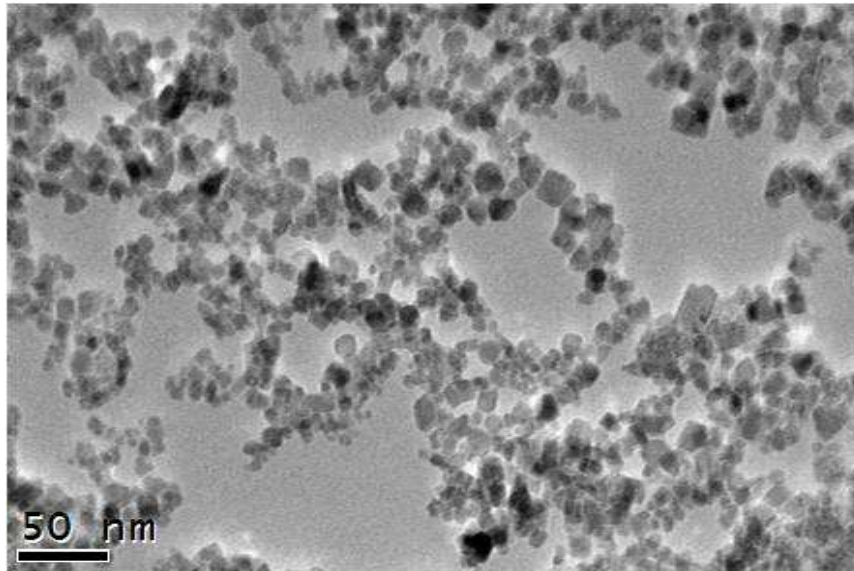


**Figure IV.8. Spectres IRTF entre 450 et 4000  $\text{cm}^{-1}$  des NPs nues et modifiées par l'APS selon les deux méthodes de greffage (120 accumulations, résolution 4  $\text{cm}^{-1}$ ). A droite : schématisation du greffage de l'APS sur un NPM.**

La double bande autour de 580-630  $\text{cm}^{-1}$  atteste de la présence des NPM dans les échantillons. Les bandes intenses à 1041 et 1106  $\text{cm}^{-1}$  dans le spectre (c) sont attribuées aux vibrations des liaisons Si-O-Si montrant que la couche de silane est bien polymérisée autour des particules [Flesch C. *et al.*, 2005]. La présence des silanes est aussi révélée par les vibrations d'élongation des liaisons C-H à 2930 et 2850  $\text{cm}^{-1}$ , et des liaisons Si-CH<sub>2</sub> à 1216  $\text{cm}^{-1}$ , la bande de faible intensité située à 1461  $\text{cm}^{-1}$  est attribuée aux vibrations de déformation des groupes CH<sub>2</sub> conformément à ce qui a été observé par ailleurs [Mornet S. *et al.*, 2005]. Les bandes à 923 et 990  $\text{cm}^{-1}$  sont liées aux vibrations d'élongation des silanols résiduels Si-O. En effet, tous les Si n'ont pas participé à la polymérisation pour former des Si-O-Si. Une bande d'absorption de faible intensité est visible à 1250  $\text{cm}^{-1}$  qui est attribuée à la liaison C-N. Toutefois, la spectroscopie IR ne permet pas d'affirmer que l'APS est lié de manière covalente à la particule. En effet, l'existence des liaisons Fe-O-Si font apparaître une bande vibrationnelle autour de 856  $\text{cm}^{-1}$ , qui est difficile à discerner de la bande due aux NPM.

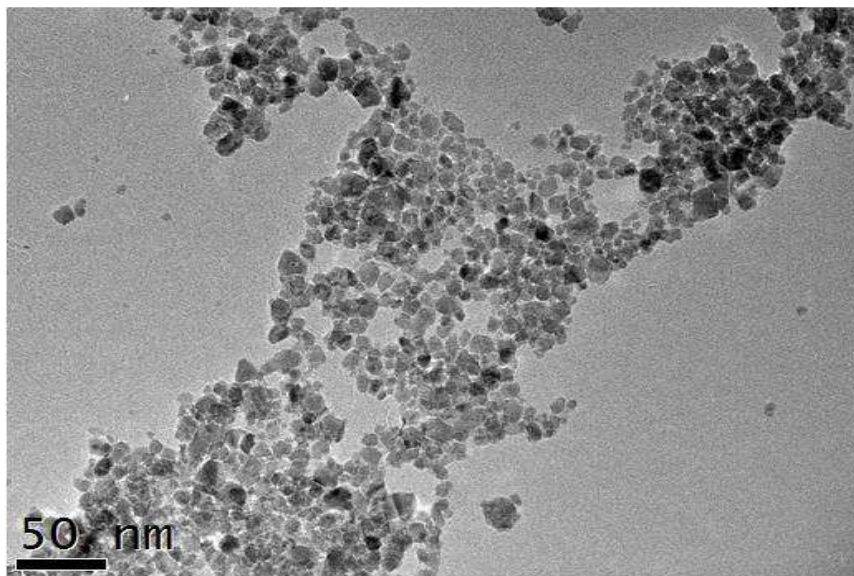
#### ***IV.2.2.c. Microscopie électronique en transmission***

Les clichés de MET des figures IV.9. et IV.10. concernant les échantillons de NPM silanisées présentent des nanoparticules d'oxyde de fer plus ou moins agrégées. Aucune différence n'est révélée par les images de microscopie entre les deux méthodes de silanisation. L'épaisseur de l'enrobage étant fine, celui-ci ne pourra pas être décelé par MET.

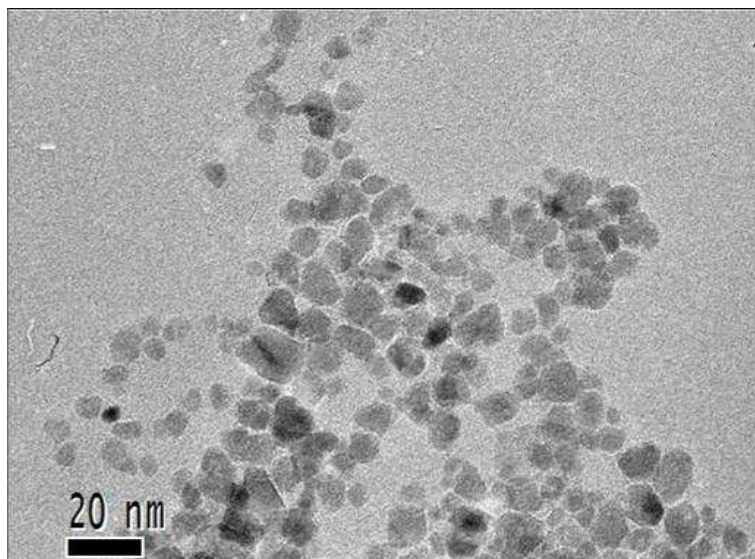


**Figure IV.9. Cliché MET de NPM silanisées par US.**

Sur la figure IV.10., nous pouvons observer plusieurs zones sur l'échantillon avec certaines où les particules semblent plus agglomérées. Une analyse semi-quantitative élémentaire EDX a permis de déterminer la proportion des silanes par rapport au fer. D'après cette analyse, les zones les plus agglomérées correspondent aussi aux zones présentant la plus faible proportion en silane, avec 2% environ contre 17% dans les autres zones comme celle exposée sur la figure IV.11.



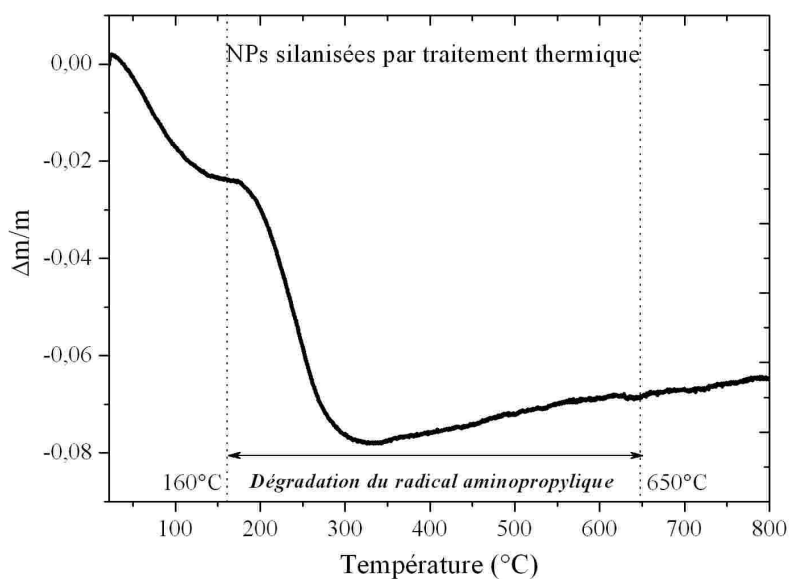
**Figure IV.10. Cliché MET de NPM silanisées par traitement thermique. L'image est caractéristique des différentes zones plus ou moins agrégées présentes sur la grille de MET, une analyse élémentaire EDX permet a permis de quantifier chacune de ses zones.**



**Figure IV.11. Cliché MET de NPs silanisées par traitement thermique. Cette image est le grossissement d'une zone moins agrégée de l'échantillon.**

#### *IV.2.2.d. Analyse thermogravimétrique*

L'ATG/ATD permet d'observer la décomposition des espèces présentes à la surface des NPM en fonction de la température. La dégradation de l'aminopropyle a lieu entre 160 et 650°C [Mornet S., 2001]. Des mesures ATG ont été réalisées sur les NPM silanisées par traitement thermique, qui ont présenté de meilleurs résultats suite au greffage (figure IV.12.).



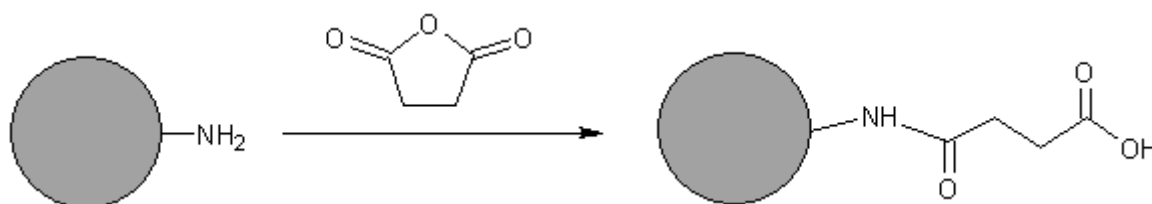
**Figure IV.12. Courbe ATG sur des nanoparticules d'oxyde de fer silanisées par traitement thermique. La prise en masse après 350°C est un artéfact de mesure dû à la poussée d'Archimède.**

A l'aide de la courbe ATG de la figure IV.12., il est possible de calculer la perte de masse relative de l'échantillon après dégradation du greffon. Ainsi, on constate que la dégradation de l'aminopropyle représente 5,4% de la masse totale de l'échantillon.

### IV.2.3. Modification de surface des NPM silanisées par des fonctions carboxyliques

L'étape qui suit le greffage des fonctions amino-silanes à la surface des NPM est un surgreffage ayant pour but de modifier les amines par des fonctions carboxyliques. Les NPM aminées par traitement thermique sont flocculées et récupérées par décantation magnétique. Elles sont ensuite rincées par une solution de diméthylsulfoxyde (10 mL, DMF, Aldrich). 1,75 mmol de NPM sont redispersées dans 50 mL de DMF en appliquant des US pendant 1 heure. La fonctionnalisation se fait par réaction de l'anhydride succinique avec les amines de surface. Cinq équivalents molaire d'anhydride (8,75 mmoles, 0,876 g) sont dissous dans un ballon contenant 20 mL de DMF. La dispersion de NPM est placée dans une ampoule à décanter reliée au ballon et ajoutée goutte à goutte à la solution d'anhydride sous forte agitation magnétique. La réaction est laissée 24 heures sous agitation continue ; puis, les NPM sont lavées avec le DMF d'abord puis avec de l'acétone afin d'éliminer les molécules organiques résiduelles.

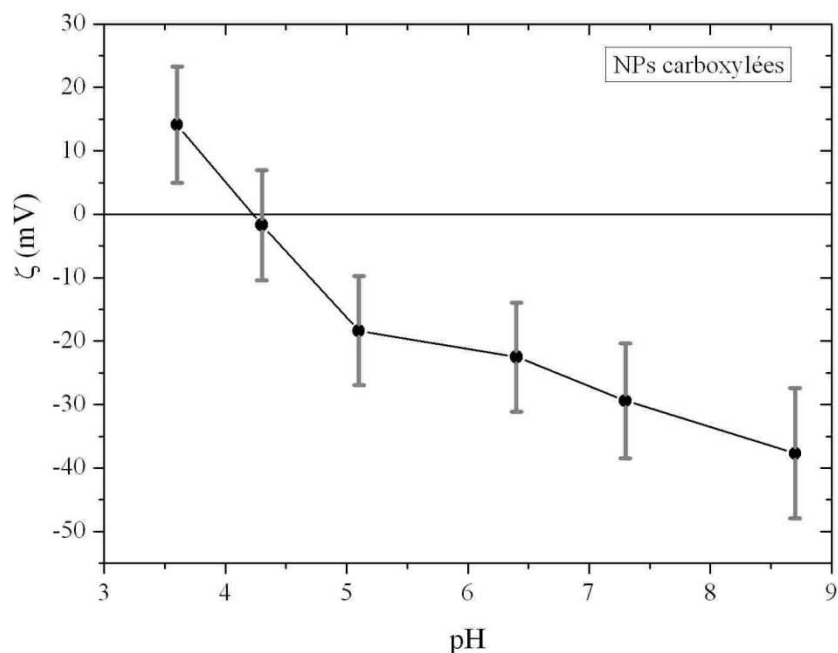
L'anhydride est l'agent de couplage dans la réaction de surgreffage. L'ouverture de l'anhydride succinique génère un lien amide et libère une fonction carboxylique selon le schéma réactionnel de la figure IV.12.



**Figure IV.12. Réaction de surgreffage des amines de surface des NPM par réaction de l'anhydride succinique.**

#### IV.2.3.a. Détermination du PI par zétamétrie

La mesure du potentiel  $\zeta$  en fonction du pH à force ionique constante (NaCl, 10<sup>-4</sup> mol/L) a été réalisée ; les valeurs sont reportées sur le graphique de la figure IV.13. Le PI des NPs carboxylées se situent à pH=4,2 et est donc décalé vers les valeurs de pH acides suite à la sur-fonctionnalisation. En effet, le pKa des fonctions carboxyliques est proche de 4-5. Le PI obtenu confirme donc la présence de fonctions carboxyliques à la surface des NPM.

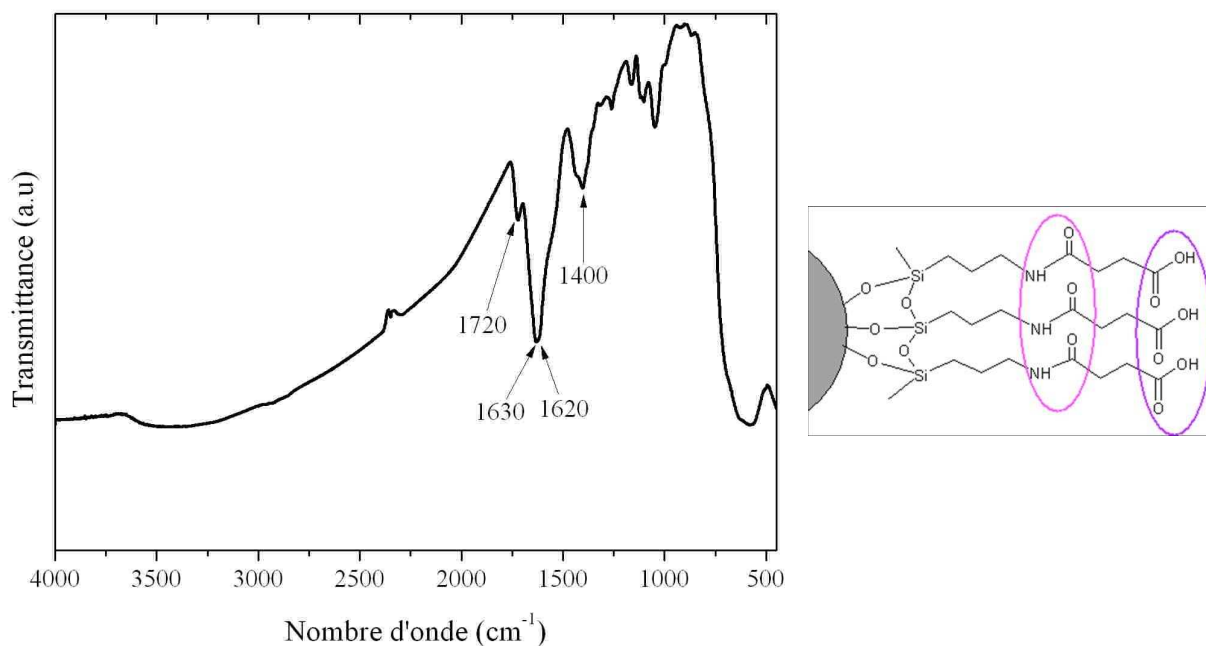


**Figure IV.13. Potentiel  $\zeta$  des NPs carboxylées en fonction du pH. Le PI est décalé vers les pH acides conformément au  $pK_a$  des fonctions carboxyles<sup>8</sup>.**

#### ***IV.2.3.b. Analyse par spectrométrie IRTF***

Les NPM ont été séchées et broyées à 3-4% en masse dans le KBr, la pastille est analysée en transmission, le spectre IRTF est représenté sur la figure IV.14. Plusieurs fonctions dans le greffage nous intéressent plus particulièrement, pour être repérées dans le spectre IR, elles sont entourées sur la figure IV.14 à droite. En effectuant le surgreffage, des liaisons amides sont normalement formées ( $R-CO-NR_2$ ) et des fonctions carboxyliques sont ajoutées en bout de chaînes. Sur le spectre IRTF, les groupements amides sont caractérisés par les bandes intenses à 1620 et 1630  $cm^{-1}$  correspondants à la vibration de déformation de la liaison N-H et à la vibration d'élongation de la liaison C=O, respectivement. L'épaule vers 1550  $cm^{-1}$  pourrait correspondre au groupe C-N-H de la fonction amide. Les bandes à 1720 et à 1400  $cm^{-1}$  sont attribuées aux vibrations d'élongation de la liaison C=O et de la liaison C-O des fonctions carboxyliques terminales.

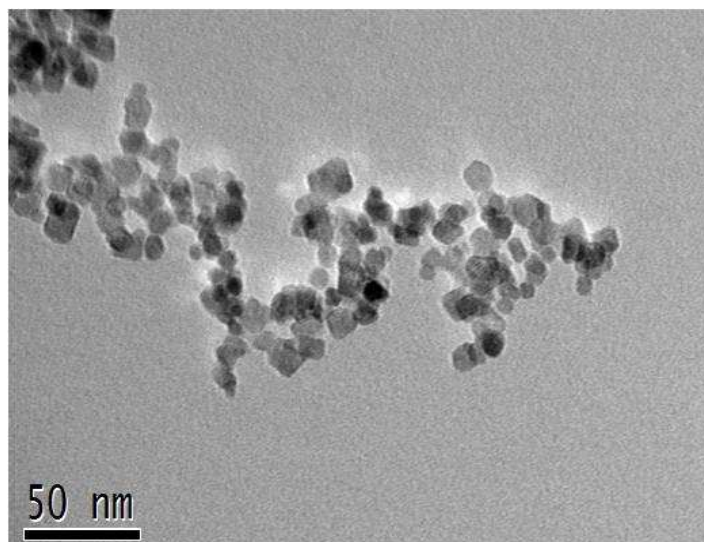
<sup>8</sup>  $pK_a(H-COOH/H-COO^-)=3,8$ ;  $pK_a(H_3C-COOH/H_3C-COO^-)=4,8$



**Figure IV.14.** Spectre IRTF de 450 à 4000  $\text{cm}^{-1}$  des NPs carboxylées (120 accumulations, résolution 4  $\text{cm}^{-1}$ ). Représentation des fonctions chimiques présentes sur la NPM après la réaction de surgreffage.

Par ailleurs, nous constatons que les bandes des vibrations Si-O-Si sont toujours présentes sur le spectre ainsi que la bande à 1260  $\text{cm}^{-1}$  de la liaison C-N, prouvant que le film d'APS autour de la particule ne s'est pas désorbé au cours de la réaction de surgreffage ; l'enrobage des NPM est donc stable. D'après le spectre IR le surgreffage a été réalisé avec succès.

#### *IV.2.3.c. Microscopie électronique en transmission*



**Figure IV.15.** Cliché MET des NPs carboxylées.

La visualisation des NPs carboxylées par MET présente des particules plus ou moins agrégées, de forme et de taille inchangées. La comparaison de ce cliché avec les clichés précédents ne permet pas de conclure quant à la réussite du greffage.



## IV.3. Réticulation des chaînes d'acide hyaluronique par les NPM modifiées

### IV.3.1. Hydrogel magnétique d'acide hyaluronique : principe de la réticulation

La formulation de l'acide hyaluronique sous forme d'hydrogel est très étudiée [van den Bekerom *et al.*, 2008 ; Yeo Y. *et al.*, 2007 ; Wang W., 2006 ; Collins M. N. *et al.*, 2006 ; Shah D. N. *et al.*, 2008]. L'unité répétitive de ce polymère est un disaccharide (N-acétylglucosamine et acide glucuronique) dont la masse molaire est de 400 Da<sup>9</sup>. Les motifs sont reliés par des liaisons glycosidiques de type  $\beta$ -1,4 [Weissmann B. *et al.*, 1952]. La longueur du motif de répétition du HA en solution est évaluée à 10 Å. L'HA peut atteindre une masse molaire de 4 millions de Da. Le pKa des acides glucuroniques est de l'ordre de 2,9 mais puisque le HA est un polyanion, un pH de 7,5 est nécessaire pour une neutralisation totale des groupements carboxylique. Les charges portées par l'HA conduisent à des interactions à courte et longue distance dont la contribution électrostatique peut être écrantée par la présence d'électrolytes. L'HA est donc très sensible à la présence de sel en solution et au pH.

L'HA que nous avons utilisé est de haut poids moléculaire : masse molaire de 10<sup>6</sup> Da, il est donc constitué de 2500 unités répétitives. Les groupements fonctionnels entrant en jeu sont essentiellement l'hydroxyle, le carboxyle et l'acétamide.

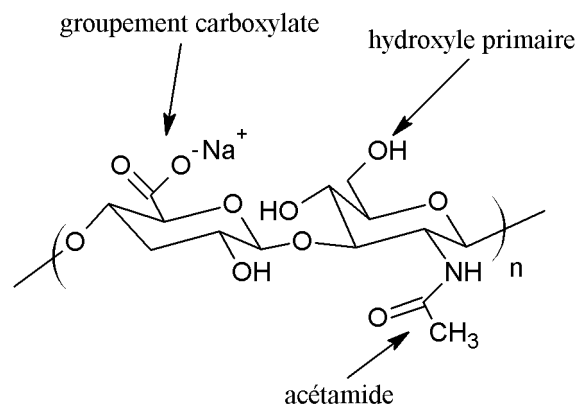


Figure IV.16. Unité répétitive de l'HA. Dans le cas de notre étude,  $n=2500$ .

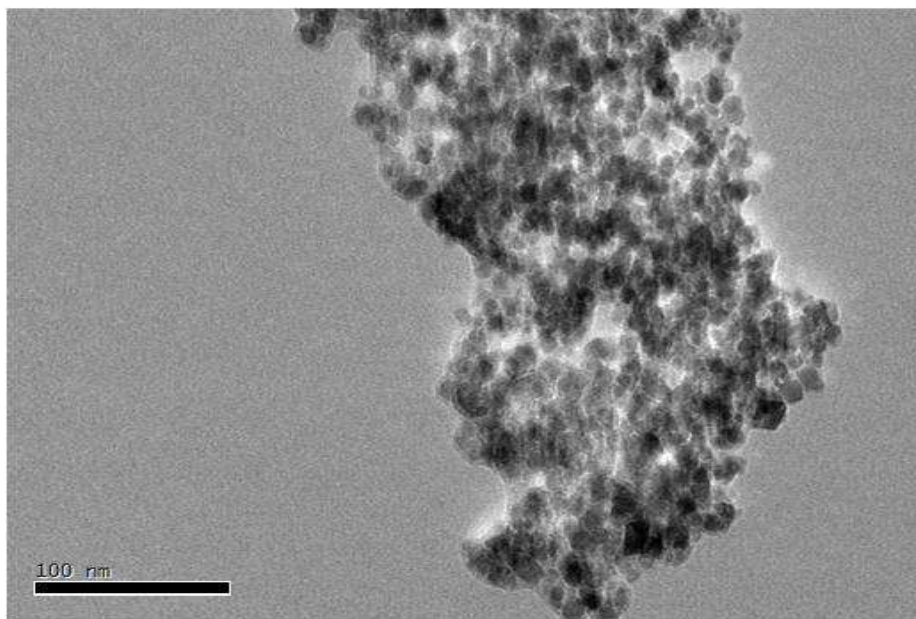
Pour obtenir un gel dit « chimique », il faut que la cohésion du gel soit assurée par des liaisons covalentes. Ces gels gonflent en bon solvant mais restent intacts, contrairement à un gel physique qui finit par se dissoudre. La longueur de corrélation entre chaînes augmente mais la cohésion du réseau est maintenue *via* les points de réticulation. La densité de points de réticulation est primordiale pour le rapport de gonflement. L'HA présente donc 2500 points de réticulation possibles par chaîne.

Quatre types d'agent de couplage peuvent être envisagés : le glutaraldéhyde (GTA), le 1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide (EDC), le divinylsulfone (DVS), le poly(éthylène glycol) diglycidyl éther (EX 810). L'hydrogel résultant présente différentes caractéristiques physico-chimiques selon l'agent de couplage [Collins M. N. *et al.*, 2006]. L'ajout d'un agent de liaison de type

<sup>9</sup> 1 Dalton (Da) = 1 g/mol

polymérique [Wang W., 2006 ; de la Fuente M. *et al.*, 2008 ; Yeo Y.*et al.*, 2007 ; Shah D. N. *et al.*, 2008] ou de type nanoparticulaire tels que les nanotubes de carbone [Bhattacharyya S. *et al.*, 2008] et les « quantum dots » [Kim J. *et al.*, 2007] ont également été envisagés dans plusieurs études, ces agents ont pour but de renforcer la structure de l'hydrogel.

Dans un premier temps, nous en avons mélangé une petite quantité avec des NPM afin d'observer le comportement du système au pH de l'eau déionisée ( $\text{pH} \approx 6$ ). Ainsi, une solution à 0,5 mg/mL de polymère a été préparée et introduit dans une suspension de NPM silanisées. A ce pH légèrement acide, les NPM sont plus ou moins stables avec un potentiel  $\zeta$  compris entre 20 et 30 mV, l'HA pour sa part est de charge négative. Les deux constituants étant de charge contraire, cela favorisera donc l'interaction électrostatique entre l'HA et les NPM. A l'ajout de l'HA, on constate que les NPM s'agglomèrent très fortement. L'image de MET de la figure IV.17. montre un agglomérat pris dans une gangue de polymère.

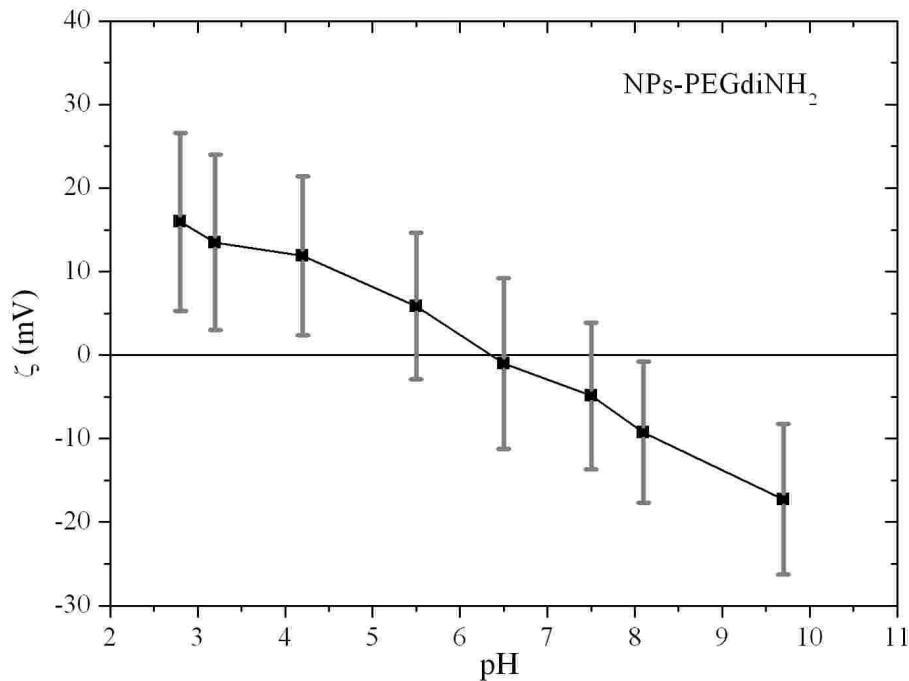


**Figure IV.17. Cliché MET d'un agglomérat de NPs silanisées mis en présence d'HA suite à l'observation de la forte agrégation en solution.**

### **IV.3.2. Liaison des NPM à l'hydrogel**

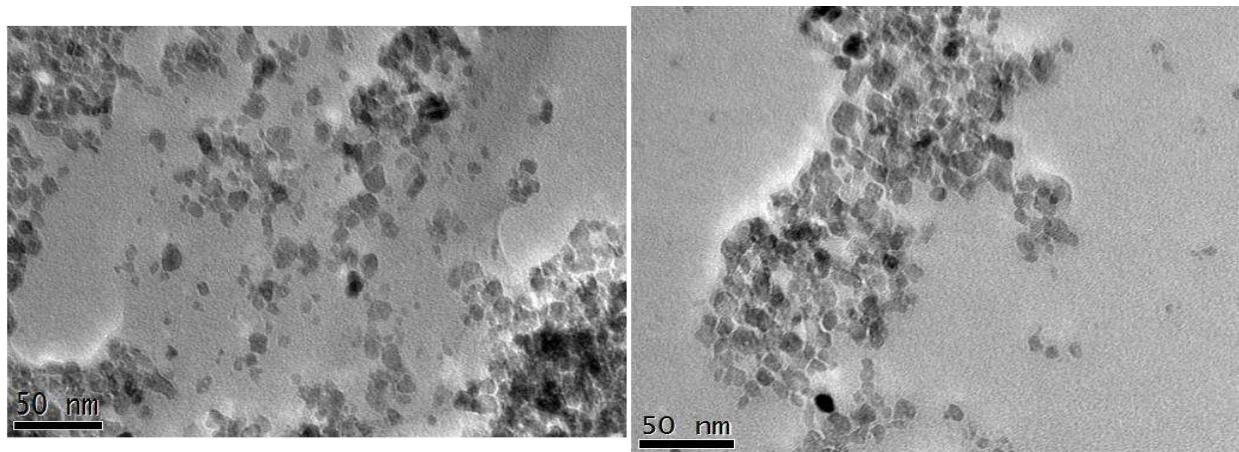
La première méthode mise en œuvre a consisté, dans un premier temps, en la fonctionnalisation des NPs carboxylées par le polyéthylène glycol diaminé (PEGdiNH<sub>2</sub>, Mw=3000, Sigma) et dans un second temps à faire réagir le PEGdiNH<sub>2</sub> avec l'HA. Le PEGdiNH<sub>2</sub> a par ailleurs été beaucoup employé dans des processus de fonctionnalisation de nanoparticules [Zhao H. *et al.*, 2008 ; Xiang G. *et al.*, 2008]. Une analyse du potentiel  $\zeta$  en fonction du pH de la solution a permis de mettre en évidence le risque de ce type de réaction. En effet, le PEGdiNH<sub>2</sub> présentant une fonction amine à ses deux extrémités, il devient difficile de contrôler la réaction, même en ajoutant le PEG en défaut. Les basses valeurs de  $\zeta$  comprises entre +20 et -20 mV montre l'instabilité du système et la possibilité de liaisons interparticulaires. En effet, la valeur de PI très basse (6,3 au lieu de 10,4),

montre que les fonctions amines du PEGdiNH<sub>2</sub> ne sont pas disponibles en surface des colloïdes. Ainsi, les NPM sont certainement couplées entre elles par le PEGdiNH<sub>2</sub>.



**Figure IV.18. Potentiel  $\zeta$  des NPM PEGylées en fonction du pH. Les valeurs de potentiel montre que la suspension n'est pas stable quelque soit le pH (liaisons entre NPM), la valeur du PI montre que les particules ne présentent pas d'amines en surface.**

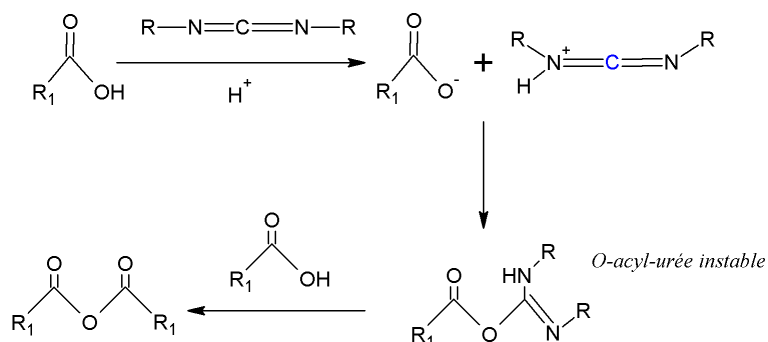
En microscopie, nous pouvons distinguer très nettement à certains endroits les NPs prises dans une gangue de polymère. La taille et la forme des particules demeurent inchangées avec toutefois une couche épaisse qui les entoure. Des agrégats sont visibles sur les clichés mais aussi des objets individuels.



**Figure IV.19. Clichés MET des NPs carboxylées PEGylées.**

La formation d'un hydrogel a également lieu *via* la réaction de couplage de l'HA en présence d'un carbodiimide (par exemple le 1-Ethyl-3-[3-diméthylaminopropyl]carbodiimide, EDC).

Cette réaction s'effectue en milieu aqueux et est décrite par la réaction suivante :



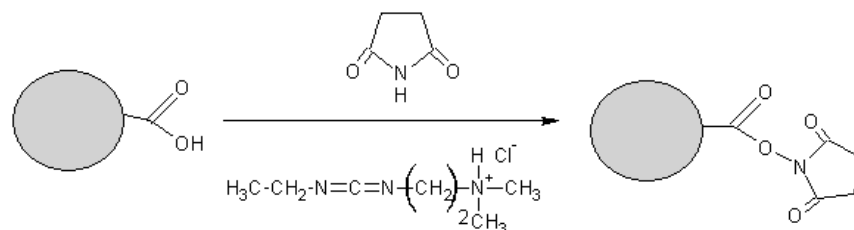
**Figure IV.20. Réaction de couplage de l'HA avec un carbodiimide.**

Les groupements carboxyles réagissent avec les molécules de carbodiimide pour former un anhydride, qui réagit ensuite avec ses groupements fonctionnels voisins pour donner des liaisons inter et intramoléculaires (voir schéma de la figure IV.20.).

La réaction entre les groupements carboxylates et les amines en milieu aqueux et en présence d'EDC est bien connue pour aboutir à des liaisons amides. D'après la littérature le PEGdNH<sub>2</sub> est utilisé pour le renforcement de la structure de l'hydrogel d'HA [Jeon O. *et al.*, 2007]. Il demeure intéressant de mettre à contribution le PEG comme agent de couplage entre les chaînes de l'HA et les NPM à l'aide de la réaction avec l'EDC. Cependant, il a été rapporté que le produit majoritairement obtenu suite à la formation du dérivé *O-acyl-urée*, est le *N-acyl-urée*. L'intermédiaire instable ne subissant pas ou très peu l'attaque nucléophile de l'amine primaire ajoutée en solution, la liaison amide est donc très peu formée [Kuo J.-W. *et al.*, 1991 ; Wang W., 2006]. Le réarrangement en *N-acyl-urée* peut être évité par formation d'un ester intermédiaire grâce au N-hydroxysuccinide (NHS) [Bulpitt P. *et al.*, 1999 ; Jeon O. *et al.*, 2007].

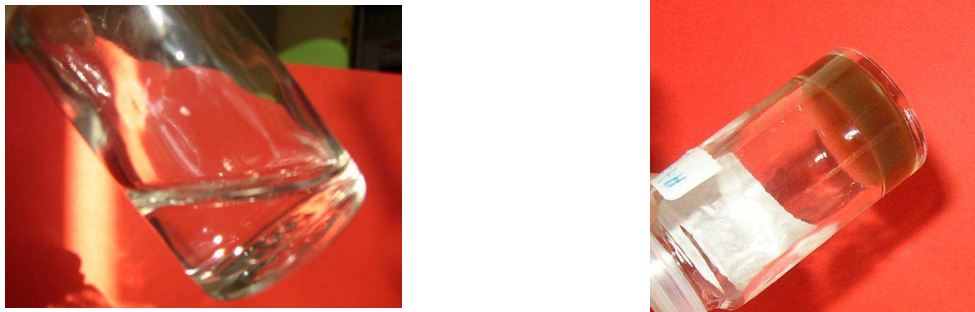
Dans un premier temps, nous avons dissous 15 mg d'HA dans 1 mL d'eau à pH légèrement acide (5 < pH < 6), puis nous y avons ajouté 100 µL de NaCl à 10<sup>-4</sup> mol/L. Le NaCl permet d'une part de maintenir le milieu à force ionique constante, mais aussi d'accroître la diffusion des chaînes de polymère dans la solution en les rendant plus flexibles (écranage des charges sur la chaîne) [Paraskevi H., 2004]. L'HA à cette concentration est un liquide très visqueux mais n'a pas la consistance d'un gel.

Les NPs carboxylées sont dispersées dans l'eau déionisée (15 minutes sous US) et activées par le couple NHS/EDC à la concentration de 0,045 et 0,176 mol/L respectivement. Une fois activées les NPM sont récupérées puis rincées à l'eau déionisée.



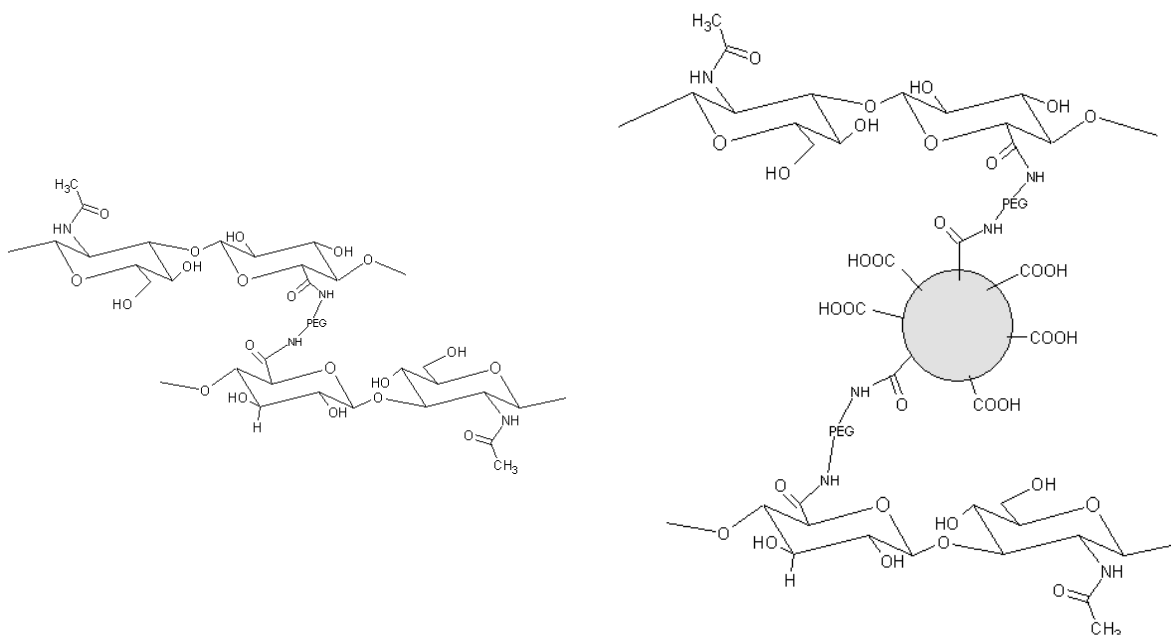
**Figure IV.21. Activation des NPs carboxylées par l'action du couple NHS/EDC.**

Le PEGdiNH<sub>2</sub> est pesé puis dissous à 30 mg/mL. Les NPM activées sont alors dispersées dans ce mélange de sorte que la réaction de couplage soit initiée. Immédiatement après, nous ajoutons le NHS/EDC (toujours à 0,045 et 0,176 mol/L) à l'HA. La solution contenant les NPM et le PEG est ajoutée goutte à goutte dans l'HA sous forte agitation. L'agitation est ensuite stoppée et un gel se forme.



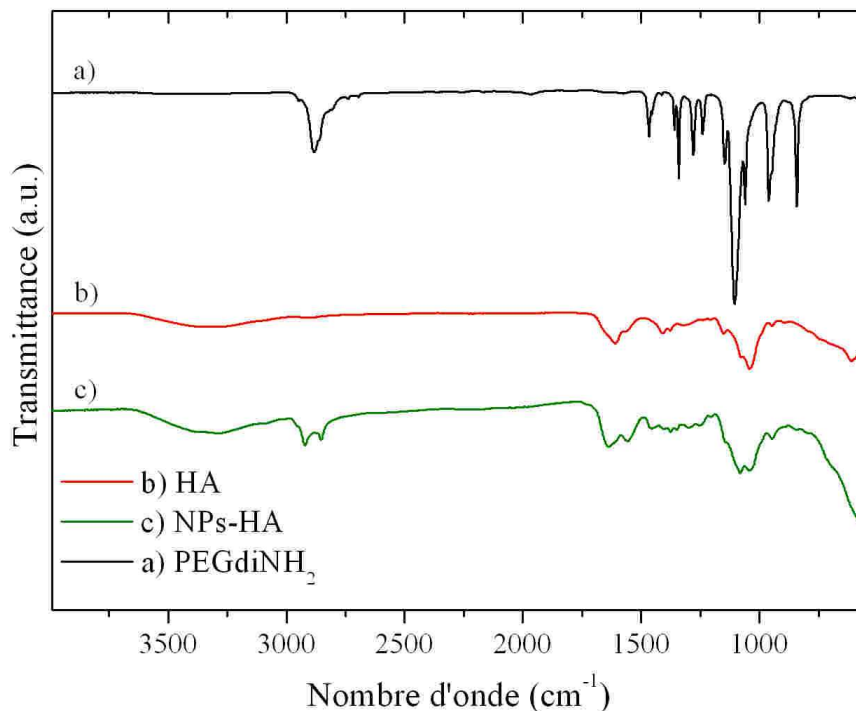
**Figure IV.22. Photos d'une solution visqueuse d'HA seul et du gel d'HA magnétique formé à partir de NPs carboxylées et de PEGdiNH<sub>2</sub> à la concentration de 7,5 mg/mL en HA.**

Afin de caractériser uniquement le greffage sur les NPM, une solution de NaCl (10<sup>-3</sup> mol/L) est ajoutée au gel préparé. Un mélange eau/acétone (50 : 50) est ensuite versée sur le gel, les NPM sont récupérées par décantation à l'aide d'un aimant. Les NPM résultantes ont été lyophilisées pour s'affranchir au maximum de l'eau adsorbée.



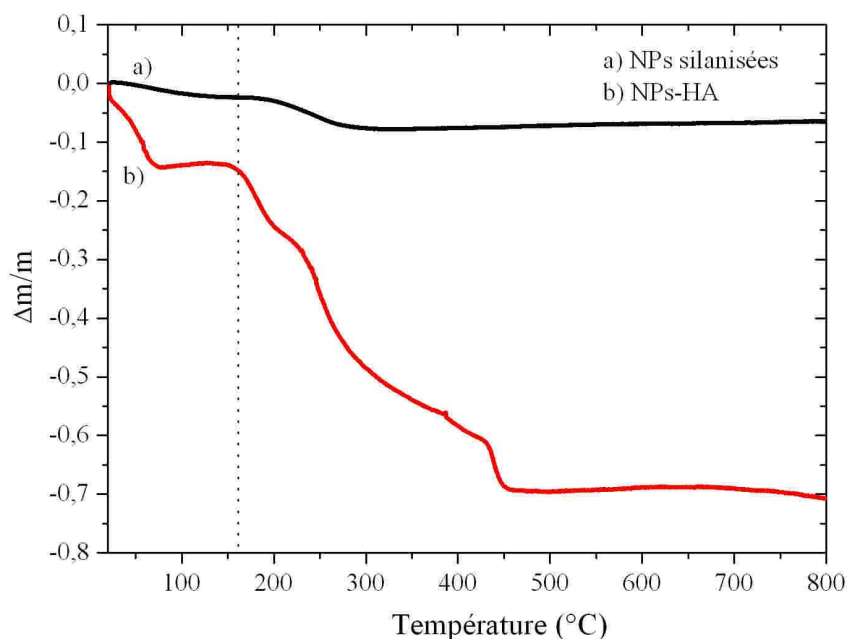
**Figure IV.23. Liaisons chimiques possibles de l'HA avec les NPM et le PEGdiNH<sub>2</sub>.**

Deux à trois types de liaisons peuvent être formées dans le gel suite à la réaction du couple NHS/EDC. Sur l'ensemble des constituants. Elles sont représentées sur les figures IV.20 et IV.23 : les chaînes d'HA reliées par le PEG diaminé, les chaînes d'HA connectées par les particules PEGylées (ou un ensemble de particules PEGylées), ou des chaînes d'HA directement liées entre elles.



**Figure IV.23. Spectre IR de l'HA seul, du PEGdiNH<sub>2</sub> seul et des NPM fonctionnalisées et complexées par l'HA.**

Sur la figure IV.23, sont rassemblés les spectres IR de l'HA, du PEGdiNH<sub>2</sub> et des NPs carboxylées fonctionnalisées par l'HA et le PEGdiNH<sub>2</sub>. La comparaison des spectres montre sans ambiguïté la présence de l'HA sur les NPs carboxylées. Les bandes à 2850 et 2920  $\text{cm}^{-1}$  sur le spectre NPs-HA correspondent aux vibrations des groupements CH<sub>2</sub>. Les vibrations des fonctions issues des liaisons amides sont présentes sur les spectres des NPs-HA et de l'HA seul. De plus, les vibrations des liaisons Fe-O attestent de la présence des NPM.



**Figure IV.24. Courbes ATG des NPs silanisées et NPs après greffage de l'HA.**

La perte de masse est totale et beaucoup plus importante que pour les NPs silanisées du fait que la couverture sur les NPs-HA est plus épaisse (voir figure IV.24.). En effet, la perte de masse relative est de 55%. La première décroissance correspond à l'eau physisorbée qui se trouve en plus grande quantité dans l'HA (dû aux propriétés hygroscopiques de l'HA). La deuxième perte de masse observée est la conséquence de diverses réactions de dégradation des composants en surface des NPM. L'analyse détaillée ne peut se faire à ce stade ne disposant pas de spectromètre de masse couplé à l'appareil.

#### **IV.4. Conclusion du chapitre IV**

Dans ce chapitre, nous avons abordé le thème de la réticulation des hydrogels *via* des NPM. Les étapes de la fonctionnalisation des nanoparticules ont toutes été validées par diverses méthodes. Toutefois, dans ce système complexe, il est très difficile d'affirmer de manière certaine que la réticulation finale a bien été réussie du fait des différentes associations possibles. C'est pourquoi il semble nécessaire, pour confirmer la réticulation des NPM à l'HA, d'effectuer des mesures de rhéologie sur l'hydrogel résultant mais également de visualiser la matrice et la répartition des NPM en son sein par cryomicroscopie à balayage. Par ailleurs, les mesures de gonflement de l'hydrogel sont également à prévoir pour avoir une idée de l'efficacité de la réticulation du gel.





# CONCLUSION GENERALE

---

*« Et dans un dernier souffle, je comprends tout: que le temps n'existe pas, que la vie est notre seul bien, qu'il ne faut pas la mépriser, que nous sommes tous liés, et que l'essentiel nous échappera toujours. »*

*Guillaume Musso*

Différentes voies de synthèse ont été réalisées pour la fabrication de nanoparticules magnétiques d'oxyde de fer. La synthèse par coprécipitation conduit à des nanoparticules nues ayant une surface assez propre permettant d'envisager des réactions de fonctionnalisation. Par ailleurs, ce type de synthèse a l'avantage de fournir très facilement une grande quantité de matière ce qui n'est pas le cas de la synthèse en milieu non aqueux. La synthèse par réduction d'acétylacétionate de fer donne des nanoparticules enrobées d'acide oléique avec une distribution en taille assez étroite. La nature hydrophobe de ces particules a permis de les confiner dans des systèmes émulsifiés et des particules de polystyrène.

Les nanoparticules synthétisées par différentes voies de synthèse sont toutes superparamagnétiques, avec des températures de blocage très inférieures à la température ambiante. La capacité à s'échauffer des nanoparticules obtenues par coprécipitation sous champ magnétique alternatif a été vérifiée. Les processus mis en jeu dans le phénomène d'échauffement local sont les relaxations de Néel et Brown. Ceci nous a permis de concevoir un système de délivrance de PA et de mettre au point une méthode originale de suivi de délivrance en utilisant la résonance paramagnétique électronique. Toutefois, il est nécessaire d'améliorer le principe de mesure pour un tel système de délivrance basé sur un hydrogel physique afin de minimiser la solubilisation de l'interface gel/eau.

L'intégration d'Isasomes dans un système de délivrance de principe actif s'avère très intéressant. Ils ont été employés pour le stockage du TEMPO, composé paramagnétique utilisé comme sonde radicalaire en RPE. La nanostructure interne de ces émulsions a un grand intérêt dans notre système puisque le changement de température peut aussi la modifier et avoir une conséquence sur la diffusion. L'influence de ces molécules hôtes au sein de la structure des gouttelettes a clairement été identifiée à l'aide de la diffusion de rayonnement aux petits angles (SAXS). L'ajout de TEMPO diminue la courbure négative et modifie le diagramme de phase. Ainsi, à  $\delta 50$  par exemple, une microémulsion émulsifiée stabilisée par la lécithine de soja se transforme en une phase micellaire cubique émulsifiée ( $Fd\bar{3}m$ ) en présence des molécules de TEMPO. La RPE a montré que les molécules de TEMPO se partitionnent entre la phase hydrophobe et la phase aqueuse des Isasomes. Un coefficient de partition a été calculé à partir des spectres RPE.

La comparaison des gels avec ou sans émulsion a montré que les Isasomes tiennent un rôle primordial dans notre système. Ces réservoirs de PA ralentissent la diffusion des molécules. Tandis

que pour les systèmes sans émulsion la diffusion commence dès l'instant initial, pour les systèmes avec émulsion, à l'instant initial, le PA reste confiné dans le gel. Les Isasomes ainsi que l'émulsifiant les recouvrant forment une barrière à la diffusion. Les hydrogels avec émulsion permettent une diffusion à libération prolongée de PA.

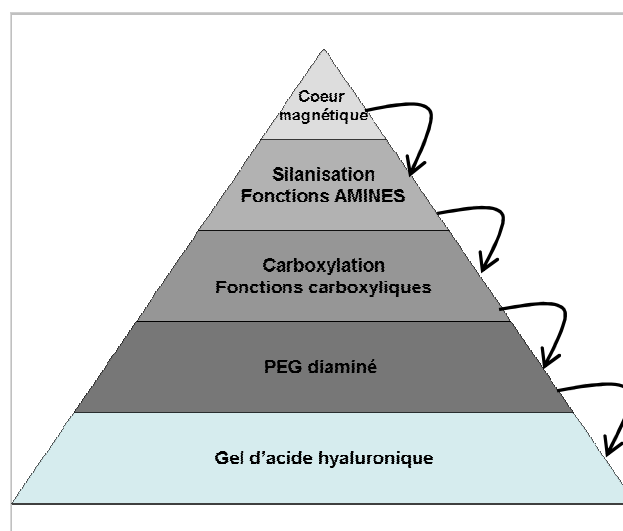
L'influence de la température sur la diffusion du PA hors du gel magnétique contenant des Isasomes en phase micellaire cubique a été montrée. Néanmoins, aucun saut dans le cinétique de diffusion dû à une modification de la nanostructure des Isasomes n'a été observé suite à l'augmentation de la température jusqu'à 37°C. Pour observer ce phénomène il faudra sans doute travailler à plus bas  $\delta$ , c'est-à-dire avec moins de lipide. La température influe par contre sur la conformation du gel de polymère non réticulé. L'expérience a montré que la diffusion est gouvernée par le maintien de l'équilibre entre les 3 composantes du système (gel, Isasomes, eau).

Ces mesures ont été corrélées avec l'étude de la délivrance par activation thermomagnétique. L'activation de la diffusion sous champ magnétique alternatif confirme que l'activation de la libération des molécules est principalement gouvernée par la température d'échauffement des nanoparticules magnétiques.

Les nanoparticules magnétiques d'oxyde de fer ont été fonctionnalisées en plusieurs étapes. Le but est la réticulation d'un hydrogel par des NPM. Ces dernières constitueraient des points de réticulation au sein du gel. De cette manière, les particules seraient liées chimiquement à la matrice polymérique. A l'issue de chaque étape, le greffage des molécules fonctionnelles a été caractérisé par différentes méthodes :

- la zétamétrie a permis de vérifier si le point isoélectrique correspondait à la molécule greffée ;
- l'ATG nous a donné une indication sur la quantité relative de greffons ;
- grâce à l'IRTF, les groupements fonctionnels ont été identifiés.

Le schéma suivant présente les différentes étapes suivies pour la réticulation :



# PERSPECTIVES

---

« *L'avenir n'est jamais que du présent à mettre en ordre. Tu n'as pas à le prévoir, mais à le permettre.* »  
A. de Saint-Exupéry

Ce travail de thèse a ouvert la voie à l'utilisation des sondes paramagnétiques et de la RPE pour l'étude de diffusion dans un système de délivrance complexe. Notre système est si complexe qu'il convient de l'étudier plus en détail dans toutes ses configurations. Ceci permettra de l'améliorer et d'encore mieux contrôler la diffusion de PA. Dans ce cadre des études complémentaires sont à prévoir.

Tout d'abord, il convient de rappeler que l'objectif premier était de combiner les propriétés d'échauffement des NPM, les propriétés structurales et thermiques des Isasomes et les propriétés thermiques des hydrogels dans le but de créer un système de délivrance par activation thermomagnétique. Dans notre étude, nous n'avons pu sonder que la phase micellaire cubique des Isasomes stabilisés par la lécithine de soja concernant la diffusion. Par comparaison, il faudrait sonder la phase hexagonale qui a été caractérisée en présence du caséinate de sodium. De plus, le changement d'émulsifiant pourrait également influencer sur la diffusion. Il serait intéressant de déterminer le taux de couverture de chaque émulsifiant par la technique du « diminishing bubble » [Bezalgues J. B. *et al.*, 2008].

De même, l'hydrogel physique pourrait être remplacé par un hydrogel à LCST comme le F127 ou par un gel formé à partir d'un mélange de polymères à UCST et LCST ayant une température de transition bien défini [Tomsic M. *et al.*, 2009]. L'hydrogel devrait avoir une influence non négligeable sur la diffusion du PA.

De plus, des caractérisations supplémentaires sur l'hydrogel réticulé sont à prévoir notamment des mesures de rhéologie. Par ailleurs, l'étude de la diffusion de PA sur cet hydrogel ainsi que la comparaison avec le système mixte non réticulé devraient être effectuées.

En complément de toutes ces perspectives, il semble nécessaire d'effectuer des essais *in vitro* de nos matériaux pour évaluer leur toxicité.



# ANNEXES

---



# Annexe A

## SONOTRODE

Les ondes ultrasonores sont des ondes mécaniques et élastiques dont la fréquence est comprise entre 20 kHz et 20 MHz. Leurs propriétés ne dépendent que du milieu dans lequel elles sont propagées. L'atomiseur ultrasonique est constitué d'un générateur capable de convertir une énergie électrique continue de 40 à 60 Hz en énergie électrique haute fréquence (25-30 kHz). Cette énergie est ensuite transmise à un capteur piézoélectrique en céramique, situé dans le convertisseur, qui va la transformer en vibrations mécaniques. Une fois cette conversion faite, les vibrations sont transmises à la sonde qui va les intensifier et les focaliser en son extrémité, endroit où l'atomisation a lieu. Grâce aux ondes de pression créées dans le liquide, des microgouttelettes se forment, et de ce fait l'émulsion. En effet les ondes ultrasonores vont permettre de fragmenter la phase organique afin de la disperser dans la solution aqueuse. Ceci est rendu possible grâce à des phénomènes de cisaillement ou de compressions selon la position de ces fragments dans l'échantillon. Plus l'énergie fournie au système sera importante plus la phase organique sera fragmentée et plus les gouttes seront petites. Afin de mieux comprendre le fonctionnement de cet appareil en voici le schéma. S1 et S2 représentent respectivement la surface de la partie supérieure de la sonotrode et celle de sa partie inférieure.

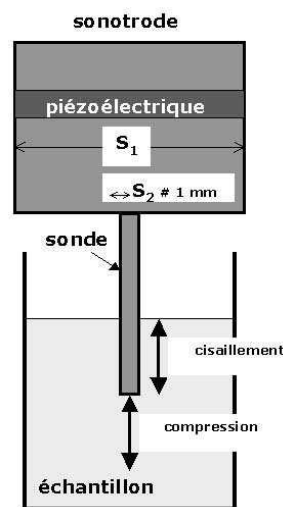


Figure 1. Schéma de la sonotrode plongé dans un liquide.

Nous venons de voir que la sonotrode transmet l'énergie nécessaire afin de créer des ondes de compression dans le liquide. De cet apport d'énergie résulte une augmentation plus ou moins importante de la température, qui est un paramètre essentiel à contrôler dans la formation d'émulsions de « phases cristal liquide » comme nous le verrons par la suite. C'est pourquoi nous avons déterminé les courbes caractéristiques *température-temps de sonication* de l'appareillage. La connaissance de ces courbes nous permettra alors de se placer dans des conditions optimales afin d'atteindre la température nécessaire à la fluidification du système cristal liquide pour une meilleure fragmentation. Pour ce faire,

nous avons utilisé une sonde thermique fonctionnant dans la gamme -50 - 900°C et possédant une incertitude sur la mesure de 1°C.

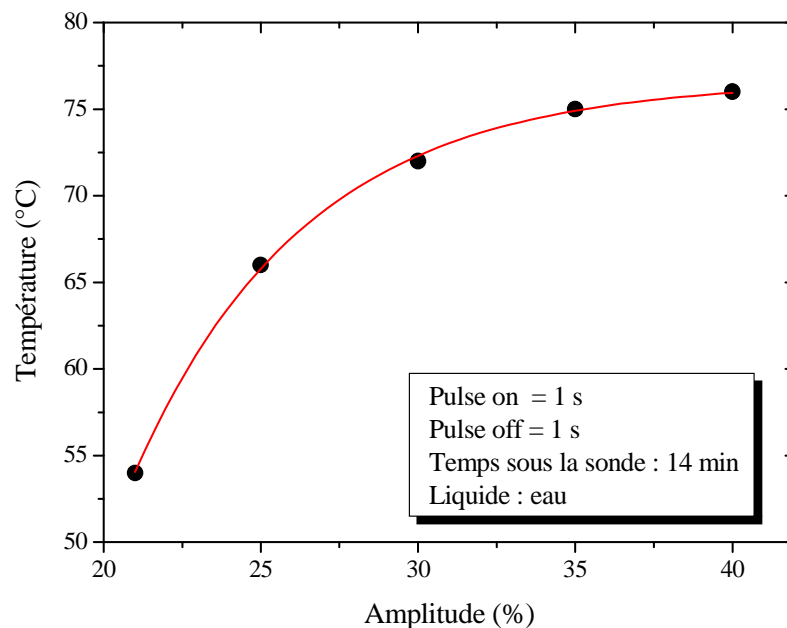
Nous avons ainsi pu tracer les courbes suivantes :

- ❖ Evolution *amplitude -température* à temps fixé de 14 minutes,
- ❖ Evolution *amplitude -température* à temps fixé de 5 minutes,
- ❖ Evolution *température-temps* à amplitude fixée de 30%, la gamme d'amplitude maximum autorisée pour éviter la détérioration du matériel est de 20-40%.

Il est à noter que pour toutes les manipulations réalisées nous avons programmé les pulsations de l'appareil afin que les temps de sonication et de repos soient identiques et égaux à une seconde (pulses on/off). Ce temps de repos est essentiel pour permettre au liquide de se réorganiser et pour éviter que la température ne soit trop élevée trop rapidement.

#### ❖ Evolution amplitude -température à temps fixé de 14 minutes

Pour déterminer cette courbe expérimentale, nous nous sommes placés dans les mêmes conditions opératoires que lors de la réalisation des émulsions. Nous avons ainsi soniqué 10 mL d'eau distillée Millipore 18,2 MΩ durant 14 minutes à des amplitudes variant entre 20 et 40%. En effet, pour les émulsions comprenant 95% d'eau, nous n'attendons pas de différence substantielle sur les températures entre l'eau pure et l'émulsion. D'autre part, nous n'avons pas dépassé les 40% d'amplitude pour ne pas détériorer l'appareil. La courbe obtenue est la suivante :



**Figure 2 : Courbe-étalon amplitude -température d'un échantillon d'eau pure après 14 minutes.**

Nous constatons que la température de l'échantillon après 14 minutes est fortement dépendante de l'amplitude de l'onde délivrée. En effet, il paraît logique, qu'à un temps donné la température soit plus élevée pour une énergie délivrée plus importante. Cependant, nous pouvons constater que cette augmentation n'est pas linéaire, et est beaucoup moins importante pour de grandes



amplitudes que pour de faibles : une saturation intervient. Ainsi, dans cette gamme d'amplitude, ne dépasse pas les 76 °C. Cette valeur limite aura une importance capitale par la suite en vue d'une dispersion des phases cubiques.

#### ❖ Evolution amplitude -température à temps fixé de 5 minutes

Nous avons réalisé une seconde courbe-étalon avec l'amplitude pour un temps plus faible d'exposition. La courbe caractéristique obtenue est la suivante :

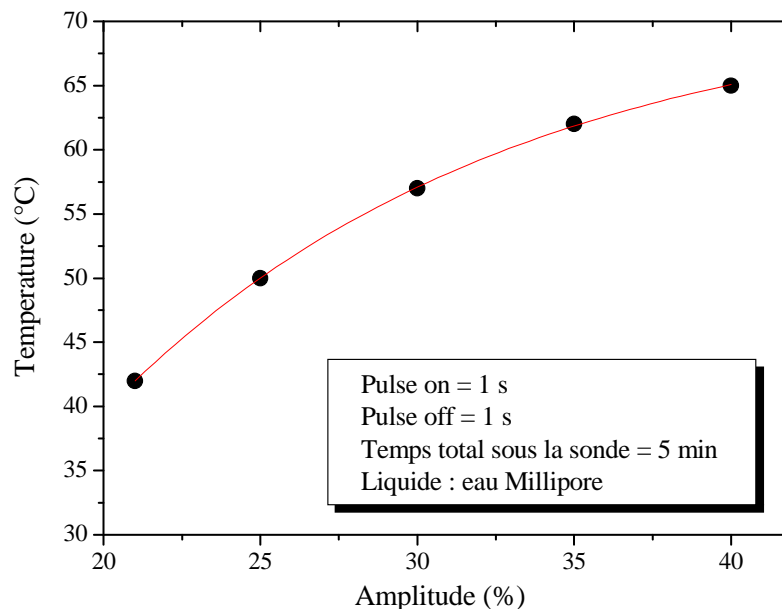


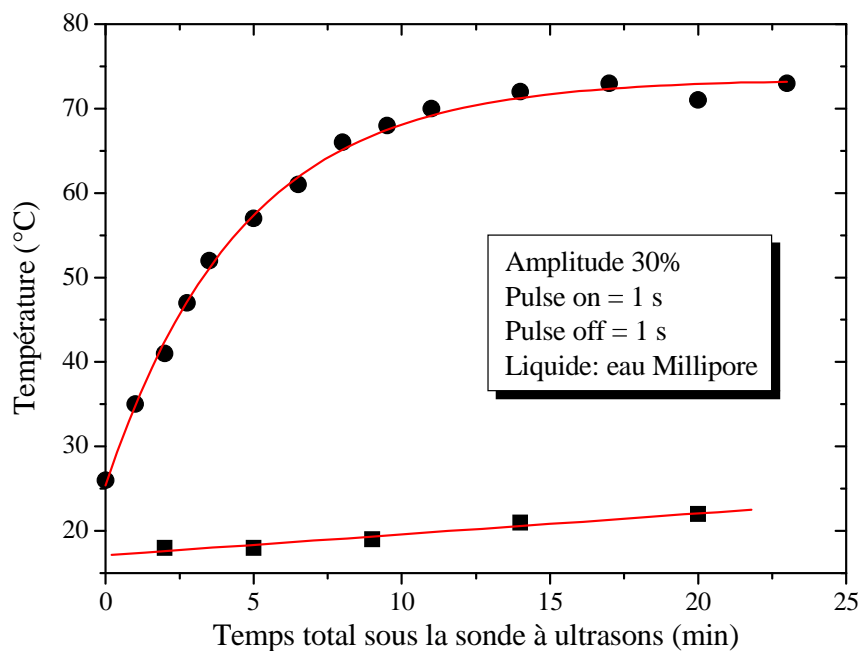
Figure 3 : Courbe-étalon amplitude -température d'un échantillon d'eau pure après 5 minutes.

Les conditions opératoires, hormis le temps de sonication qui est de 5 minutes, sont les mêmes que précédemment. Nous constatons tout d'abord que l'allure de la courbe est identique à celle obtenue auparavant pour 14 minutes et n'est donc pas linéaire. D'autre part, les températures atteintes sont ici inférieures à celles mesurées au bout de 14 minutes : par exemple la température finale au bout de 5 minutes à une amplitude de 40% n'est que de 65°C contre 76°C au bout de 14 minutes pour une même amplitude. Ainsi plus le temps de sonication est élevé, plus l'énergie reçue par le liquide est importante et de ce fait, plus la température est élevée.

Nous venons de voir l'influence de l'amplitude des vibrations de la sonotrode sur la température effective de l'échantillon, nous allons maintenant nous intéresser à l'augmentation thermique due au temps de sonication à amplitude fixe.

#### Evolution température -temps de sonication à une amplitude fixée à 30%

Pour réaliser la courbe caractéristique température -temps de sonication (Figure 4), nous avons fixé l'amplitude des vibrations à 30% et fait varier le temps de sonication jusqu'à 23 minutes.



**Figure 4 : Courbes-étalons température -temps d'exposition à une amplitude de 30%.**

● : sonication sans bain de glace ; ■ : sonication avec bain de glace entourant l'échantillon.

Nous avons ajusté la courbe sans bain de glace par une loi exponentielle dont voici l'équation :

$$T(t) = A_1 - A_2 e^{-kt}$$

Avec :  $A_1 = 73,52 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $A_2 = 48,11 \text{ }^\circ\text{C}$  et  $k = 0,2188 \text{ min}^{-1}$

Nous constatons que l'augmentation du temps de sonication induit une augmentation non linéaire de la température dans l'échantillon. Là encore une saturation de la température intervient : à partir de 17 minutes, un pallier est atteint avec une valeur limite de  $73,5^\circ\text{C}$ . La loi déterminée ici est cohérente avec la Figure 2 ; pour 14 minutes elle nous donne une valeur de  $71,3^\circ\text{C}$ .

Nous remarquons aussi que la température à 20 minutes est légèrement inférieure à celle attendue pour le plateau et que l'écart est supérieur à l'erreur sur la mesure qui est de  $1^\circ\text{C}$ . Ceci peut s'expliquer par un temps assez long de stabilisation de la mesure par la sonde thermique utilisée, au cours duquel la température de l'échantillon peut baisser.

Quant à la courbe obtenue avec un bain de glace, nous pouvons constater, d'une part, que l'augmentation de la température se fait proportionnellement au temps de sonication et d'autre part, que la température atteinte au bout de 14 minutes est largement inférieure à celle obtenue sans bain de glace : la présence de glace empêche une augmentation trop importante de la température.

De manière générale, nous avons choisi de réaliser nos émulsions avec un temps de sonication de 14 minutes. Comme nous le verrons, il est important de connaître la température atteinte à cet instant pour savoir si le système a atteint une phase fluide nécessaire à une fragmentation optimale. Grâce aux paramètres d'ajustement de cette courbe-étalon, nous savons que celle-ci est de  $71^\circ\text{C}$  environ.

Il est à noter que toutes ces courbes-étalons ont été mesurées avec une température externe de  $26^\circ\text{C}$  (ambiante). La température maximale atteinte dépend évidemment légèrement de cette

température ambiante car le liquide n'est pas isolé de l'extérieur et possède de plus une surface libre en contact avec l'extérieur. C'est d'ailleurs aussi la raison pour laquelle la température de l'échantillon se stabilise et ne croît pas continûment avec le temps de sonication.

# Annexe B

## Diffusion de rayonnement aux petits angles (SAXS)

Une expérience de SAXS consiste à envoyer sur un échantillon un faisceau de rayons X collimaté de longueur d'onde  $\lambda$ , et de détecter l'intensité diffusée  $I(\theta)$  en fonction de l'angle de diffusion  $\theta$ .

Les vecteurs caractéristiques de la diffusion aux petits angles sont définis de la manière suivante :

- $\vec{k}_0$  le vecteur de l'onde incidente pour lequel  $|\vec{k}_0| = \frac{2\pi}{\lambda}$  ;
- $\vec{k}$  le vecteur d'onde caractéristique de l'onde diffusée, dont la direction indique la direction d'observation ;
- $\vec{q}$  le vecteur de diffusion avec  $\vec{q} = \vec{k} - \vec{k}_0$  et son module  $|\vec{q}| = \frac{4\pi \sin(\theta/2)}{\lambda}$  dans le cas de la diffusion élastique et où  $\theta$  représente l'angle de diffusion mesuré par rapport à la direction du faisceau incident et  $\lambda$  la longueur d'onde de la radiation incidente.

La fenêtre angulaire donnée définit les tailles typiques sondées  $D$  par la technique, avec :

$$q = \frac{2\pi}{D}$$

$q$  est l'inverse d'une longueur qui joue le rôle de l'échelle d'observation.

Le principe de la technique est schématisé sur la figure suivante :

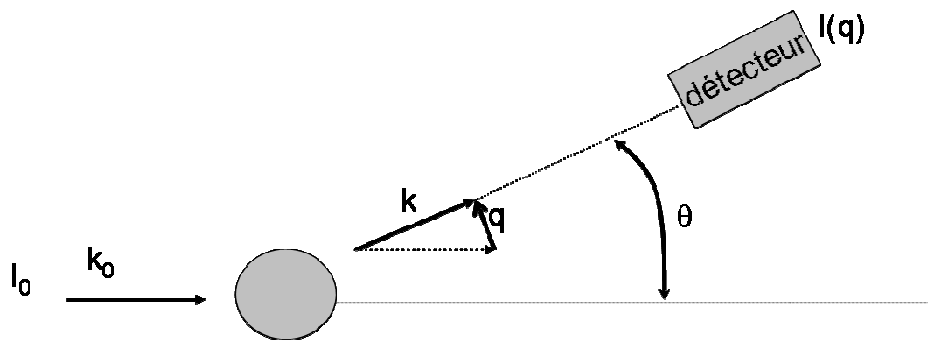


Schéma du principe de la diffusion de rayonnement aux petits angles.

L'amplitude  $A(\vec{q})$  diffusée par l'ensemble du milieu est la transformée de Fourier des fluctuations de densité  $\Delta\rho(\vec{r})$  à la position  $\vec{r}$ . Dans le cas d'une solution de particules,  $\Delta\rho(\vec{r})$  est défini comme la différence entre la densité de longueur de diffusion à la position  $\vec{r}$  du centre de masse des particules, dans le milieu de volume  $V$ , et celle du solvant  $\rho_{\text{solvant}}$ , c'est-à-dire  $\Delta\rho(\vec{r}) = \rho(\vec{r}) - \rho_{\text{solvant}}$ .

Ainsi, on a :

$$A(\vec{q}) = \int_V \Delta\rho(\vec{r}) e^{i\vec{q}\cdot\vec{r}} d^3\vec{r}$$

Expérimentalement, nous avons accès à l'intensité du signal qui s'écrit :

$$I(\vec{q}) = \frac{1}{V} \langle A(\vec{q}) \cdot A^*(\vec{q}) \rangle$$

où  $A^*(\vec{q})$  est le complexe conjugué, et les crochets la moyenne sur l'ensemble des configurations sur le temps de l'expérience. Dans le cas où les objets ne sont pas orientés, l'intensité diffusée ne dépend que du module du vecteur d'onde.

Prenons le cas d'un échantillon de  $N$  particules en solution dans un volume  $V$ . Comme l'intensité diffusée est le produit de l'amplitude et de son conjugué, des termes d'interférences apparaissent. Par conséquent,  $I(q)$  contient l'information relative à la forme des particules à travers les corrélations entre diffuseurs élémentaires d'un même objet, mais aussi relative à l'organisation des particules par la fonction de corrélation interparticulaire. Pour des particules sphériques et identiques, l'intensité diffusée par unité de volume peut être écrite sous la forme d'un produit :

$$I(\vec{q}) = \frac{N}{V} P(\vec{q}) S(\vec{q})$$

La fonction  $P(q)$  est le facteur de forme d'une particule. La fonction  $S(q)$  est le facteur de structure qui dépend des interactions entre particules. Cette expression est aussi une approximation valable pour les solutions faiblement concentrées où le potentiel d'interaction entre les objets est à symétrie sphérique [Lindner P. & Zemb T., 2002].

Dans le cas des Isasomes, nous nous sommes intéressés surtout au facteur de structure, le facteur de forme régulant seulement la hauteur des pics.

Le facteur de structure dépend des symétries de la phase lipidique. Les pics de Bragg présents dépendent donc des lois sur les h, k, l relatives aux groupes d'espaces associés (voir tableaux ci-après)

Symétrie	hkl	$\sqrt{3/2} \times (a/d)^2$
H <sub>2</sub>	100	1
	110	3
	200	4
	210	7
	300	9
	220	12
	310	13
	400	16
	320	19
	410	21
	500	25
	330	27
	420	28
	510	31
	600	36
	430	37

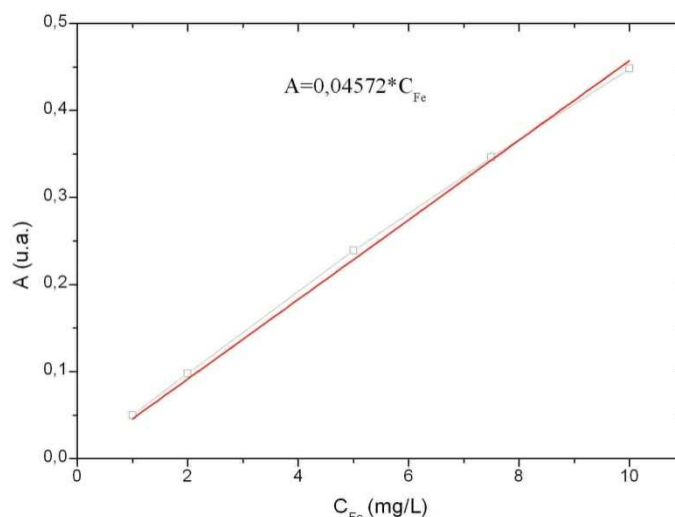
Symétrie	hkl	$(a/d)^2$
Fd $\bar{3}m$	111	3
	220	8
	311	11
	222	12
	400	16
	331	19
	422	24
	333+511	27
	440	32
	531	35
	442	36
	620	40
	533	43
	622	44
	444	48
	551+711	51

# Annexe C

## DOSAGE DU FER DANS LES FERROFLUIDES PAR SPECTROSCOPIE D'ABSORPTION ATOMIQUE DE FLAMME

Cette technique permet de doser la quantité totale de fer (fer ferrique et ferreux) en atomisant les échantillons dilués pour les transformer en vapeur atomique et dissocier le composé chimique contenant l'élément.

Une gamme d'étalonnage est préparée par dilution en milieu acide d'acide chlorhydrique 1 N d'une solution mère de fer dont la concentration en mg/L est connue. En général, l'étalonnage se fait avec cinq points de concentration : 1 mg/L, 2 mg/L, 5 mg/L, 7,5 mg/L, 10 mg/L. Pour pouvoir être analysés, les oxydes de fer doivent être dégradés en fer. Pour cela, les ferrofluides sont attaqués par une solution d'acide chlorhydrique 6 N en effectuant une dilution 1/6<sup>ème</sup>. Les échantillons sont laissés une nuit pour obtenir une attaque totale des oxydes de fer. Les solutions obtenues sont jaunâtres. Ensuite, ces solutions sont diluées dans une solution acide 1N pour avoir des concentrations entrant dans la gamme d'étalonnage. Les échantillons préparés sont analysés à l'aide d'un spectromètre d'absorption atomique de flamme. La source de rayonnement est une lampe à cathode creuse à la longueur d'onde du fer (372 nm), un atome ne pouvant absorber que les radiations qu'il est capable d'émettre.



**Droite d'étalonnage permettant de doser l'élément fer dans les ferrofluides. A est l'absorbance, C<sub>Fe</sub> est la concentration en fer de l'échantillon en mg/mL.**

La concentration de l'élément recherché (le fer) est déterminée à partir de l'absorbance mesurée grâce à la courbe d'étalonnage.

# ANNEXE D

## Application de la méthode $3\omega$ à la caractérisation thermique des nanofluides et des gels

La méthode  $3\omega$  consiste à détecter le *troisième harmonique thermique* ( $3\omega$ ) généré dans un élément chauffant par un courant électrique harmonique  $i(t) = I_0 \cos \omega t$ . Une spécificité tout à fait remarquable de cette méthode est que l'élément chauffant sert aussi de thermomètre !

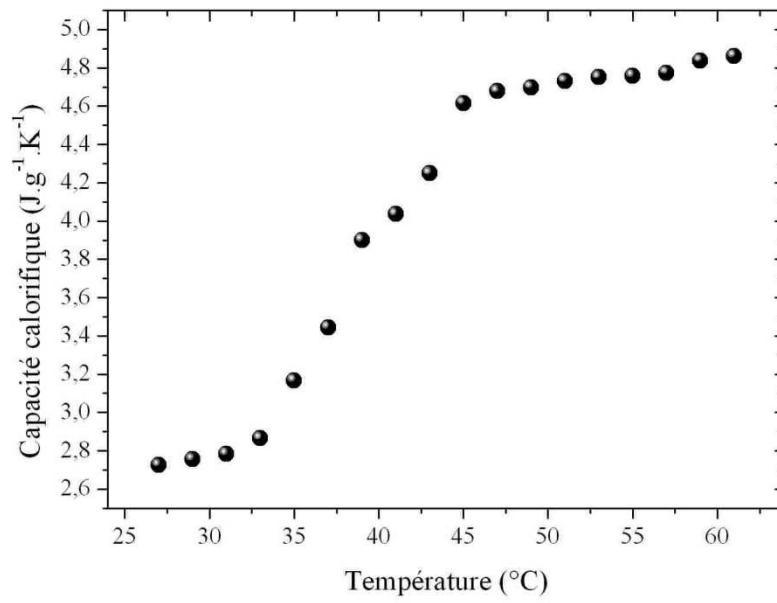
Le « thermomètre/élément chauffant », de résistance électrique  $R = R_0 [1 + \alpha \Delta T_{2\omega}(t)]$  présente de très faibles dimensions transversales (diamètre de l'ordre du micromètre) pour une longueur de l'ordre du centimètre. L'élément chauffant peut être constitué par exemple d'un *fil métallique* de coefficient de température  $\alpha$  (plongé dans le fluide à caractériser) ou d'un *ruban métallique* (déposé sur l'échantillon s'il est solide).

La puissance thermique est fournie dans le filament par effet Joule et présente par conséquent une composante harmonique de pulsation  $2\omega$ . Celle-ci provoque une variation temporelle de la température  $T(t)$  de l'élément chauffant qui contient aussi une composante harmonique de pulsation  $2\omega$  :  $\Delta T_{2\omega}(t)$ . D'après l'expression de la résistance électrique  $R$ ,  $\Delta T_{2\omega}(t)$  engendre une composante harmonique de pulsation  $3\omega$  dans la tension aux bornes du filament :  $u_{3\omega}(t)$ .

Le champ des températures du filament étant très *influencé* par la nature du milieu en contact avec l'élément chauffant, la mesure de  $\Delta T_{2\omega}(t)$  permet de déterminer assez facilement et de manière précise certaines caractéristiques thermiques du milieu en contact, comme la conductivité thermique  $\lambda$ , la chaleur spécifique  $c$  ou le coefficient d'échange conducto-convectif  $h$  pour un fluide en écoulement.

La détermination de  $\Delta T_{2\omega}(t)$  n'est pas directe mais passe par la mesure de la tension efficace  $U_{3\omega}$  du *troisième harmonique thermique*  $u_{3\omega}(t)$  (méthode  $3\omega$ ) relevée par détection synchrone ou analyse spectrale soit directement aux bornes de l'élément chauffant (méthode différentielle) soit à l'équilibre d'un pont de Wheatstone dans lequel le filament chauffant a été inséré.

Nous avons pour la première fois appliquée la méthode  $3\omega$  à la détermination des propriétés de gels qui peut aussi être utilisée dans la caractérisation de nanofluides.



**Capacité calorifique du gel de  $\kappa$ -carrageenan à 20g/L en fonction de la température.**



# **REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

---



- Ahlin P.**, Kristl J., Šentjurc M., Štrancar J., Pečar S., *International Journal of Pharmaceutics* 196 (2000) 241-244.
- Alexandridis P.**, Holzwarth J. F., Alan T., *Macromolecules* 27 (1994) 2414-2425.
- Aliaga C.**, Rezende M. C., Arenas A., *Food Chemistry* 113 (2009) 1083-1087.
- Angius R.**, Murgia S., Berti D., Baglioni P., Monduzzi M., *Journal of Physics: Condensed Matter* 18 (2006) S2203-S2220.
- Amar-Yuli I.**, Libster D., Aserin A., Garti N., *Current Opinion in Colloid & Interface Science* 14 (2009) 21-32.
- Arditty S.**, « *Fabrication, stabilisation et propriétés rhéologiques des émulsions stabilisées par des particules colloïdales* » Thèse soutenue en 2004 à l'Université de Bordeaux I.
- Arkles B.**, *ChemTech* 7 (1977) 766-778.
- Arruebo M.**, Fernandez-Pacheco R., Ibarra M. R., Santamaria J., *Nanotoday* 2 (2007) 22-32.
- Altintas E. B.**, Denizli A., *Materials Science and Engineering C* 29 (2009) 1627–1634
- Augustin M. A.**, Hemar Y., *Chemical Society Reviews* 38 (2009) 902–912.
- Axel F. S.**, *Biophysics of Structure and Mechanism* 2 (1976) 181-218.
- Bai Y.**, Teng B., Chen S., Chang Y., Li Z., *Macromolecular Rapid Communication* 27 (2006) 2107–2112.
- Bales B. L.**, Baur M. E., *Chemical Physics Letters* 7 (1970) 341-344.
- Banerjee S.S.**, Chen D. H., *Chemistry of Materials* 19 (2007) 6345–6349.
- Banerjee S.S.**, Chen D. H., *Nanotechnology* 20 (2009) 185103-185112.
- Baranovskii V. Y.**, Yasina L. L., Motyakin M. V., Aliev I. I., Shenkov S., Dimitrov M., Lambov N., Wasserman A. M., *Polymer Science Serie A* 48 (2006) 1304-1309.
- Bean C. P.**, *Journal of Applied Physics* 26 (1955) 1381-1383.
- Bean C. P.**, Livingston J. D., *Journal of Applied Physics Supplement* to 30 (1959) 120S-129S.
- Bee A.**, Massart R., Neveu S., *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* 149 (1995) 6-9.
- Benyettou F.**, Lalatonne Y., Sainte-Catherine O., Monteil M., Motte L., *International Journal of Pharmaceutics* 379 (2009) 324–327.
- Berger P.**, Adelman N. B., Beckman K. J., Campbell D. J., Ellis A. B., Lisensky G. C., *Journal of Chemical Education* 76 (1999) 943-948.
- Bezelgues J. B.**, Serieye S., Crosset-Perrotin L., Leser M. E., *Colloid and Surface A: Physicochemical Engineering Aspects* 331 (2008) 56-62.
- Bhattacharya S.**, Eckert F., Boyko V., Pich A., *Small* 3 No. 4 (2007) 650 – 657.
- Bhattacharyya S.**, Salvétat J. P., Fleurier R., Husmann A., Cacciaguerra T., Saboungi M. L., *Chemical Communications* (2005) 4818-4820.
- Bottle S. E.**, Gillies D. G., Micallef A. S., Reid D. A., Sutcliffe L. H., *Magnetic Resonance in Chemistry* 37 (1999) 730-734.
- Boyd B. J.**, *International Journal of Pharmaceutics* 260 (2003) 239–247.

- Boyd B. J.**, Whittaker D. V., Khoo S. M., Davey G., *International Journal of Pharmaceutics* 309 (2006) 218-226.
- Boyd B. J.**, Rizwan S. B., Dong Y. D., Hook S., Rades T., *Langmuir* 23 (2007) 12461-12464.
- Bragg W. H.**, *Nature* 95 (1915) 561.
- Bulpitt P.**, Aeschlimann D., *Journal of Biomedical Materials Research* 47 (1999) 152-169.
- Caboi F.**, Nylander T., Razumas V., Talaikytė Z., Monduzzi M., Larsson K., *Langmuir* 13 (1997) 5476-5483.
- Caboi F.**, Amico G. S., Pitzalis P., Monduzzi M., Nylander T., Larsson K., *Chemistry and Physics of Lipids* 109 (2001) 47-62.
- Caboi F.**, Murgia S., Monduzzi M., Lazzari P., *Langmuir* 18 (2002) 7916.
- Castagna R.**, Davis P. A., Vasu V. T., Soucek K., Cross C. E., Greci L., Valacchi G., *Toxicology in Vitro* 23 (2009) 365-370.
- Chang C. M.**, Bodmeier R., *Journal of Pharmaceutical Sciences* 86 (1997) 747-752.
- Chang C. M.**, Bodmeier R., *Journal of Controlled Release* 46 (1997) 215-222.
- Chatterjee J.**, Bettge M., Haik Y., Chen C. J., *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* 293 (2005) 303-309.
- Chaudret B.**, *C. R. Physique* 6 (2005) 117-131.
- Chourpa I.**, Douziech-Eyrolles L., Ngaboni-Okassa L., Fouquenot J. F., Cohen-Jonathan S., Soucé M., Marchais H., Dubois P., *Analyst* 130 (2005) 1395-1403.
- Cimato A. N.**, Piehl L. L., Facorro G. B., Torti G. B., Hager A. A., *Free Radical Biology & Medicine* 37 (2004) 2042-2051.
- Clogston J.**, Craciun G., Hart D. J., Caffrey M., *Journal of Controlled Release* 102 (2005) 441-461.
- Cosgrove T.**, "Colloid science: Principles, methods and applications" Wiley-Blackwell (2005).
- Coviello T.**, Matricardi P., Marianecchi C., Alhaique F., *Journal of Controlled Release* 119 (2007) 5-24.
- Daniel-da-Silva A. L.**, Lóio R., Lopes-da-Silva J. A., Trindade T., Goodfellow B. J., Gil A. M., *Journal of Colloid and Interface Science* 324 (2008) 205-211.
- Daniel-da-Silva A. L.**, Trindade T., Goodfellow B. J., Costa B. F. O., Correia R. N., Gil A. M., *Biomacromolecules* 8 (2007) 2350-2357.
- De Campo L.**, Yaghmur A., Sagalowicz L., Leser M. E., Watzke H., Glatter O., *Langmuir* 20 (2004) 5254-5261.
- De Faria D. L. A.**, Venancio Silva S., de Oliveira M. T., *Journal of Raman Spectroscopy* 28 (1997) 873-878.
- De Paoli V. M.**, De Paoli Lacerda S. H., Spinu L., Ingber B., Rosenzweig Z., Rosenzweig N., *Langmuir* 22 (2006) 5894-5899.
- Dixon N.**, Pali T., Kee T. P., Marsh D., *Biochimica et Biophysica Acta* 1665 (2004) 177-183.
- Dobbs A. P.**, Jones P., Penny M. J., Rigby S. E., *Tetrahedron* 65 (2009) 5271-5277.
- Dobson J.**, *Drug Development Research* 67 (2006) 55-60.

- Dong Y. D.**, Larson I., Hanley T., Boyd B. J., *Langmuir* 22 (2006) 9512-9518.
- Dormann J. L.**, *Revue de Physique Appliquée* 16 (1981) 275-301.
- Drofenik M.**, Kristl M., Makovec D., Kosak A., *Materials Science Forum* 518 (2006) 73-78.
- Drummond C. J.** & Fong C., *Current Opinion in Colloid & Interface Science* 4 (2000) 449-456.
- Dubois E.**, Cabuil V., Boué F., Perzynski R., *Journal of Chemical Physics* 111 (1999) 7147-7160.
- Dumestre F.**, Chaudret B., Amiens C., Renaud P., Fejes P., *Science* 303 (2004) 821-823.
- Eaton G. R.**, Eaton S. S., Salikhov K. M., « *Foundations of Modern EPR* » World Scientific (1998)
- Fitzgerald M. E.**; Griffing V., Sullivan J., *The Journal of Chemical Physics* 25 (1956) 926-933.
- Flesh C.**, Joubert M., Bourgeat-Lami E., Mornet S., Duguet E., Delaite C, Dumas P., *Colloids and Surface A* 262 (2005) 150-157.
- Fleurier R.**, « *Résonance ferromagnétique et structure de nanoparticules bimétalliques à base de fer* » Thèse soutenue en 2006 à l'Université d'Orléans.
- Fong W. K.**, Hanley T., Boyd B. J., *Journal of Controlled Release* 135 (2009) 218-226.
- Fortin J.-P.**, Gazeau F., Wilhelm C., *European Biophysics Journal* 37 (2008) 223-228.
- Fortin J.-P.**, Wilhelm C., Servais J., Ménager C., Bacri J.-C., Gazeau F., *Journal of American Chemical Society* 129 (2007) 2628-2635.
- Frelichowska J.**, « *Émulsions stabilisées par des particules solides: études physico-chimiques et évaluation pour l'application cutanée* » (2009) Thèse soutenue à l'Université de Lyon.
- Frenkel J.** and Dorfman J., *Nature* 126 (1930) 274-275.
- Gedanken A.**, *Ultrasonics Sonochemistry* 11 (2004) 47-55.
- Giri S.**, Trewyn B. G., Stellmaker M. P., Lin V. S. Y., *Angewandte Chemie International Edition* 44 (2005) 5038-5044.
- Gomez-Lopera S. A.**, Plaza R. C., Delgado A. V., *Journal of Colloid and Interface Science* 240 (2001) 40-47.
- Gossuin Y.**, Gillis P., Hocq A., Vuong Q. L., Roch A., *Advanced Review* 1 (2009) 299-310.
- Gromadzki D.**, Lokaj J., Cernoch P., Diat O., Nallet F., Stepanek P., *European Polymer Journal* 44 (2008) 189-199.
- Guillot S.**, Tomsic M., Sagalowicz L., Leser M. E., Glatter O., *Journal of Colloid and Interface Science* 330 (2009) 175-179.
- Guillot S.**, Moitzi C., Salentinig S., Sagalowicz L., Leser M. E., Glatter O., *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects* 291 (2006) 78-84.
- Gupta A.K.** & Gupta M., *Biomaterials* 26 (2005) 3995-4021.
- Gustafsson J.**, Ljusberg-Wahren H., Almgren M., Larsson K., *Langmuir* 12 (1996) 4611-4613.
- Gustafsson J.**, Ljusberg-Wahren H., Almgren M., Larsson K., *Langmuir* 13 (1997) 6964-6971.
- Hernandez R.** & Mijangos C., *Macromolecular Rapid Communication* 30 (2009) 176-181.
- Herrmann W.**, Stößer R., Borchert H.-H., *Magnetic Resonance in Chemistry* 45 (2007) 496-507.
- Hervé K.**, Douziech-Eyrolles L., Munnier E., Cohen-Jonathan S., Soucé M., Marchais H., Limelette P., Warmont F., Saboungi M.-L., Dubois P., Chourpa I., *Nanotechnology* 19 (2008) 7pp.

- Hiergeist R.**, Andrä W., Buske N., Hergt R., Hilger I., Richter U., Kaiser W., *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* 201 (1999) 420-422.
- Hilt J. Z.**, *Advanced Drug Delivery Reviews* 56 (2004) 1533-1536.
- Hou C. H.**, Hou S. M., Hsueh Y. S., Lin J., Wu H. C., Lin F. H., *Biomaterials* 30 (2009) 3956–3960.
- Hsia J. C.**, Boggs J. M., *Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America* 70 (1973) 3179-3183.
- Hu F. X.** et al, *Biomaterials* 27 (2006) 5725–5733.
- Hu S. H.**, Liu T. Y., Liu D. M., Chen S. Y., *Macromolecules* 40 (2007) 6786-6788.
- Huang L. Y.** & Yang M. C., *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* 310 (2007) 2874-2876.
- Ishida H.**, Koenig J. L., *Journal of Colloid and Interface Science* 64 (1978) 565-576.
- Isojima T.**, Suh S. K., Vander Sande J. B., Hatton T. A., *Langmuir* (2009)
- Israelachvili J.**, « *Intermolecular and Surface Forces* » academic press London (1991)
- Jain T. K.**, Morales M. A., Sahoo S. K., Leslie-Pelecky D. L., Labhasetwar V., *Molecular Pharmaceutics* 2 (2005) 194-205.
- Jeon O.**, Song S. J., Lee K.-J., Park M. H., Lee S.-H., Hahn S. K., Kim S., Kim B.-S., *Carbohydrate Polymers* 70 (2007) 251-257.
- Jeong B.**, Kim S. W., Bae Y. H., *Advanced Drug Delivery Review* 54 (2002) 37-51.
- Jokerst J. V.**, Raamanathan A., Christodoulides N., Floriano P. N., Pollard A. A., Simmons G. W., Wong J., Gage C., Furmaga W. B., Redding S. W., McDevitt J. T., *Biosensors and Bioelectronics* 24 (2009) 3622–3629
- Jolivet J. P.** & Tronc E., *Journal of Colloid and Interface Science* 125 (1988) 688-701.
- Jolivet J. P.**, InterEditions/CNRS Editions « *De la solution à l'oxyde* » chapitres 6 et 8 (1994).
- Jolivet J. P.**, Chanéac C., Tronc E., *Chemical Communications* 5 (2004) 481-487.
- Jordan A.**, Scholz R., Wust P., Fähling H., Felix R., *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* 201 (1999) 413-419.
- Jores K.**, Mehnert W., Mäder K., *Pharmaceutical Research* 20 (2003) 1274-1283.
- Junk M. J. N.**, Jonas U., Hinderberger D., *Small* 4 (2008) 1485-1493.
- Karatzas A.**, Bilalis P., Iatrou H., Pitsikalis M., Hadjichristidis N., *Reactive & Functional Polymers* 69 (2009) 435-440.
- Keith A.D.**, Sharnoff M., Cohn G.E., *Biochimica et Biophysica Acta* 300 (1973) 379-419.
- Kettering M.**, Winter J., Zeisberger M., Bremer-Streck S., Oehring H., Bergemann C., Alexiou C., Hergt R., Halbhuber K. J., Kaiser W. A., Hilger I., *Nanotechnology* 18 (2007) 175101-175110.
- Khiew P. S.**, Radiman S., Huang N. M., Kan C. S., Ahmad Md. S., *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects* 247 (2004) 35-40.
- Kim D. H.**, Zeng H., Ng T. C., Brazel C. S., *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* 321 (2009) 3899–3904.
- Kim E. H.**, Lee H. S., Kwak B. K., Kim B. K., *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* 289 (2005) 328-330.

- Kim J.**, Park K., Hahn S. K., *International Journal of Biological Macromolecules* 42 (2008) 41-45.
- Kovarskii A. L.**, Soronika O. N., Gorshenev V. N., Tikhonov A. P., *Russian Journal of Physical Chemistry A* 81 (2007) 301-307.
- Koynova R.**, Caffrey M., *Chemistry and Physics of Lipids* 115 (2002) 107-219.
- Kumar A.**, Sahoo B., Montpetit A., Behera S., Lockey R. F., Mohapatra S. S., *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine* 3 (2007) 132-137.
- Kuppusamy P.**, Afeworki M., Shankar R. A., Coffin D., Krishna M. C., Hahn S. M., Mitchell J. B., Zweier J. L., *Cancer Research* 58 (1998) 1562-1568.
- L'Alloret F.**, Maroy P., Hourdet D., Audebert R., *Revue de l'Institut Français du Pétrole* 52 (1997) 117-128.
- Lacroix J. M.**, Bel Malaki R., Carrey J., Lachaize S., Respaud M., Goya G. F., Chaudret B., *Journal of Applied Physics* 105 (2009).
- Lalatonne Y.**, Benyettou F., Bonnin D., Lièvre N., Monod P., Lecouvey M., Weinmann P., Motte L., *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* 321 (2009) 1653-1657.
- Lalatonne Y.**, Paris C., Serfaty J. M., Weinmann P., Lecouvey M., Motte L., *Chemical Communications* 22 (2008) 2553-2555.
- Landfester K.**, *Advanced Materials* 13 (2001) 765-768.
- Landfester K.** & Ramirez L. P., *Journal of Physics: Condensed Matter* 15 (2003) S1345-S1361.
- Lapchak P. A.**, Chapman D. F., Zivin J. A., *Stroke* 32 (2001) 147-153.
- Larsson K.**, *The Journal of Physical Chemistry* 93 (1989) 7304-7314.
- Larsson K.**, *Current Opinion in Colloid & Interface Science* 5 (2000) 64-69.
- Lee D. K.**, Kim Y. H., Kim C. W., Cha H. G., Kang Y. S., *Journal of physical chemistry B* 111 (2007) 9288-9293.
- Lee K. W. Y.**, Nguyen T. H., Hanley T., Boyd B. J., *International Journal of Pharmaceutics* 365 (2009) 190-199.
- Lee Y.**, Lee H., Kim Y. B., Kim J., Hyeon T., Park H., Messersmith P. B., Park T. G., *Advanced Materials* 20 (2008) 4154-4157.
- Lee Y.J.**, Park B.H., Bae S.J., Kim J.H., Kim I.S., Kim G.C., Kim H.J., Lee G.H., Kim T.J. and Chang Y., *Current Applied Physics* 9 (2009) S22–S24
- Le Fort**, *Académie des Sciences de Paris* 34 (1852) 480.
- Lemarchand C.**, Gref R., Couvreur P., *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 58 (2004) 327-341.
- Leo A.**, Hansch C., Elkins D., *Chemical Reviews* 71 (1971) 525.
- Li J.**, Wei X., Yuan Y., *Sensors and Actuators B* 139 (2009) 400–406
- Liang Y. Y.**, Zhang L. M., Jiang W., Li W., *ChemPhysChem* 8 (2007) 2367-2372.
- Lien Y. S.** & Wu T. M., *Advanced Materials Research* 47-50 (2008) 528-531.
- Lindner P.**, Zemb T., «*Neutrons, X-rays and Light : Scattering methods applied to soft condensed matter* » North-Holland Delta Series (2002).

- Liu T. Y.**, Hu S. H., Liu K. H., Liu D. M., Chen S. Y., *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* 304 (2006) e397-e399.
- Liu T. Y.**, Hu S. H., Liu T. Y., Liu D. M., Chen S. Y., *Langmuir* 22 (2006) 5974-5978.
- Liu T. Y.**, Hu S. H., Hu S. H., Tsai S. P., Chen S. Y., *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* 310 (2007) 2850-2852.
- Liu T. Y.**, Liu T. Y., Liu D. M., Chen S. Y., *Journal of Controlled Release* 121 (2007) 181-189.
- Liu T. Y.**, Hu S. H., Liu K. H., Shaiu R. S., Liu D. M., Chen S. Y., *Langmuir* 24 (2008) 13306-13311.
- Liu T. Y.**, Hu S. H., Liu D. M., Chen S. Y., Chen I W., *Nano Today* 4 (2009) 52-65.
- Liu T. Y.**, Liu K. H., Liu D. M., Chen S. Y., Chen I. W., *Advanced Functional Materials* 19 (2009) 616-623.
- Liu X.**, Kaminski M. D., Chen H., Torno M., Taylor L. T., Rosengart A. J., *Journal of Controlled Release* 119 (2007) 52-58.
- Lübbe A. S.**, Bergemann C., Riess H., Schriever F., Reichardt P., Possinger K. *et al*, *Cancer Research* 56 (1996) 4686-4693.
- Lübbe A. S.**, Bergemann C., Huhnt W., Fricke T., Riess H., Brock J. W., Huhn D., *Cancer Research* 56 (1996) 4694-4701.
- Lübbe A. S.**, Alexiou C., Bergemann C., *Journal of Surgical Research* 95 (2001) 200-206.
- Lurie D. J.**, Mäder K., *Advanced Drug Delivery Reviews* 57 (2005) 1171-1190.
- Ma J. W.**, Cunningham M. F., McAuley K. B., Keoshkerian B., Georges M. K., *Journal of Polymer Science : Part A: Polymer Chemistry* 39 (2001) 1081-1089.
- Macheras P.** & Iliadis A., Springer « *Modeling in Biopharmaceutics, Pharmacokinetics, and Pharmacodynamics* », 30 (2005) 58-88.
- Maksina A. G.** & Dainyak B. A., *Biomedical Engineering* 25 (1991) 17-18.
- Martini G.**, Ciana L., *Physical Chemistry Chemical Physics* 11 (2009) 211-254.
- Massart R.**, *IEEE Trans. Magn.* 17 (1981) 1247-1248.
- Matijevic E.**, *Accounts of Chemical Research* 14 (1981) 22-29.
- Matijevic E.**, *Langmuir* 2 (1986) 12-20.
- Mikhail A. S.**, Allen C., *Journal of Controlled Release* 138 (2009) 214-223.
- Mitsumata T.**, Kakiuchi Y., Takimoto J. I., *Research Letters in Physical Chemistry* (2008) 671642 (5 pages).
- Mitsumata T.**, Nagata A., Sakai K., Takimoto J., *Macromolecular Rapid Communications* 26 (2005) 1538-1541.
- Moitzi C.**, Guillot S., Fritz G., Salentinig S., Glatter O., *Advanced Materials* 19 (2007) 1352-1358.
- Mornet S.**, « *Synthèse et modification de la surface de nanoparticules de maghémite à des fins d'applications biomédicales* » Thèse soutenue en 2002 à l'Université de Bordeaux I.
- Mornet S.**, Portier J., Duguet E., *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* 293 (2005) 127.
- Mornet S.**, Vasseur S., Grasset F., Veverka P., Goglio G., Demourgues A., Portier J., Pollert E., Duguet E., *Progress in Solid State Chemistry* 34 (2006) 237-247.



- Müller-Schulte D.**, Schmitz-Rode T., *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* 302 (2006) 267-271.
- Nakano M.**, Teshigawara T., Sugita A., Leesajakul W., Taniguchi A., Kamo T., Matsuoka H., Handa T., *Langmuir* 18 (2002) 9283-9288.
- Necas J.**, Bartosikova L., Brauner P., Kolar J., *Veterinarni Medicina* 53 (2008) 397-411.
- Nishikawa S.**, *Proceeding from Mathematical Physical Society Tokyo* 8 (1915) 199.
- Nishinari K.**, Takahashi R., *Current Opinion in Colloid and Interface Science* 8 (2003) 396-400.
- Okassa Ngaboni L.**, Marchais H., Douziech-Eyrolles L., Cohen-Jonathan S., Soucé M., Dubois P., Chourpa I., *International Journal of Pharmaceutics* 302 (2005) 187-196.
- Okassa Ngaboni L.**, Marchais H., Douziech-Eyrolles L., Hervé K., Cohen-Jonathan S., Munnier E., Soucé M., Linassier C., Dubois P., Chourpa I., *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 67 (2007) 31-38.
- Okawa K.**, Sekine M., Maeda M., Tada M., Abe M., Matsushita N., Nishio K., Handa H., *Journal of Applied Physics* 99 (2006).
- Ozaki M.** & Matijevic E., *Journal of Colloid and Interface Science* 107 (1985) 199-203.
- Pankhurst Q. A.**, Connolly J., Jones S. K., Dobson J., *Journal of Physics D: Applied Physics* 36 (2003) R167-R181.
- Paraskevi H.**, “*Chemistry and Biology of Hyaluronan*” Edited by Garg H. G., Hales C. A., Elsevier (2004).
- Pauly M.**, Pichon B. P., Demortière A., Delahaye J., Leuvre C., Pourroy G., Béguin-Colin S., *Superlattices and Microstructures* 46 (2009) 195-204.
- Peppas N. A.**, *Classes of Materials Used in Medicine (Biomaterials Science)* 2.5 (2003) 35-42.
- Peppas N. A.**, *Advanced Drug Delivery Reviews* 56 (2004) 1529-1531.
- Peppas N. A.**, Huang Y., Torres-Lugo M., Ward J. H., Zhang J., *Annual Review of Biomedical Engineering* 02 (2000) 9-29.
- Polnaszek C. F.**, Schreier S., Butler K. W., Smith I. C. P., *Journal of American Chemical Society* 100 (1978) 8223-8232.
- Popescu G.**, Barauskas J., Nylander T., Tiberg F., *Langmuir* 23 (2007) 496-503.
- Ramirez L. P.** & Landfester K., *Macromolecular Chemistry and Physics* 204 (2003) 22-31.
- Respaud M.**, Goiran M., Yang F., Broto J. M., Ould Ely T., Amiens C., Chaudret B., Askenazy S., *Physica B* 246-247 (1998) 580-583.
- Rondinone A. J.**, Samia A. C. S., Zhang Z. J., *Journal of physical chemistry B* 103 (1999) 6876-6880.
- Rosa M.**, Infante M. R., Miguel M. da G., Lindman B., *Langmuir*, 22 (2006) 5588-5596.
- Rosensweig R. E.**, *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* 252 (2002) 370-374.
- Rubio-Retama J.**, Zafeiropoulos N. E., Serafinelli C., Rojas-Reyna R., Voit B., Cabarcos E. L., Stamm M., *Langmuir* 23 (2007) 10280-10285.
- Sagalowicz L.**, Leser M. E., Watzke H. J., Michel M., *Trends in Food Science & Technology* 17 (2006) 204-214.

- Sakulku U.**, Nuchuchua O., Uawongyart N., Puttipatkhachorn S., Soottitantawat U., *International Journal of Pharmaceutics* 372 (2009) 105–111.
- Salonen A.**, Guillot S., Glatter O., *Langmuir* 23 (2007) 9151-9154.
- Sankaram M. B.**, Easwaran K. R. K., *Journal of Bioscience* 5 (1984) 635-642.
- Satarkar N. S. & Hilt J. Z.**, *Acta Biomateriali* 4 (2008) 11-16.
- Satarkar N. S. & Hilt J. Z.**, *Journal of Controlled Release* 130 (2008) 246-251.
- Satish C. S.**, Satish K. P., Shivakumar H. G., *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences* 68 (2006) 133.
- Schmidt A. M.**, *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* 289 (2005) 5–8.
- Seddon J. M.**, Zeb N., Templer R. H., Mc Elhaney R. N., Mannock D. A., *Langmuir* 12 (1996) 5250-5253.
- Shah D. N.**, Recktenwall-Work S. M., Anseth K. S., *Biomaterials* 29 (2008) 2060-2072.
- Shearman G. C.**, Ces O., Templer R. H., Seddon J. M., *Journal of Physics : Condensed Matter* 18 (2006) S1105-S1124.
- Shimshick E. J. & McConnell H. M.**, *Biochemistry* 12 (1973) 2351-2360.
- Sjoberg H.**, Persson S., Caram-Lelham N., *Journal of Control Release* 59 (1999) 391-400.
- Soler M. A. G.**, Alcantara G. B., Soares F. Q., Viali W. R., Sartoratto P. P. C., Fernandez J. R. L., da Silva S. W., Garg V. K., Oliveira A. C., Morais P. C., *Surface Science* 601 (2007) 3921-3925.
- Sonvico F.**, Mornet S., Vasseur S., Dubernet C., Jaillard D., Degrouard J., Hoebeke J., Duguet S., Colombo P., Couvreur P., *Bioconjugate Chemistry* 16 (2007) 1181-1188.
- Spicer P. T.**, Small W. B., Lynch M. L., Burns J. L., *Journal of Nanoparticle Research* 4 (2002) 297-311.
- Steitz B.**, Salaklang J., Finka A., O’Neil C., Hofmann H., Petri-Fink A., *Bioconjugate Chemistry* 18 (2007) 1684-1690.
- Stover T. C.**, Kim Y. S., Lowe T. L., Kester M., *Biomaterials* 29 (2008) 359-369.
- Subczynski W. K.**, Wojas J., Pezeshk V., Pezeshk A., *Journal of Inorganic Biochemistry* 55 (1994) 1-11.
- Sugimoto T. & Matijevic E.**, *Journal of Colloid and Interface Science* 74 (1980) 227-243.
- Sui K.**, Yang C., Gao S., Shan X., Xia Y., Zhang Q., *Journal of Applied Polymer Science* 114 (2009) 1914-1920.
- Sun S. & Zeng H.**, *Journal of American Chemical Society* 124 (2002) 8204-8205.
- Sun S.**, Zeng H., Robinson D. B., Raoux S., Rice P. M., Wang S. X., Li G., *Journal of American Chemical Society* 126 (2004) 273-279.
- Tanford C.**, *«The hydrophobic effect»* Wiley NY (1976).
- Testa G.**, Di Meo C., Nardecchia S., Capitani D., Mannina L., Lamanna R., Barbetta A., Dentini M., *International Journal of Pharmaceutics* 378 (2009) 86-92.
- Tomsic M.**, Guillot S., Sagalowicz L., Leser M. E., Glatter O., *Langmuir* 25 (2009) 9525-9534.

- Toprak M. S.**, McKenna B. J., Mikhaylova M., Waite J. H., Stucky G. D., *Advanced Materials* 19 (2007) 1362-1368.
- Tronc E.**, Jolivet J. P., Massart R., *Material Research Bulletin* 17 (1982) 1365-1369.
- van den Bekerom M. P. J.**, Rys B., Mulier M., *Archives of Orthopaedic and Trauma Surgery* 128 (2008) 275-280.
- van de Velde F.**, Lourenço N. D., Pinheiro H. M., Bakker M., *Advanced Synthesis and Catalysis* 344 (2002) 815-835.
- Vasseur S.**, « *Synthèse, caractérisation et échauffement par induction de nanoparticules magnétiques hybrides à cœur  $La_{0,75}Sr_{0,25}MnO_3$  pour applications thérapeutiques en cancérologie.* » Thèse soutenue en 2007 à l'Université de Bordeaux 1.
- Vayssières L.**, Chanéac C., Tronc E., Jolivet J. P., *Journal of Colloid and Interface Science* 205 (1998) 205-212.
- Vayssières L.**, *International Journal of Nanotechnology* 2 (2005) 411-439.
- Vayssières L.**, *The Journal of Physical Chemistry C Letters* 113 (2009) 4733-4736.
- Vileno B.**, « *Oxidative stress on biomaterials: from molecules to cell* » Thèse soutenue en 2006 à l'Ecole Polytechnique Fédérale de Lausanne.
- Viriyaraj A.**, Kashiwagi H., Ueno M., *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* 53 (2005) 1140-1146.
- Wang W.**, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 17 (2006) 1259-1265.
- Wu W.**, He Q., Jiang C., *Nanoscale Research Letters* 3 (2008) 397-415.
- Xiang G.**, Wu J., Lu Y., Liu Z., Lee R. J., *International Journal of Pharmaceutics* 356 (2008) 29-36.
- Xu Z.**, Liu Q., Finch J. A., *Applied Surface Science* 120 (1997) 269-278.
- Xulu M. P.**, Filipcsei G., Zrinyi M., *Macromolecules* 33 (2000) 1716-1719.
- Yaghmur A.**, de Campo L., Sagalowicz L., Leser M. E., Glatter O., *Langmuir* 21 (2005) 569-577.
- Yaghmur A.**, de Campo L., Salentinig S., Sagalowicz L., Leser M. E., Glatter O., *Langmuir* 22 (2006) 517-521.
- Yaghmur A.**, de Campo L., Sagalowicz L., Leser M. E., Glatter O., *Langmuir* 22 (2006) 9919-9927.
- Yaghmur A.** & Glatter O., *Advances in Colloid and Interface Science* 147-148 (2009) 333-342.
- Yan F.**, Texter J., *Advances in Colloid and Interface Science* 128-130 (2006) 27-35.
- Yang J. K.**, Yu J. H., Kim J., Choa Y. H., *Materials Science and Engineering A* 449-451 (2007) 477-479.
- Yang P. F.**, Lee C. K., *Biochemical Engineering Journal* 33 (2007) 284-289.
- Yeo Y.**, Ito T., Bellas E., Highley C. B., Marini R., Kohane D. S., *Annals of Surgery* 245 (2007) 819-824.
- Yoon T. J.**, Kim J. S., Kim B. G., Yu K. N., Cho M. H., Lee J. K., *Angewandte Chemie International Edition* 44 (2005) 1068-1071.
- Yun Y. H.**, Goetz D. J., Yellen P., Chen W., *Biomaterials* 25 (2004) 147-157.
- Zhang J. L.**, Srivastava R. S., Misra R. D. K., *Langmuir* 23 (2007) 6342-6351.
- Zhao H.**, Yung L. Y. L., *Pharmaceutical Nanotechnology* 349 (2008) 256-268.

**Zhao W.**, Chen H., Li Y., Li L., Lang M., Shi J., *Advanced Functional Materials* 18 (2008) 2780–2788.

**Zrinyi M.**, *Colloid and Polymer Science* 278 (2000) 98-103.







**Irena MILOSEVIC**

## **Emulsions structurées et nanoparticules magnétiques dans un hydrogel: réalisation, caractérisation et validation en tant que système de délivrance thermomagnétique**

Résumé :

Le développement des nanotechnologies a permis à la médecine de progresser là où les méthodes traditionnelles de diagnostic et de thérapie connaissaient certaines limites. La manipulation et le contrôle de l'infiniment petit permet aujourd'hui de créer des systèmes adaptés à l'environnement cellulaire.

Dans ce travail, nous nous sommes intéressés au potentiel des nanoparticules magnétiques d'oxyde de fer en nanomédecine et notamment à l'utilisation de leurs propriétés magnétiques particulières pour la mise au point de nouveaux matériaux pour la délivrance de principe actif par activation thermomagnétique. Notre système est constitué d'un hydrogel physique biocompatible, de nanoparticules magnétiques et d'émulsions de mésophases lipidiques (Isasomes). Les Isasomes sont des dispersions de systèmes auto assemblés qui selon la température peuvent changer de structure (phases hexagonales, cubiques,...). L'ajout d'un principe actif aux Isasomes peut aussi modifier leur structure interne ; des mesures de SAXS ont permis de confirmer cet effet. Ces émulsions nanostructurées ont servi de réservoir aux molécules modèles de principe actif (le radical TEMPO). Après activation magnétique, la diffusion contrôlée du principe actif hors de l'hydrogel a été suivie par RPE. Enfin, les nanoparticules ont été fonctionnalisées de façon à concevoir un hydrogel réticulé par les nanoparticules magnétiques. Les diverses étapes de la fonctionnalisation ont été validées par différentes techniques expérimentales (Diffraction de rayons X, MET, Raman, IRTF, Zétamétrie, ATG, XPS).

Mots clés: Nanoparticules magnétiques, mésophases lipidiques, Isasomes, hydrogel, fonctionnalisation, réticulation, délivrance thermomagnétique, RPE.

## **Structured emulsions and magnetic nanoparticles in a hydrogel: achievement, characterization and validation as a thermomagnetic delivery system**

Summary :

The development of nanotechnology led to significant progress in medicine especially where traditional methods of diagnosis and therapy showed limits. The manipulation and control of the physics at the nanoscale offered new opportunities for creating systems tailored to the cellular environment. In this work, we were interested in the high potential of magnetic nanoparticles of iron oxide in medicine. In particular, we would like to use their peculiar magnetic properties for developing new materials for the delivery of active compounds through thermomagnetic activation. Our system consists of a biocompatible hydrogel with confined magnetic nanoparticles and lipid-based emulsions, called Isasomes. Those are dispersions of lipid mesophases (hexagonal, cubic,...) that can be tuned by temperature or composition. The incorporation of an active compound into the Isasomes can equally modify their internal structure as confirmed by SAXS measurements. These nanostructured emulsions are used here as reservoirs for model molecules (radical TEMPO), which are trapped into the hydrogel. After magnetic activation, the controlled release of TEMPO outside the hydrogel has been followed by Electron Paramagnetic Resonance (EPR). Finally, magnetic nanoparticles have been functionalized and connected to hyaluronic acid in order to design a crosslinked hydrogel. The various steps of functionalization have been checked by various experimental techniques (Xrays, Raman spectroscopy, TEM, FTIR, zetametry, TGA, XPS).

Keywords: magnetic nanoparticles, lipid mesophases, Isasomes, hydrogel, functionalization, crosslink, thermomagnetic drug delivery, EPR.

**Centre de Recherche sur la Matière Divisée  
1b, Rue de la Férellerie  
45071 Orléans Cedex 2, France**