



Incorporation de nanoparticules inorganiques dans des vésicules multilamellaires lipidiques de type " oignon "

Marie-Edith Meyre

► To cite this version:

Marie-Edith Meyre. Incorporation de nanoparticules inorganiques dans des vésicules multilamellaires lipidiques de type " oignon ". Matière Condensée [cond-mat]. Université Sciences et Technologies - Bordeaux I, 2007. Français. NNT : . tel-00586017

HAL Id: tel-00586017

<https://theses.hal.science/tel-00586017>

Submitted on 14 Apr 2011

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.

N° d'ordre : 3520

THESE

Présentée à

L'Université BORDEAUX 1

Ecole doctorale des Sciences chimiques

par **Marie-Edith MEYRE**

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR

Spécialité : Physico-chimie de la Matière Condensée

Incorporation de nanoparticules inorganiques dans des
vésicules multilamellaires lipidiques de type « oignon »

Soutenue le : 6 Décembre 2007

Après avis de : Mme Valérie Cabuil Rapporteurs
 M. Jean-Marie Devoisselle

Devant la commission d'examen formée de :

MM.	Etienne Duguet	Professeur, Université Bordeaux 1	Président
	Philippe Richetti	Directeur de Recherche, CNRS	Examineurs
	Christophe Petit	Professeur, Université P. et M. Curie	
	Jean-Marie Devoisselle	Professeur, Université Montpellier 1	
Mme	Valérie Cabuil	Professeur, Université P. et M. Curie	
Mme	Chrystel Faure	Maître de Conférence, Université Bordeaux 1	

Remerciements

Ce manuscrit représentant l'aboutissement d'un travail de trois ans, il me donne l'occasion de souligner toutes les personnes qui y ont contribué, de part leur travail et leur soutien.

Je tiens d'abord à remercier Messieurs Philippe Barois et Philippe Richetti de m'avoir accueillie au Centre de Recherche Paul Pascal durant ces trois années.

Je voudrais également remercier les membres du jury pour l'intérêt qu'ils ont manifesté à l'égard de ce travail et les discussions enthousiastes que leur présence à la soutenance a pu générer : Madame Valérie Cabuil et Monsieur Jean-Marie Devoisselle, qui ont accepté de rapporter ce travail, de même que Monsieur Christophe Petit. Enfin, je souhaite remercier Monsieur Etienne Duguet, pour ses encouragements en tant que président du jury, et pour l'enthousiasme et les conseils « distillés » tout au long de ma thèse.

Je remercie également Chrystel Faure, qui m'a encadrée et formée durant ces trois ans (et un peu plus !), dont la détermination constitue un appui solide dans les moments de doutes, et qui m'a donné quelques unes des « clés » pour pouvoir continuer à chercher encore un peu...

Je souhaite aussi mentionner les personnes qui ont participé à l'avancement de ce travail, d'abord grâce aux échanges que nous avons pus avoir, et ensuite grâce à leur savoir-faire : Mona Treguer-Delapierre et Thierry Cardinal (ICMCB) pour les expériences d'irradiation, Olivier Lambert et Sylvain Trépout (IECB), Elisabeth Sellier et Michel Martineau (CREMEM- merci pour votre patience Michel !) pour les images de microscopie électronique, François Dole (CRPP) pour les expériences de RPE, Rodolphe Clérac (CRPP) pour les mesures de magnétisme, Jean-Michel Franconi et Gérard Raffard (RMSB) pour les mesures de relaxivité, et enfin l'ensemble de l'activité SysBio du CRPP.

Je commencerai les remerciements un peu moins officiels par les membres du CRPP qui ont rendu certains jours au laboratoire plus légers, par leur écoute et leur bonne humeur ; je pense plus particulièrement à Pauline bien sûr, Nadine, Véronique, Nelly, Florent, Eric, Pascal, Adeline, Florence, Marie-France, Béatrice, Etienne et Wilfried (conductimétrie quand tu nous tiens !). Un salut amical aux doctorants rencontrés durant ces trois années : Amélie, Mathieu, Jean-François, Sébastien, Benoît, Pierre, Ahmed, Noémie, Emilie, Antoine, Lucy et Jeanne-Marie ; je n'oublie pas non plus les post-doc qui sont passés par ici (et repasseront peut-être par là) Samuel, Cyrille, Vincent et Anthony.

Une pensée particulière va à l'équipe d'Etienne Duguet à l'ICMCB : Lydia, Céline, David, Mona, Marie-Hélène, Sébastien, Stéphane, avec lesquels j'ai eu le plaisir de travailler et de partager de joyeux moments dans divers congrès !

Je pense également à mes « collègues » avec qui il a fait bon ricaner autour d'un verre ou deux : Thomas, Virginie, Christophe, Aurélien, Fred, Yann et Pauline.

Puis il y a les amis de longue longue date, qui pourraient dire « je serai là pour toi » comme certains boys bands de la belle époque... Alors Hélène, Sophie B., Stéphane, Anne-Cécile, Sophie K., Nico, Martie et Julien : merci d'être là !

Enfin je profiterai de cette occasion pour adresser mes plus affectueuses pensées à mes parents et à ma sœur, qui m'ont toujours soutenue et fait confiance : merci beaucoup beaucoup.

Sommaire

Introduction générale.....	1
----------------------------	---

Chapitre 1 : Système d'étude et techniques de caractérisation

I- Fabrication et caractéristiques des vésicules multilamellaires de type « oignon »

A- Formation.....	5
1. Phases lamellaires de tensioactifs	
2. Instabilité des phases lamellaires sous cisaillement	
B- Préparation et caractéristiques des oignons utilisés.....	10
1. Préparation du mélange de tensioactifs	
2. Principe de fabrication des oignons	
3. Caractéristiques des oignons formés	

II- Techniques expérimentales

A- Microscopie électronique en transmission (MET) et cryoMET.....	14
1. Microscopie électronique en transmission (MET)	
2. Cryo-microscopie électronique en transmission	
B- Diffusion dynamique de la lumière.....	15
C- Diffraction des rayons X.....	17
D- Mesures magnétiques.....	18
1. Propriétés magnétiques de la matière	
2. Principe d'un magnétomètre à détection SQUID	
E- Résonance paramagnétique électronique.....	22
1. Le phénomène de résonance	
2. Principe d'un spectromètre RPE	

Références.....	27
-----------------	----

Chapitre 2 : Synthèse intravésiculaire de nanoparticules d'or

PARTIE 1 : INTRODUCTION

I- Synthèse de nanoparticules inorganiques en milieu confiné organique

A- Le phénomène de nucléation-croissance.....	29
1. Nucléation	
2. Croissance	
3. Vieillissement : mûrissement d'Ostwald	
4. Conclusion	
B- Contrôle de la morphologie des particules via les milieux colloïdaux.....	33
1. Ligands, tensioactifs et polymères	
2. Micelles de copolymères à blocs	
3. Dendrimères	
4. Micelles inverses	
5. Phases lamellaires	
6. Vésicules unilamellaires lipidiques	
7. Vésicules multilamellaires de type « oignon »	
C- Conclusion.....	43

II- Les nanoparticules d'or : propriétés et intérêts

A- Propriétés des nanoparticules d'or.....	44
1. Propriétés optiques	
2. Propriétés chimiques	
B- Applications biomédicales.....	46
1. Imagerie	
2. Photothermie	
C- Applications en catalyse.....	49

PARTIE 2 : RESULTATS

I- Formation des précurseurs de charge nulle.....	53
A- La monooléine comme agent réducteur.....	54
B- Les phosphatidylcholines (PC) comme catalyseur de la réduction.....	56
C- Mécanisme de réduction de Au(+III) en Au(0).....	59
II- Stratégies utilisées pour la préparation d'hybrides oignon/nanoparticules d'or.....	61
A- Diffusion des ions précurseurs.....	61
1. Principe	
2. Avantages et inconvénients de la méthode	
B- Encapsulation des ions précurseurs.....	64
1. Principe	
2. Avantages et inconvénients de la méthode	
III- Formation de nanoparticules d'or par diffusion des ions précurseurs.....	65
A- Mise en évidence de la synthèse des nanoparticules d'or.....	66
B- Morphologie des particules formées.....	67
C- Stabilité de l'hybride oignon/nanoparticules d'or.....	68
D- Conclusion.....	69
IV- Formation de nanoparticules d'or par encapsulation des ions précurseurs....	69
A- Réduction chimique.....	69
1. Mise en évidence de la synthèse des nanoparticules d'or.....	71
2. Contrôle de la taille des particules via la composition des bicouches.....	73
3. Différentes morphologies de particules observées.....	75
4. Croissance des agrégats dendritiques.....	84

5. Stabilité de l'hybride oignon/nanoparticules d'or.....	87
6. Conclusion.....	95
B- Photoréduction par UV.....	95
1. Mécanisme de réduction.....	96
2. Nucléation et croissance des particules.....	97
3. Stabilité de l'hybride oignon/nanoparticules d'or.....	101
4. Conclusion.....	105
C- Radiolyse γ.....	105
1. Mécanisme de réduction.....	106
2. Nucléation et croissance des particules.....	107
3. Stabilité de l'hybride oignon/nanoparticules d'or.....	109
4. Conclusion.....	111
 V- Conclusion.....	 112
 Références.....	 114

Chapitre 3 : Elaboration d'oignons magnétiques

PARTIE 1 : INTRODUCTION

I- Contexte général : la vectorisation.....	123
A- Problématique.....	123
B- Les vecteurs particuliers.....	125
C- Le vecteur oignon.....	127
1. Propriétés	
2. Encapsulation	
3. Ciblage	
II- Les colloïdes magnétiques	
A- Intérêt pour le biomédical.....	129
B- Description des systèmes colloïdaux magnétiques.....	130
1. Les ferrofluides	
2. Les vésicules unilamellaires lipidiques magnétiques	

PARTIE 2 : RESULTATS

I- Synthèse intravésiculaire de nanoparticules d'oxyde de fer.....	134
A- Formation des précurseurs de charge nulle (ou monomères).....	134
1. La condensation inorganique	
2. Condensation des ions ferreux Fe^{2+} et ferriques Fe^{3+}	
B- Principe de fabrication des hybrides oignon/oxyde de fer.....	139
C- Encapsulation des ions ferreux Fe^{2+} et ferriques Fe^{3+}.....	142
1- Dosage des ions ferriques Fe^{3+}	143
2- Dosage des ions ferreux Fe^{2+}	146

3- Conclusion et discussion.....	148
D- Caractérisation des nanoparticules formées.....	150
1. Taille des nanoparticules formées.....	151
2. Structure cristalline.....	157
3. Propriétés magnétiques des nanoparticules.....	162
4. Stabilité de l'hybride oignon/particules.....	166
E- Conclusion.....	169
 II- Encapsulation d'un ferrofluide dans les oignons.....	 170
A- Stratégie d'encapsulation.....	170
1. Le ferrofluide utilisé.....	170
2. Préparation de l'hybride oignon/particules magnétiques.....	177
3. Elimination des particules non encapsulées.....	178
B- Encapsulation des nanoparticules magnétiques dans les oignons.....	182
1. Effet des nanoparticules sur la stabilité de la phase lamellaire cisailée.....	182
2. Etude qualitative de l'encapsulation par cryoMET.....	185
3. Etude quantitative : mesure d'un taux d'encapsulation.....	190
4. Conclusion et discussion.....	197
 Références.....	 199

Chapitre 4 : Applications

I- Applications des oignons magnétiques pour l'IRM.....	207
A- L'imagerie par résonance magnétique et les agents de contraste.....	207
1. La résonance magnétique nucléaire (RMN)	
2. Le contraste en IRM	
3. Les agents de contraste	
B- Systèmes colloïdaux magnétiques et IRM : état de l'art.....	216
C- Les oignons magnétiques comme agents de contraste.....	218
1. Nanoparticules magnétiques incorporées par encapsulation d'un ferrofluide	
2. Nanoparticules magnétiques incorporées par synthèse in situ	
II- Applications des oignons magnétiques pour l'hyperthermie magnétique.....	228
A- Principe de l'hyperthermie.....	228
B- Oignons magnétiques et hyperthermie.....	231
1. Nanoparticules magnétiques incorporées par encapsulation d'un ferrofluide	
2. Nanoparticules magnétiques incorporées par synthèse in situ	
III- Applications des hybrides oignon/nanoparticules d'or pour la catalyse supportée.....	234
A- Elaboration des catalyseurs.....	235
1. Nanoparticules d'or	
2. Nanoparticules d'argent	
3. Calcination	
B- Activité catalytique.....	239
Références.....	243
Conclusion générale.....	245

L'élaboration de « nanomatériaux » constitue un enjeu important pour le développement de technologies toujours plus performantes : miniaturisation de l'information, puces à ADN, lasers, textiles intelligents, pots catalytiques, etc. Les progrès considérables de ces trente dernières années en matière de synthèse ont permis d'élaborer des « briques » élémentaires toujours plus petites et de les assembler afin de leur conférer de nouvelles propriétés, collectives. Les travaux du récent prix Nobel de physique, Albert Fert, découlent par exemple de l'acquisition de ce savoir-faire. Ce sont en effet des « nanostructures magnétiques », alternance de couches ultra-minces d'un matériau ferromagnétique et d'un métal non magnétique, qui permettent de développer une magnétorésistance géante conférant au matériau une capacité de stockage de l'information très élevée.

Les nanoparticules, plus particulièrement, suscitent un intérêt grandissant de la communauté scientifique. De part leur taille submicronique, elles présentent des propriétés optiques, mécaniques, magnétiques ou chimiques, que ne possède pas le matériau à l'état massif. Ces propriétés originales sont totalement gouvernées par des effets quantiques de surface, et dépendent de la taille et de la forme des nanoparticules. La synthèse de nanoparticules de morphologie contrôlée est donc devenue un enjeu majeur des sciences des matériaux, de même que la compréhension des mécanismes de formation du solide à l'état colloïdal. Ainsi, les paramètres de synthèse influents ont pu être mis en évidence de façon empirique : ceci a permis d'améliorer le contrôle de taille et de forme. Les synthèses en milieux confinés organiques ou inorganiques ont également été largement développées dans ce même but.

Ce travail de thèse s'inscrit dans ce contexte général. En effet, il a consisté :

- d'une part, à utiliser le milieu confiné que constitue l'oignon pour la synthèse de nanoparticules de taille contrôlée,

- d'autre part, à apporter des « fonctionnalités » supplémentaires à un système bien connu au laboratoire, les vésicules multilamellaires lipidiques de type « oignon », via l'incorporation de nanoparticules inorganiques.

Depuis leur découverte en 1991 par Olivier Diat et Didier Roux, les phases oignons ont suscité de nombreux travaux de recherche au sein du laboratoire, notamment dans la thématique de la vectorisation. Dans l'optique de l'élaboration d'un « vecteur oignon », les études se sont dirigées vers l'encapsulation de biomolécules d'intérêt thérapeutique (agents cytotoxiques, antigènes, oligonucléotides, ADN) au sein des oignons et son efficacité *in vivo*, vers la fonctionnalisation de surface de l'oignon pour le ciblage ou encore vers l'étude de l'adhésion spécifique oignons-cellules.

L'oignon a donc d'abord été envisagé comme un outil thérapeutique, mais il est aussi possible de lui attribuer une fonction diagnostique grâce à l'insertion de nanoparticules magnétiques. En effet, celles-ci font partie de la classe des agents de contraste T_2 pour l'Imagerie par Résonance Magnétique. Cette technique d'imagerie médicale permet de visualiser et de détecter un tissu malade par des différences de contraste, renforcées notamment par les agents de contraste. De plus, lorsqu'elles sont placées dans un champ magnétique oscillant, les nanoparticules magnétiques provoquent un échauffement local affectant les cellules malades et favorisant l'efficacité de traitements chimiothérapeutiques par exemple. Cette propriété d'échauffement permet aussi d'envisager une délivrance contrôlée du médicament via l'utilisation d'oignons « thermosensibles ». Les oignons magnétiques présenteraient ainsi des fonctionnalités modulables selon les conditions d'utilisation, à la fois vecteur de principe actif, « médiateurs » d'hyperthermie localisée, et agent de contraste IRM. Ce projet fait partie du réseau d'excellence FAME, Functionalized Advanced Materials and Engineering, qui vise à rassembler des scientifiques d'horizons différents en vue de développer les applications des nanotechnologies que ce soit dans le domaine de la vectorisation, de l'optique ou de l'environnement.

Concernant ce dernier point, l'intérêt des scientifiques et industriels pour l'élimination de polluants comme les composés organiques volatiles (COV) par des traitements catalytiques

est grandissant. Les nanoparticules, et plus particulièrement de métaux nobles, sont de plus en plus utilisées en catalyse hétérogène car leur rapport surface sur volume élevé leur procure une très grande réactivité. L'incorporation de nanoparticules d'or et d'argent au sein des oignons a été réalisée dans l'optique d'utiliser cet « hybride organique/inorganique » pour répondre à des problèmes de frittage entre particules, habituellement rencontrés lors des traitements thermiques nécessaires à la fabrication des catalyseurs.

Ainsi, autour du colloïde original que constitue l'oignon, plusieurs aspects des sciences des matériaux seront abordés dans ce manuscrit. Dans le premier chapitre, nous décrirons la fabrication et les propriétés des oignons. Les techniques de caractérisation du système seront ensuite brièvement décrites. Le chapitre 2 sera consacré à la synthèse de nanoparticules d'or au sein de l'oignon. Une première partie fera un état de l'art des différents milieux colloïdaux utilisés pour réaliser la synthèse de nanoparticules en milieu confiné organique, et des applications des nanoparticules d'or dans le biomédical et dans la catalyse. La deuxième partie détaillera les caractéristiques des nanoparticules d'or obtenues ainsi que celles de l'hybride. L'élaboration d'oignons magnétiques fera l'objet du chapitre 3. Une première partie posera les concepts de base de la vectorisation et décrira les différents systèmes colloïdaux magnétiques étudiés dans la littérature. La deuxième partie présentera les résultats avec les deux approches envisagées : une synthèse *in situ* de nanoparticules d'oxyde de fer, et l'encapsulation de particules synthétisées par voie hydrothermale, constituant un ferrofluide. Le chapitre 4 sera consacré aux applications des hybrides oignon/nanoparticules comme agent de contraste pour l'IRM. Nous présenterons aussi les premiers tests réalisés en hyperthermie, ainsi qu'en catalyse.

Chapitre 1

Systeme d'étude et
techniques de
caractérisation

Dans ce chapitre, nous allons décrire les vésicules multilamellaires de type « oignon », leur fabrication et leurs caractéristiques physico-chimiques. Les techniques expérimentales employées au cours de ce travail de thèse seront ensuite brièvement décrites.

I- Fabrication et caractéristiques des vésicules multilamellaires de type « oignon »

A- Formation

1. Phases lamellaires de tensioactifs

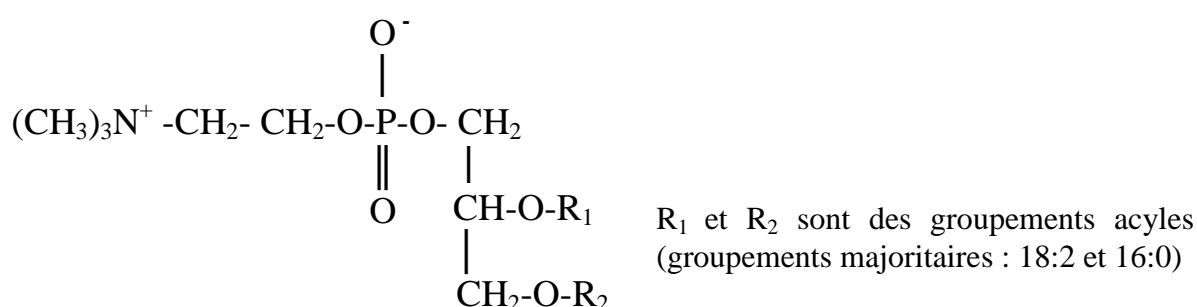
Afin de répondre à des contraintes stériques et entropiques, les molécules amphiphiles mélangées à de l'eau ont tendance à s'assembler dans des configurations plus favorables en terme d'énergie libre. Les formes des assemblages dépendent de la concentration en tensioactifs (systèmes lyotropes), de la température (systèmes thermotropes), mais aussi de la géométrie de la molécule amphiphile. Par exemple, pour une concentration faible en tensioactifs, on obtient plutôt des petites micelles sphériques, alors qu'à une concentration plus élevée, les micelles sphériques vont fusionner pour former des micelles cylindriques. Un tensioactif de forme cône avec une tête polaire volumineuse va former préférentiellement

des micelles directes, alors qu'un tensioactif avec une petite tête polaire et une partie hydrophobe volumineuse va s'arranger en micelles inverses.

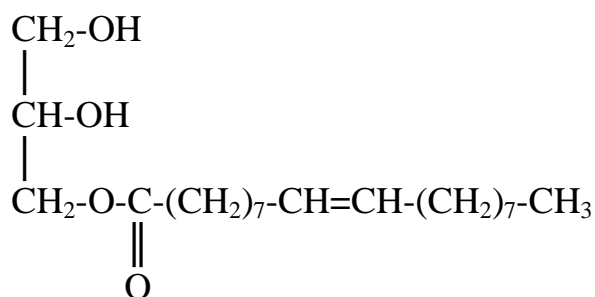
Nous voyons que les assemblages obtenus dépendent de la structure de la molécule amphiphile. Il est possible de modifier les propriétés d'assemblage d'un tensioactif en changeant sa géométrie ou plus simplement par mélange de tensioactifs de géométries différentes. Par exemple, un mélange de phosphatidylcholine (PC) et de sels biliaries s'organise en micelles en forme de disques¹. La phosphatidylcholine, s'assemblant préférentiellement dans des configurations planaires, se concentre sur les deux faces du disque, alors que les sels biliaries, s'assemblant plutôt dans des configurations courbées, se placent sur le bord. La formulation fournit ainsi un outil de contrôle des comportements des phases lyotropes plus aisé que la synthèse de nouveaux tensioactifs.

Les tensioactifs utilisés pour la formulation des oignons préparés dans ce travail sont les suivants :

-la phosphatidylcholine de formule semi-développée :



-la monooléine de formule semi-développée :



-dans certains cas (nanoparticules d'or), l'octadécylamine : $\text{CH}_3 - (\text{CH}_2)_{15} - \text{NH}_2$

Pour la grande majorité des échantillons préparés, la formulation du mélange de tensioactifs contient 95 % en masse de phosphatidylcholine (soit 90 % molaire) et 5 % en masse de monooléine (soit 10 % molaire). Cette formulation est biocompatible, propriété nécessaire pour d'éventuelles applications biomédicales. La phosphatidylcholine est donc le constituant majoritaire des oignons. Le diagramme de phases d'un mélange phosphatidylcholine / eau est représenté dans la figure 1.1. Il présente les différentes phases cristal liquide formées par ce mélange en fonction de la température et de la composition du mélange.

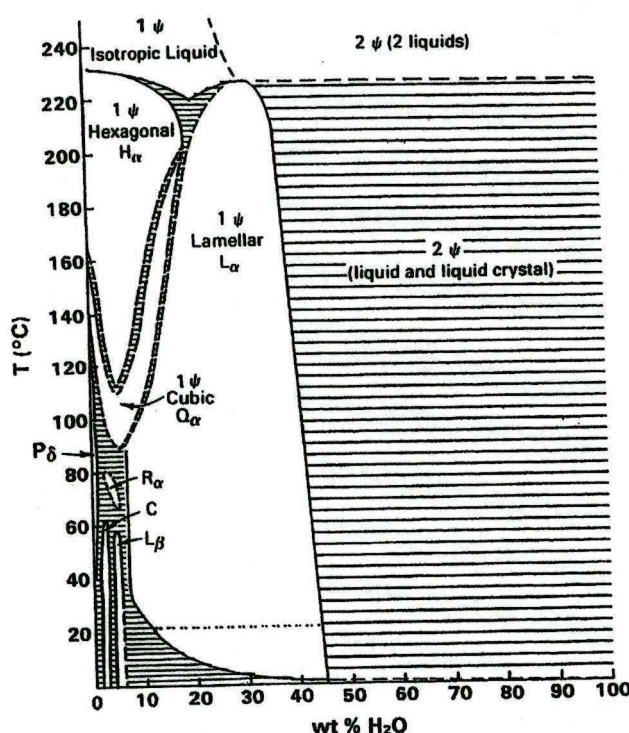


Figure 1.1 : Diagramme de phases à l'équilibre thermodynamique du mélange PC / eau en fonction de la température (la PC est extraite du jaune d'œuf)¹

D'après ce diagramme de phases, à température ambiante, la phase lamellaire (marquée par le trait gras) est présente dans une large gamme de concentration (pourcentage massique en eau compris entre 12 et 45%). Elle est constituée d'un empilement régulier de périodicité d (distance de répétition ou pas smectique) de membranes bidimensionnelles appelées bicouches d'épaisseur δ , séparées par une couche d'eau d'épaisseur e . Cette structure, caractéristique d'une phase cristal liquide de type smectique, est à l'équilibre

thermodynamique. La figure 1.2 montre une représentation schématique d'une phase lamellaire.

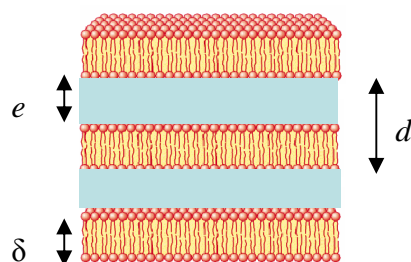


Figure 1.2 : Représentation schématique d'une phase lamellaire de tensioactifs

2. Instabilité des phases lamellaires sous cisaillement

Une phase lamellaire se présente comme l'empilement de bicouches de molécules amphiphiles. Elle est donc organisée au niveau microscopique (quelques nanomètres), mais au niveau mésoscopique (quelques micromètres), la phase lamellaire présente un certain nombre de défauts d'empilement des membranes : rupture d'une membrane, repliement d'une membrane sur elle-même, connexion locale d'une membrane à sa voisine... Les défauts séparent des zones bien orientées. La répartition des défauts au sein de la phase lamellaire peut être modifiée par une action mécanique imposant une contrainte, comme le cisaillement.

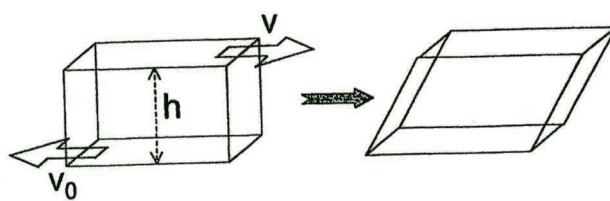


Figure 1.3 : Déformation d'un parallélépipède sous l'effet du cisaillement²; le cisaillement

$$\text{est caractérisé par le taux de cisaillement } \dot{\gamma} = \frac{v - v_0}{h}$$

La figure 1.3 définit la contrainte de cisaillement sur un parallélépipède : le cisaillement est défini comme l'action de deux forces parallèles et opposées qui s'appliquent sur un volume.

Le parallélépipède tend à se déformer sous l'effet du cisaillement. Un fluide comme une phase lamellaire peut être soumis à une contrainte de cisaillement lorsqu'il est placé entre deux parois en mouvement l'une par rapport à l'autre : la couche de fluide en contact avec les deux parois suit leur mouvement par adhérence, entraînant l'écoulement du reste du fluide. Les cellules de Couette permettent d'appliquer une telle contrainte de façon contrôlée. Elles sont constituées de deux cylindres concentriques, un rotor en rotation constante et un stator immobile, entre lesquels s'écoule le fluide. La vitesse de rotation du rotor ω , son diamètre $2r$ et l'entrefer h qui sépare rotor et stator définissent le taux de cisaillement $\dot{\gamma}$ du fluide, homogène dans toute la cellule :

$$\dot{\gamma} = \frac{r\omega}{h}$$

L'écoulement des phases lamellaires sous cisaillement a été étudié par Olivier Diat durant sa thèse³. Il a montré que les phases lamellaires de tensioactifs sous cisaillement peuvent s'organiser à l'échelle mésoscopique sous diverses formes selon le taux de cisaillement. Il présente les états observés dans le diagramme de phases stationnaires hors d'équilibre de la phase lamellaire SDS/pentanol/dodécane/eau en fonction de la fraction volumique Φ de membrane et du taux de cisaillement auquel est soumise la phase lamellaire.

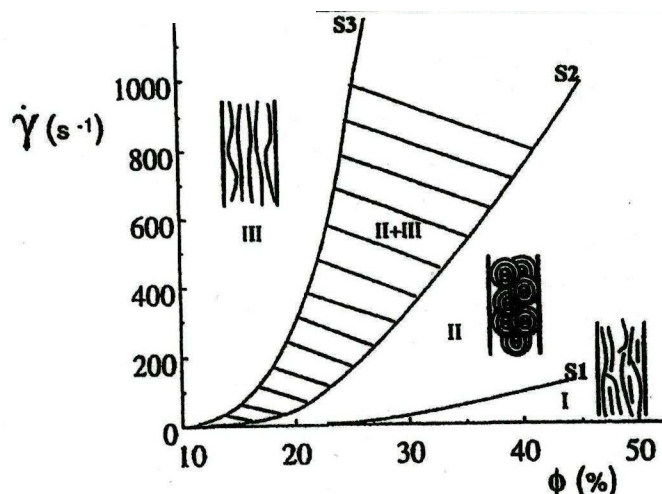


Figure 1.4 : Diagramme de phases hors d'équilibre pour la phase lamellaire du système SDS/pentanol/dodécane/eau³

Ce diagramme présente trois états stationnaires différents et une zone de coexistence. C'est l'état noté II sur le diagramme qui nous intéresse. En effet, Diat *et coll.* ont mis en évidence

que cette phase, formée à taux de cisaillement intermédiaire, était constituée par l'empilement d'objets sphériques multilamellaires jusqu'au centre⁴. Ces objets sont appelés « oignons » ou « sphérulites[®] ». Ils sont de taille définie, variable selon le taux de cisaillement appliqué et selon la formulation. La structure de la phase oignon est stable sur au moins une semaine après l'arrêt du cisaillement⁴. Mise en contact avec un excès d'eau, elle se disperse en une suspension colloïdale d'oignons.

Afin d'obtenir une phase oignon, il est donc nécessaire de pouvoir former une phase lamellaire et de la soumettre à une contrainte de cisaillement.

Nous allons maintenant détailler le mode de préparation utilisé pour réaliser nos échantillons, ainsi que les caractéristiques générales des oignons.

B- Préparation et caractéristiques des oignons utilisés

1. Préparation du mélange de tensioactifs

Le principal constituant des oignons est la phosphatidylcholine (PC), elle est extraite du soja (lécithine S100 de chez Lipoid). Suivant les formulations employées, la PC est mélangée à la monooléine et/ou à l'octadécylamine (ODA). La monooléine permet de modifier légèrement les propriétés de la membrane pour apporter par exemple davantage de courbure ou la rendre plus fluide. L'octadécylamine a été utilisée uniquement dans le cas de la formation de nanoparticules d'or, afin de jouer le rôle de ligand au cours de leur synthèse.

Les tensioactifs sont pesés de façon à obtenir les pourcentages molaires désirés au sein de la formulation et afin d'avoir une masse totale de mélange de 200mg. Ils sont co-solubilisés en ajoutant environ 1mL d'un mélange de solvants chloroforme/méthanol (1/1 en volume). Le solvant est ensuite évaporé sous un léger flux d'azote : on obtient alors une pâte visqueuse. Afin d'éliminer les dernières traces de solvant, on procède à une lyophilisation : environ 3mL d'eau distillée sont ajoutés à la pâte visqueuse, le mélange est homogénéisé par agitation en le chauffant à 38°C, puis congelé pendant 3h à -80°C et enfin lyophilisé pendant une nuit. A la fin de ces opérations, le mélange lipidique de base est prêt.

2. Principe de fabrication des oignons

La description que nous faisons ici est générale. Certaines modifications du protocole sont nécessaires, notamment pour les échantillons oignon/particules d'or.

La phase lamellaire est formée par hydratation du mélange lipidique par une solution aqueuse : eau, sel d'or, mélange des sels ferreux et ferrique, ou ferrofluide, suivant les échantillons à étudier. Le taux d'hydratation de la phase lamellaire ne doit pas être trop éloigné de la limite de gonflement : celle-ci a été déterminée à 49 % en masse pour la formulation PC-monooléine 90%-10% molaire qui sera la plus utilisée au cours de ce travail (*figure 1.5*).

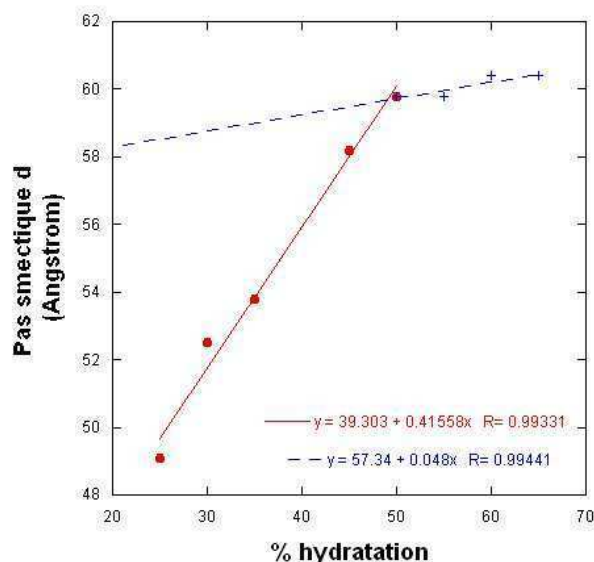


Figure 1.5 : Détermination du taux de gonflement par mesure du pas smectique par diffraction des rayons X aux moyens angles pour la formulation PC-monooléine 90-10 % molaires

Au-delà de 49 %, le système comporte deux phases, l'une étant une phase lamellaire dont le taux d'hydratation correspond à la limite de gonflement, l'autre une phase aqueuse. En deçà de cette limite, une fois les oignons dispersés dans un excès d'eau, la phase lamellaire les constituant cherche à atteindre la limite de gonflement qui est son état d'équilibre. Les oignons ont alors tendance à gonfler sous l'effet de la diffusion d'eau du milieu dispersant

vers l'intérieur, et à se détruire. Nous avons donc choisi un taux d'hydratation de la phase lamellaire de 45% en masse.

Nous ajoutons donc la solution aqueuse à une certaine masse du mélange lipidique dans les proportions 55% de lipides- 45% d'eau en masse. Nous homogénéisons le tout à la spatule puis nous passons le mélange en centrifugeuse pendant 4min, à 5000 tours/min, à 25°C. Ces cycles spatule/centrifugeuse sont répétés plusieurs fois, jusqu'à ce que la pâte obtenue soit macroscopiquement homogène (3 cycles environ). A la fin de ces cycles, nous laissons reposer la pâte pendant 3 jours, afin d'obtenir une phase lamellaire à l'équilibre.

La phase lamellaire ainsi formée est ensuite soumise à un cisaillement en cellule de Couette. Cette cellule de Couette a été conçue au laboratoire afin d'être adaptée pour le cisaillement de faibles quantités de matière. Elle est composée d'un rotor et d'un stator, de géométrie cylindrique. Environ 30mg de la phase lamellaire à cisailler sont insérés dans le stator. L'entrefer est très étroit afin d'éviter la fracture de la phase lamellaire au cours du cisaillement : $h = 15\mu\text{m}$. La vitesse de rotation du rotor ω est réglable entre 100 et 1500 tours/minute. Dans notre cas, elle est réglée sur 250 tours/minute, ce qui correspond à un taux de cisaillement de :

$$\dot{\gamma} = \frac{r\omega}{h} = \frac{3 \times 10^{-3} \times 250 \times 2\pi}{15 \times 10^{-6} \times 60} = 5,2 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$$

La phase lamellaire est soumise à ce cisaillement pendant 1 minute. Une pâte est obtenue, au sein de laquelle les oignons sont au contact les uns des autres, constituant un empilement de vésicules multilamellaires jusqu'au centre de l'objet. Ils peuvent ensuite être dispersés dans un excès d'eau, où ils conservent leur structure multicouche et se « détachent » alors les uns des autres pour former des vésicules isolées en solution dans l'eau.

3. Caractéristiques des oignons formés

Nous présentons ici les caractéristiques d'oignons « blancs » (phase lamellaire hydratée par de l'eau ultra-pure, puis oignons dispersés dans de l'eau ultra-pure) préparés grâce au protocole que nous venons de décrire.

a)- Distribution en taille des oignons

La distribution en taille des oignons a été observée par diffusion statique de la lumière (granulométrie). La figure 1.6 présente la distribution en taille pondérée en volume pour une dispersion d'oignons à 10mg/mL, préparée dans les conditions décrites précédemment.

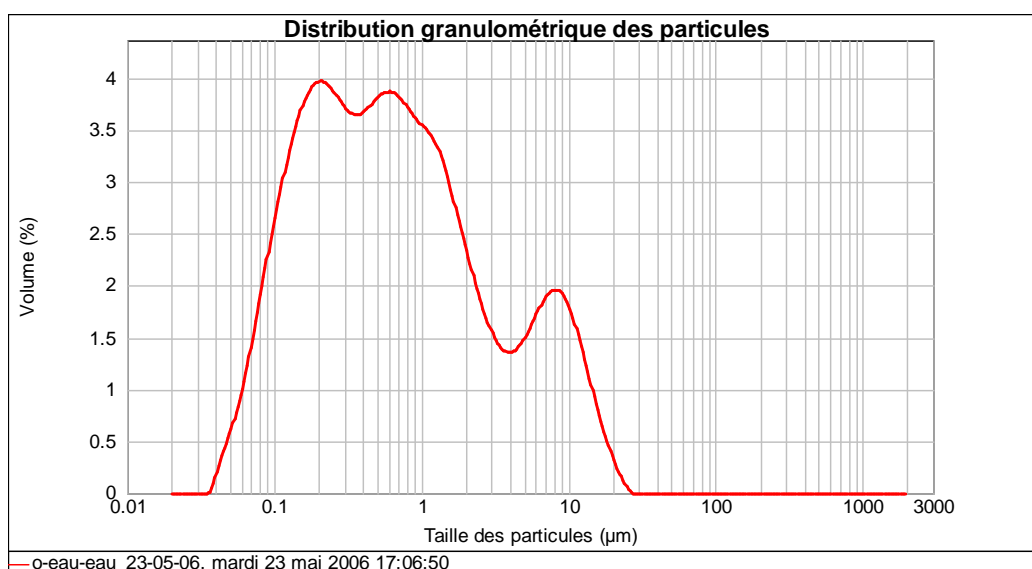


Figure 1.6 : Distribution en taille d'oignons « blancs » (oignon/eau), pondérée en volume, pour la formulation PC-monooléine 90-10 % molaires

Ainsi la distribution en taille des oignons n'est pas monodisperse : une population est centrée sur 0.2µm, une sur 0.6µm, et la dernière sur 8µm. Cette dernière population peut facilement être éliminée par une centrifugation à 1000 tours/min pendant 5min.

Notons que la formulation PC-octadécylamine-monooléine donne lieu à la même distribution en taille des oignons.

b)- Caractéristiques de la phase lamellaire

Nous nous appuyons sur la figure 1.5 afin de déduire les paramètres de distance de la phase lamellaire. Nous aurons besoin de ces valeurs afin de discuter de l'effet des particules sur la structure interne de l'oignon.

En dessous de la limite de gonflement (« ajustement rouge »), la distance de répétition dépend uniquement de la composition du système. L'ordonnée à l'origine de « l'ajustement rouge »

de la figure 1.5 correspond donc à δ , épaisseur de la bicouche : $\delta = 39 \text{ \AA}$. Le pas smectique étant de 60 \AA environ, l'épaisseur de couche aqueuse e est de 20 \AA .

II- Techniques expérimentales

A- Microscopie électronique en transmission (MET) et cryoMET

1. Microscopie électronique en transmission (MET)

Cette technique de microscopie est adaptée pour l'observation des nanoparticules métalliques : celles-ci étant très denses en électrons, elles présentent un contraste important en microscopie électronique. Les observations ont été réalisées au CREMEM (Centre de Ressources en Microscopie Electronique, Bordeaux). Le microscope utilisé est un JEOL-2000 FX, produisant un faisceau d'électrons grâce à un filament de LaB_6 , à 200kV.

Les nanoparticules d'or présentant un contraste très important, il n'est pas nécessaire de détruire les oignons pour les visualiser. Une goutte de $3\mu\text{L}$ de la dispersion d'oignons (4mg/mL) est déposée sur une grille en cuivre recouverte d'un film de polycarbonate (200 mesh). Dans le cas des nanoparticules d'oxyde de fer, il est par contre nécessaire de détruire les oignons. Les dispersions d'oignons à 20mg/mL sont diluées par ajout d'un détergent, le Triton X-100, à 10 % volumique, afin d'obtenir une dispersion finale à 4mg/mL contenant des micelles mixtes tensioactifs/lipides.

Dans tous les cas, le vide (pression de l'ordre de 10^{-6} bar) existant dans la colonne du microscope électronique entraîne une destruction des oignons, qui ne sont donc pas observables par cette technique.

2. Cryo-microscopie électronique en transmission (cryoMET)

Cette technique présente l'avantage de garder la structure de l'oignon intacte puisque la dispersion d'oignons est « trempée ». Elle permet donc de visualiser l'effet des nanoparticules inorganiques sur l'arrangement lamellaire de l'oignon.

La préparation de l'échantillon est très délicate. Après avoir déposé sur une grille à trous une goutte de dispersion d'oignons à 1mg/mL, le ménisque de la goutte est séché : des films de dispersion sont ainsi suspendus entre les trous. Grâce à un robot de vitrification, la grille est rapidement plongée dans un bain d'éthane liquide. Cette étape doit être rapide afin d'éviter la formation de cristaux d'eau qui gênerait l'observation.

L'échantillon est ensuite observé à -170°C (azote liquide) sous un microscope électronique FEI Tecnai F20 opérant à 200kV.

La cryo-microscopie électronique en transmission a été réalisée en collaboration avec Olivier Lambert (IECB, Bordeaux).

B- Diffusion dynamique de la lumière

La technique de diffusion dynamique⁵ de la lumière permet de mesurer le diamètre hydrodynamique des particules en suspension dans un solvant de viscosité connue. La gamme de rayons mesurables pour des particules sphériques dans l'eau s'étend de quelques nanomètres à plusieurs dizaines de microns. Nous avons employé cette technique afin de mesurer le diamètre des particules de maghémite constituant le ferrofluide, dans des milieux dispersants de différentes forces ioniques. Ceci nous a permis d'évaluer l'agrégation des particules (chapitre 3).

La diffusion dynamique de la lumière mesure une fluctuation d'intensité diffusée en fonction du temps. Les variations d'intensité diffusée correspondent à des fluctuations de fréquence liées à celles de la concentration et de la densité qui sont de type gaussienne. Ainsi peut être introduite une fonction d'auto-corrélation $g_1(t)$, image de cette diffusion Brownienne de l'intensité diffusée (I) par les objets en solution :

$$\langle I(q,0)I(q,t) \rangle = I^2(q,t) + a.g_1^2(q,t)$$

Pour n populations monodisperses d'objets sphériques, il existe le modèle suivant :

$$g_1(q,t) = b_1.\exp(-t/\tau_1) + b_2.\exp(-t/\tau_2) + \dots + b_n.\exp(-t/\tau_n)$$

avec
$$\sum_{i=0}^n b_i = 1$$

et τ_i , les temps de relaxation :

$$\tau_i = \frac{1}{D_i q^2}$$

D_i les coefficients de diffusion translationnels des objets et q le vecteur de diffusion défini par l'expression suivante:

$$q = \frac{4\pi \times n}{\lambda} \times \sin \frac{\theta}{2}$$

avec n l'indice de réfraction du milieu, λ la longueur d'onde du rayonnement incident et θ l'angle de diffusion.

Le rayon hydrodynamique d'objets sphériques en solution est relié au coefficient de diffusion translationnel par la relation de Stokes-Einstein :

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

avec k , la constante de Boltzmann ($1,3806503 \cdot 10^{-23} \text{ m}^2 \text{ kg s}^{-2} \text{ K}^{-1}$), T la température et η la viscosité du milieu ($\eta_{\text{eau}} = 10^{-3} \text{ PI}$ à 20°C).

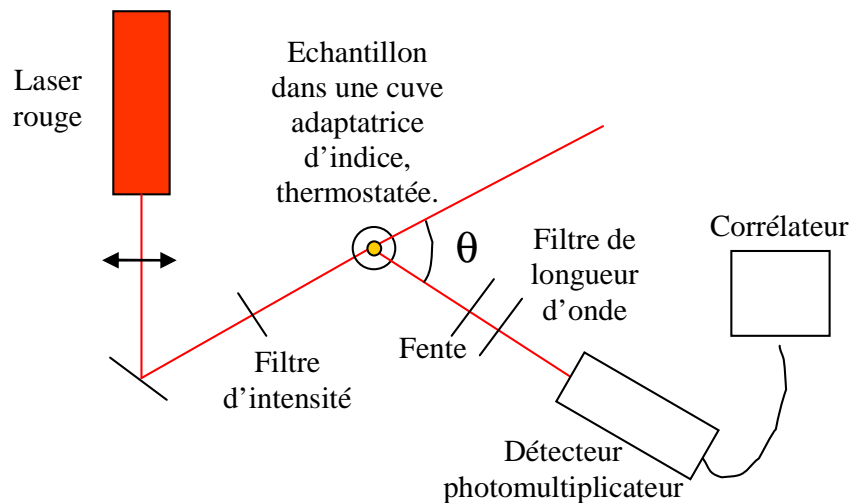


Figure 1.7 : Schéma du montage de diffusion de lumière

Les expériences sont réalisées sur un montage (*figure 1.7*), développé au laboratoire, qui utilise un Laser Coherent Innova 90 (Kr-Ion) opérant à $\lambda = 647,1$ nm. Les échantillons sont immergés dans une cuve remplie de décaline isoréfractive avec le verre, thermostatée à l'aide d'un bain Haake. L'angle de diffusion entre le faisceau incident et l'axe du détecteur peut varier entre 20° et 140° . Le détecteur est un photomultiplicateur Philips monté sur un goniomètre, et le corrélateur, qui calcule la fonction d'auto-corrélation temporelle à partir du nombre de photons diffusés arrivant sur le détecteur, est digital de marque Brookhaven BI-9000 A.

C- Diffraction des rayons X

Cette méthode d'analyse nous a permis d'étudier qualitativement l'effet des particules sur la structure lamellaire : son éventuelle déstabilisation ou, dans le cas contraire, de mesurer le pas smectique d de la phase lamellaire, c'est-à-dire la distance de répétition entre deux bicouches au sein des oignons. Elle a été utilisée sur les pâtes avant dispersion, ayant subi l'hydratation et le cisaillement.

Le vecteur d'onde est relié à λ , longueur d'onde du faisceau incident, et θ , angle que fait le faisceau avec la normale aux plans par⁶ :

$$q = \frac{4n\pi \sin \theta}{\lambda}$$

où n est l'indice du milieu. Dans le cas d'une phase lamellaire, les pics de diffraction (pics de Bragg) sont équidistants et la distance de répétition du motif lamellaire est donnée par :

$$d = 2n \pi / q_n$$

où n est l'ordre de diffraction.

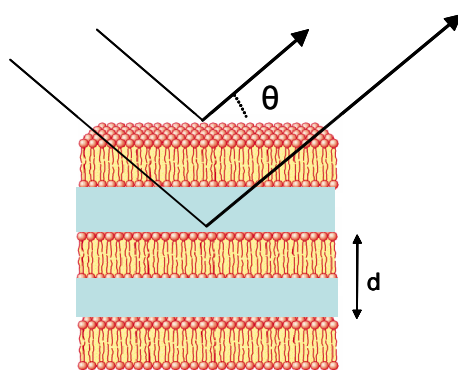


Figure 1.8 : Représentation de la diffraction des rayons X sur une phase lamellaire

Le montage utilisé est celui d'un Nanostar (Bruker). Les rayons X sont délivrés par un tube RX céramique délivrant un faisceau à la longueur d'onde de cuivre (1.54 \AA) de diamètre $400 \text{ }\mu\text{m}$. Le faisceau est ajusté par un monochromateur composé de miroirs de Gobel croisés et par trois collimateurs circulaires ($750\text{-}400\text{-}1000 \text{ }\mu\text{m}$). Et la détection est réalisée par un détecteur bidimensionnel HI STAR muni d'un compteur proportionnel à fil. De façon générale les mesures sont réalisées avec une puissance du générateur de 40 kV et 20 mA .

D- Mesures magnétiques

Les mesures magnétiques réalisées sur notre système ont été faites en collaboration avec Rodolphe Clérac (CRPP, Bordeaux).

1. Propriétés magnétiques de la matière

Deux phénomènes sont à l'origine du magnétisme⁷ : la rotation du noyau atomique sur lui-même (magnétisme nucléaire) et la rotation des électrons autour du noyau (magnétisme électronique). Lorsqu'un matériau est qualifié de « magnétique », c'est souvent au magnétisme électronique que l'on se réfère.

La susceptibilité magnétique est la grandeur caractéristique du comportement magnétique des composés étudiés. L'aimantation acquise par le composé placé dans un champ magnétique homogène H est reliée à ce champ de la manière suivante :

$$\vec{M} = \chi \vec{H}$$

La susceptibilité magnétique (donc l'aimantation) dépend de la température.

En l'absence d'un champ magnétique appliqué, le moment magnétique dipolaire permanent généré par le déplacement du nuage électronique autour du noyau atomique peut être :

-nul si les électrons de la couche externe des atomes constituant le composé considéré sont appariés : le composé est diamagnétique

-non nul si la couche externe possède un ou plusieurs électrons célibataires : le composé est dit paramagnétique.

Le **diamagnétisme** est un comportement commun à toutes les substances. Il est lié à la déformation des orbitales électroniques lorsqu'un champ magnétique est appliqué, et il est indépendant de la température. Il est caractérisé par une susceptibilité magnétique négative, c'est-à-dire que le composé est repoussé sous l'effet de l'application du champ magnétique. La susceptibilité diamagnétique a toujours à peu près le même ordre de grandeur : $\chi^{\text{dia}} = -5.10^{-7} \text{ cm}^3/\text{g}$.

Le **paramagnétisme** caractérise tous les composés possédant un moment magnétique dipolaire permanent. En l'absence d'un champ magnétique, les moments dipolaires élémentaires prennent toutes les directions possibles : l'aimantation macroscopique résultante est nulle. Sous l'effet d'un champ magnétique appliqué, les moments magnétiques s'orientent dans la direction du champ : l'aimantation macroscopique résultante est directement proportionnelle au champ appliqué. La susceptibilité magnétique associée est positive et, selon la loi de Curie, elle est inversement proportionnelle à la température :

$$\chi^{\text{para}} = \frac{C}{T}$$

avec C constante de Curie intrinsèque au matériau considéré.

La répartition des centres paramagnétiques au sein du matériau conduit à **des propriétés magnétiques coopératives** dues à des interactions d'échanges. Ces interactions tendent à aligner parallèlement entre eux les spins électroniques (moments magnétiques de spins)

voisins et confèrent donc au matériau des propriétés de **ferro-, antiferro- ou ferrimagnétisme**.

Dans un composé ferromagnétique, les spins sont alignés dans le même sens en dessous d'une certaine température appelée température de Curie. Dans ce domaine de température, le composé développe une aimantation macroscopique spontanée. Au-delà de cette température, l'agitation thermique détruit l'ordre magnétique et le composé devient alors paramagnétique. La susceptibilité magnétique des composés ferromagnétiques, décrite par la loi de Curie-Weiss, est très élevée.

Dans le cas de l'antiferromagnétisme, les interactions favorisent une orientation antiparallèle de deux spins voisins. L'aimantation spontanée résultante est donc nulle. Au dessus d'une température critique appelée température de Néel, le composé suit la loi de Curie-Weiss et il présente un comportement paramagnétique.

Le ferrimagnétisme est un comportement intermédiaire dans lequel les spins sont antiparallèles, mais ne se compensent pas. Les composés ferrimagnétiques présentent donc une aimantation macroscopique spontanée. Au-dessus de la température de Curie, le comportement suit la loi de Curie-Weiss. Le ferrimagnétisme caractérise des matériaux possédant un ordre cristallin comportant plusieurs sous-réseaux, comme les ferrites de structure spinelle dont font partie la maghémite et la magnétite.

Le comportement magnétique d'un composé dépend de sa structure cristalline. Au sein d'un matériau ferro- ou ferrimagnétique, les spins électroniques forment des domaines magnétiques au sein desquels ils sont tous alignés dans le même sens. Ces domaines sont délimités par des frontières appelées parois de Bloch. Chaque « monodomaine » porte un moment magnétique permanent, résultant de l'alignement des spins et orienté selon la direction de facile aimantation. Ce sont les interactions coopératives entre les moments magnétiques des monodomaines qui déterminent le comportement magnétique du matériau.

L'aimantation s'oriente à l'équilibre selon des directions cristallographiques privilégiées, énergétiquement plus favorables, dites directions de facile aimantation. Pour passer d'un axe de facile aimantation à un autre, une énergie de barrière, l'énergie d'anisotropie magnétocristalline E_a doit être fournie. Pour un monodomaine de volume V , $E_a = KV$, où K est la constante d'anisotropie magnétocristalline. Sous l'effet d'un champ magnétique, le volume des monodomaines augmente par déplacement des parois de Bloch et les aimantations quittent l'axe de facile aimantation pour basculer vers l'orientation du champ.

-**Dans le cas où $KV \gg kT$** , le moment magnétique est bloqué dans la direction de facile aimantation. Sous l'effet de l'augmentation du champ magnétique, les interactions d'échange augmentent, ce qui provoque l'alignement des moments magnétiques dans la direction du champ. L'aimantation augmente jusqu'à saturation. A l'arrêt du champ, le matériau conserve une aimantation rémanente : la courbe présentant la mesure de l'aimantation résultante en fonction du champ magnétique appliqué comporte un cycle d'hystérèse. Le matériau ferro- ou ferrimagnétique a été magnétisé.

-**Dans le cas où $KV \ll kT$** , c'est-à-dire dans le cas de particules suffisamment petites pour constituer des monodomains magnétiques (de diamètre inférieur à 20nm pour des oxydes de fer), l'énergie d'agitation thermique suffit pour faire basculer de façon aléatoire les aimantations d'un axe de facile aimantation à un autre. Sous l'effet de l'augmentation du champ magnétique appliqué, les aimantations s'alignent rapidement dans le sens du champ pour atteindre une valeur de saturation. A l'arrêt du champ magnétique, les moments magnétiques retrouvent leurs orientations aléatoires. Les courbes d'aimantation ne comportent pas de cycle d'hystérèse. Les particules présentent dans ce cas un comportement particulier, appelé **superparamagnétisme de Néel**. Ce phénomène est caractérisé par un temps de relaxation de l'aimantation appelé temps caractéristique de Néel : $\tau_N = 10^{-9} \exp(E_a / kT)$.

Précisons qu'une anisotropie de surface et de forme des particules peuvent également entrer en compte dans la constante d'anisotropie et l'énergie magnétocristalline devient alors : $E_a = K_{\text{eff}} V$.

De plus, les suspensions de particules ferromagnétique ($E_a \gg kT$) peuvent présenter un comportement superparamagnétique par alignement des moments magnétiques dans la direction du champ par rotation de la particule. C'est le **superparamagnétisme de Brown**, caractérisé par un temps de relaxation τ_B , appelé temps caractéristique de Brown : τ_B dépend de la viscosité du milieu et du volume hydrodynamique des particules.

2. Principe d'un magnétomètre à détection SQUID

Le magnétomètre va ici nous permettre d'établir la courbe d'aimantation d'un composé en faisant varier le champ magnétique appliqué. La détermination de cette courbe d'aimantation fournit des informations sur le comportement magnétique du composé considéré.

Au sein d'un magnétomètre à détection SQUID⁸ (Superconducting Quantum Interference Device), un aimant supraconducteur, formé par un solénoïde composé d'un alliage de

niobium et de germanium, permet de générer des champs magnétiques très élevés (jusqu'à 7 Teslas). L'alliage présentant un comportement supraconducteur (résistance électrique du matériau nulle) en dessous d'une température critique de 23 K, celui-ci est donc placé au sein d'une enceinte cryogénique remplie d'hélium liquide. Lorsqu'un échantillon est introduit dans le magnétomètre, le champ généré va être perturbé par le comportement magnétique de cet échantillon : c'est en fait la variation du champ magnétique autour de l'échantillon que va mesurer la bobine de détection SQUID. Nous n'allons pas détailler ici le principe de la détection SQUID. Disons brièvement que ce dispositif repose sur deux jonctions de Josephson : lorsque deux supraconducteurs sont séparés par une fine couche de matériau isolant (comme l'alumine par exemple) constituant une jonction, un supracourant peut traverser cette jonction, et l'intensité de ce courant peut être amplifiée par la présence d'un champ magnétique. Le dispositif de détection SQUID est ainsi capable de mesurer des variations de champ magnétique approchant 10^{-15} T.

Le magnétomètre à détection SQUID fait donc partie des dispositifs les plus sensibles permettant de mesurer l'aimantation d'un composé.

E- Résonance paramagnétique électronique

La résonance paramagnétique électronique (RPE) permet d'étudier les espèces contenant au moins un électron célibataire, comme les radicaux libres organiques et inorganiques ou les complexes inorganiques comportant un ion métallique de transition. Cette technique spectroscopique constitue un outil important pour l'étude de la structure locale de certains complexes biologiques impliquant des centres paramagnétiques, comme les interactions substrat-enzyme ou l'état d'oxydoréduction d'accepteur d'électrons. Elle peut également fournir des informations sur les cinétiques de réaction impliquant les centres paramagnétiques. Dans le domaine de la physico-chimie, la RPE est utilisée pour décrire la structure locale de certains matériaux. Elle peut notamment permettre de relever la présence de défauts générés par l'exposition à un rayonnement (UV, α, β, γ ,) aussi bien pour des matériaux désordonnés comme les verres, que pour des structures cristallines comme les minéraux, ou des matériaux organiques.

Dans notre cas, nous avons employé cette technique afin de déterminer le taux d'encapsulation des nanoparticules magnétiques incorporées au sein des oignons par encapsulation d'un ferrofluide. En effet, l'intensité du signal étant directement proportionnelle à la quantité d'espèces paramagnétiques présente dans l'échantillon, des mesures quantitatives sont envisageables. L'avantage de la RPE par rapport à d'autres techniques spectroscopiques comme l'UV-visible par exemple, est sa grande sensibilité.

1. Le phénomène de résonance

Le concept physique à la base de la RPE^{9,10} repose sur l'interaction entre un champ magnétique appliqué et le moment magnétique d'un électron célibataire.

Chaque électron possède un nombre quantique de spin $S=1/2$. Le moment magnétique de spin qui lui est associé s'écrit :

$$\vec{\mu} = -g\beta\vec{S}$$

avec g le facteur de Landé (dans le cas d'un électron célibataire, $g = g_e = 2,0023$) et β le magnéton de Bohr électronique.

En présence d'un champ magnétique externe, le moment magnétique s'aligne de façon parallèle ou antiparallèle avec le champ magnétique appliqué, chaque alignement correspondant à une énergie spécifique. Cette levée de dégénérescence des niveaux d'énergie en présence d'un champ magnétique (effet Zeeman) conduit donc à la création de deux niveaux d'énergie pour un système de spin $S = 1/2$:

$$E_+ = 1/2 g \beta B$$

$$E_- = -1/2 g \beta B$$

avec B l'amplitude du champ magnétique statique appliqué.

Il est alors possible d'induire des transitions entre ces deux niveaux en superposant au champ statique B une onde électromagnétique de fréquence ν appropriée. La condition de résonance s'écrit :

$$h \nu = \Delta E = E_+ - E_- = g \beta B_0$$

La résonance est donc atteinte en faisant varier l'amplitude du champ magnétique appliqué pour une fréquence micro-onde fixée. En RPE, il est d'usage de garder la fréquence de l'onde constante et de faire varier le champ magnétique appliqué. De nombreuses combinaisons fréquence/champ magnétique sont possibles. La fréquence la plus couramment utilisée se situe entre 9 et 10 GHz (bande X), ce qui correspond à des champs magnétiques de l'ordre de

3500 G (0,35 T). Les spectres RPE sont généralement présentés sous la forme de la première dérivée du pic d'absorbance (*figure 1.9*).

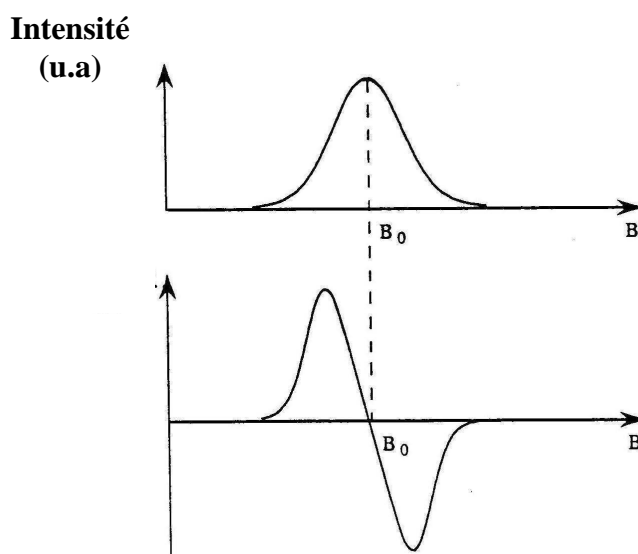


Figure 1.9 : Signal d'absorption et sa dérivée

Le signal de résonance observé dépend de la puissance électromagnétique absorbée par l'échantillon. L'intensité du signal I augmente avec la puissance de la micro-onde P (I varie comme $P^{1/2}$) jusqu'au point de saturation du système. La saturation est atteinte lorsque la vitesse d'absorption des micro-ondes dépasse la vitesse de relaxation du système. Pour réaliser des mesures quantitatives, il est nécessaire de travailler à une puissance où l'intensité du signal est maximale, sans être à la puissance de saturation.

La température est un paramètre important dans les mesures RPE car les populations des niveaux d'énergie obéissent à la statistique de Boltzmann. A l'équilibre thermique, le rapport entre les populations N_+ et N_- des deux niveaux d'énergie E_+ et E_- vaut :

$$\frac{N_+}{N_-} = \exp\left(-\frac{g\beta B}{kT}\right) = \exp\left(-\frac{h\nu}{kT}\right)$$

avec g facteur de Landé, β magnéton de Bohr électronique, B le champ magnétique appliqué, T la température et ν la fréquence de l'onde électromagnétique.

L'intensité du signal de résonance est directement proportionnelle à la différence de population entre les deux niveaux d'énergie, et cette différence de population est inversement

proportionnelle à la température. Ainsi plus la température de mesure est faible, plus la différence de population est importante. Dans certains cas où le signal RPE est large comme pour les métalloprotéines par exemple, travailler à des températures cryogéniques permet d'obtenir un gain en sensibilité important.

La RPE est spécifique des centres paramagnétiques puisque les espèces diamagnétiques n'interfèrent pas dans le spectre obtenu. Elle est donc adaptée pour détecter des concentrations en espèces paramagnétiques faibles. Le nombre minimal de spins nécessaires pour obtenir un signal RPE dépend de nombreux facteurs comme la sensibilité du spectromètre, le type de résonateur micro-ondes (cavité), la largeur de la raie, les conditions de mesures et le volume d'échantillon utilisé. Les modulations en fréquence et en amplitude du champ magnétique sont deux facteurs permettant d'améliorer le rapport signal/bruit.

2. Principe d'un spectromètre RPE

Nous allons décrire de façon brève les différents éléments constituant un spectromètre RPE. La figure 1.10 présente une vue générale et un schéma de principe d'un spectromètre.

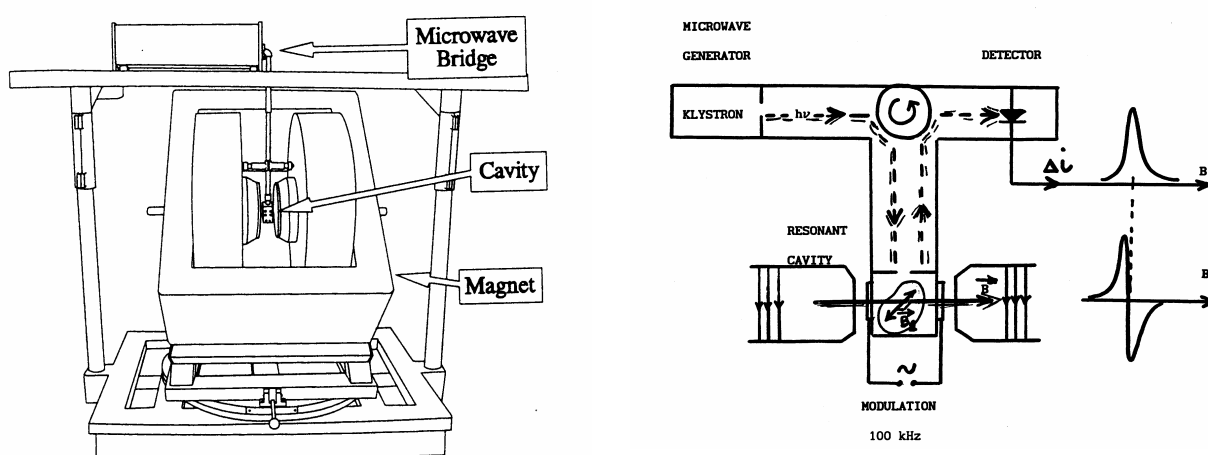


Figure 1.10 : Vue générale et schéma de principe d'un spectromètre RPE

L'échantillon est placé dans une cavité de résonance, au sein de laquelle il est soumis à la fréquence d'excitation des micro-ondes. La cavité est en mode perpendiculaire (par rapport à B_0). La source des micro-ondes est un klystron ou une diode gun. La cavité de résonance est située au sein d'un champ magnétique statique et homogène dans l'échantillon, généré par deux bobines. La température au sein de la cavité peut également être contrôlée (cryostat hélium liquide).

Pour réaliser un spectre RPE, on fixe donc la fréquence et la puissance de l'onde électromagnétique et on effectue un balayage en champ magnétique. La figure 1.11 présente un spectre typique obtenu dans notre cas, c'est-à-dire pour des nanoparticules de maghémite.

Les expériences de RPE ont été réalisées en collaboration avec François Dole (ESTBB-CRPP, Bordeaux).

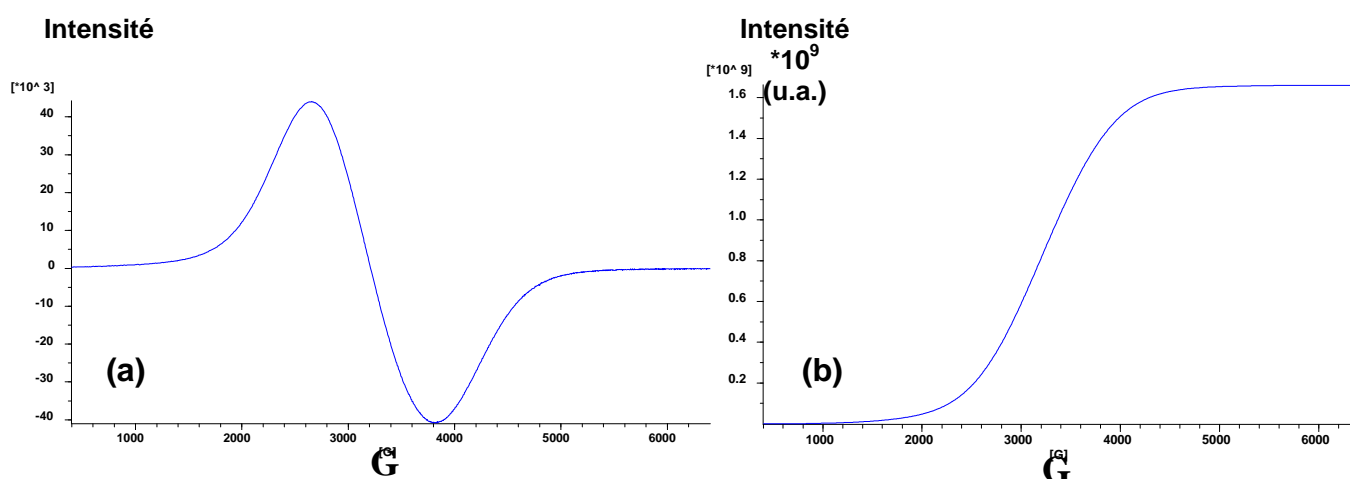


Figure 1.11 : Spectres typiques obtenus en RPE, à 125K, pour des nanoparticules de maghémite $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$, correspondant (a) à la dérivée du signal, (b) à sa double intégrale permettant de déterminer le nombre de spins présents dans la cavité

Références

- ¹ Small D.M., *Handbook of lipid research 4 : the physical chemistry of lipids*, **1986**, Plenum Press
- ² Chenevier P., *Vésicules multilamellaires de type onion comme vecteurs biologiques ciblés*, **2001**, thèse à l'Université Bordeaux 1
- ³ Diat O., *Effet du cisaillement sur des phases lyotropes : phase lamellaire et phase éponge*, **1992**, thèse à l'Université Bordeaux 1
- ⁴ Diat O., Roux D., Nallet F., *J.Phys.II France* **3**, **1993**, 1427
- ⁵ Berne, Pecora, *Dynamic light scattering : With applications to chemistry, biology and Physics* **2000**, Dover Publications
- ⁶ Als-Nielsen, McMorrow, *Elements of Modern X-Ray Physics* **2001**, John Wiley & Sons, Ltd
- ⁷ Kittel C., *Introduction to solid state physics*, **1996**, John Wiley & Sons, Ltd
- ⁸ a) McElfresh M., *Quantum Design's magnetic property measurement system*, manuel d'explication de la société Quantum Design[®], **1994** ; b) site internet de wikipedia « magnetometer » : <http://en.wikipedia.org/wiki/Magnetometer>
- ⁹ Wertz J.E., Bolton J.R., *Electron spin resonance : elementary theory and practical applications*, **1972**, McGraw-Hill, inc.
- ¹⁰ Brudvig G.W., *Methods in Enzymology*, **1995**, 246, 536

Chapitre 2

Synthèse intravésiculaire
de nanoparticules d'or

L'élaboration d'un hybride oignon/nanoparticules d'or s'inscrit dans le cadre plus général de l'utilisation de l'oignon comme vecteur de principe actif dans les cellules, thème à l'étude au laboratoire. D'autre part, dans le cadre du réseau FAME (Functionalized Advanced Materials and Engineering), une collaboration concernant l'utilisation de ces hybrides dans le domaine de la catalyse a débuté ; les premiers résultats seront abordés dans le chapitre 4.

L'aspect « synthèse » de ce travail nécessite tout d'abord d'introduire les phénomènes de nucléation-croissance des particules. Puis nous ferons un état de l'art des différents milieux colloïdaux organiques utilisés pour la synthèse de nanoparticules au sein d'un milieu confiné. Nous verrons ensuite les propriétés et les applications possibles des nanoparticules d'or dans les domaines du biomédical et de la catalyse (partie 1). La partie 2 détaillera les résultats concernant la synthèse intravésiculaire de nanoparticules d'or.

PARTIE 1 : INTRODUCTION

I- Synthèse de nanoparticules inorganiques en milieu confiné organique

A- Le phénomène de nucléation-croissance

Les phénomènes menant à la formation de particules solides sont identiques quelque soit la réaction chimique mise en jeu pour leur synthèse¹ : nucléation, croissance, et vieillissement. Le déroulement de ces trois étapes a une influence cruciale sur la taille et la forme des particules synthétisées.

La génération de précurseurs de charge nulle (ou *monomères*) constitue une première étape vers la nucléation. Lorsque la concentration en précurseurs atteint un seuil critique que l'on nomme la sursaturation, la nucléation a lieu¹. C'est un phénomène cinétique brutal. Après la nucléation, la concentration en précurseurs diminue et ne suffit plus à provoquer d'autres nucléations, mais elle va alimenter la croissance des nuclei (ou *germes*) existants. Notons que si la vitesse de génération des précurseurs est beaucoup plus rapide que la vitesse de nucléation, alors la concentration en précurseurs dans la solution dépasse toujours la sursaturation : nucléation et croissance ont lieu simultanément².

1. Nucléation

Lorsqu'elle n'est pas facilitée autour de certains sites comme des impuretés, la nucléation est dite homogène. Nous ne traiterons pas ici de la nucléation hétérogène, qui est catalysée par la présence de clusters ou d'impuretés dans la solution³.

De manière qualitative, la nucléation homogène peut être décrite en quatre étapes⁴ :

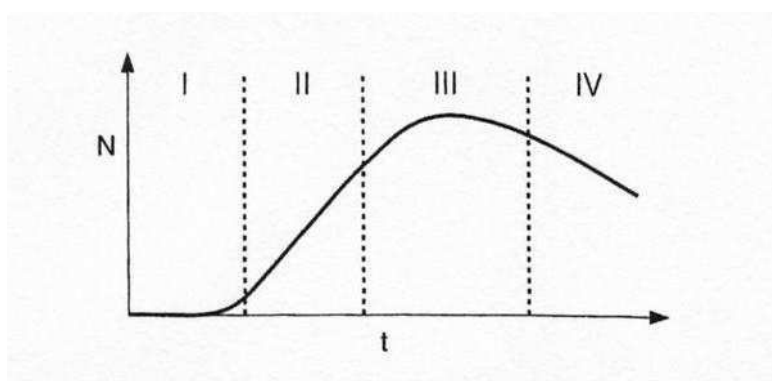


Figure 2.1 : Les différentes étapes de la nucléation⁴
(nombre de nuclei formés en fonction du temps)

-Phase I : C'est la phase d'incubation. Des clusters se forment car la faible solubilité du soluté fait que la phase solide est plus stable du point de vue thermodynamique. Mais ce passage à une phase solide a un coût énergétique car il nécessite la création d'une interface solide-liquide. Dans le cas de petits nuclei ayant un rapport surface/volume important, l'énergie à fournir par le système est trop élevée : ces clusters se re-dissolvent.

-Phase II : C'est la phase de nucléation à l'état quasi-stationnaire. La distribution en taille des clusters a évolué vers les plus grosses tailles : les clusters sont donc plus stables (rapport surface/volume moins important), ils ne se re-dissolvent pas. Des nuclei sont donc produits à une vitesse constante.

-Phase III : La vitesse de nucléation diminue jusqu'à ce que le nombre de particules stables dans le système soit constant. Ceci est dû à une diminution de la sursaturation en soluté.

-Phase IV : La nucléation de nouvelles particules devient négligeable. Certaines particules croissent aux dépens des plus petites : c'est le phénomène de mûrissement d'Ostwald (qui cause une baisse du nombre de particules dans le système).

Cette description qualitative se base sur la **théorie classique de la nucléation**⁴. Elle permet d'expliquer les propriétés du nucleus critique et la vitesse de nucléation à partir de considérations thermodynamiques que nous ne détaillerons pas ici.

La formation des nuclei au sein d'une solution homogène nécessite le passage par un maximum de l'enthalpie libre de réaction, appelé « barrière de nucléation »^{2, 4}. Ce maximum

représente la barrière énergétique correspondant à la formation d'un nucleus suffisamment gros pour être stable. Le rayon du nucleus critique est donné par l'équation de Gibbs-Kelvin :

$$r^* = \left(\frac{3n^* \nu}{4\pi} \right)^{1/3} = \frac{2\gamma \times \nu}{kT \ln S}$$

avec n^* le nombre de précurseurs contenus dans le nucleus critique, ν le volume moléculaire d'un précurseur et γ la tension interfaciale du système. S est le taux de sursaturation : $S = c_L/c_S$, c_L étant la concentration en précurseurs en solution et c_S étant la solubilité de la phase solide. Pour les nuclei de rayon inférieur au rayon critique, la croissance n'est pas favorisée thermodynamiquement : ils vont avoir tendance à se dissoudre. Par contre, lorsqu'un nucleus atteint le rayon critique, sa croissance est favorisée thermodynamiquement.

La vitesse de nucléation correspond au nombre de nuclei formés par unité de temps et par unité de volume. Elle dépend de la tension interfaciale solide-liquide et du taux de sursaturation^{2, 4, 5}.

2. Croissance

La vitesse de croissance peut être limitée par deux phénomènes qui vont déterminer la largeur de la distribution en taille des particules : la diffusion des monomères vers la surface, ou l'incorporation des monomères dans la particule via une réaction de surface^{2,3}.

Nous n'exposerons pas ici le détail des équations permettant d'exprimer la vitesse de croissance, mais elles montrent que celle-ci dépend fortement du taux de sursaturation S , dans les deux cas⁵. Pour une distribution en taille de nuclei donnée :

-si S est faible, alors la vitesse de croissance est la même pour toutes les particules sauf pour celles de rayon tout juste supérieur au rayon critique. Ces dernières vont croître plus lentement que le reste de la population et la distribution en taille s'élargit.

-si S est élevé, alors la vitesse de croissance est très importante pour les particules de rayon juste supérieur au rayon critique, alors que les particules plus grosses croissent plus lentement. La distribution en taille se rétrécit⁶.

Le taux de sursaturation, à travers la vitesse de croissance, permet donc de contrôler la distribution en taille des particules, avec un phénomène de rétrécissement de la distribution en taille lorsque S est très élevé.

La vitesse de croissance fait partie des nombreux facteurs gouvernant la **forme** des particules synthétisées. En effet, les particules présentant un faible rapport d'aspect, c'est-à-dire les particules sphériques par exemple, sont le résultat d'une croissance lente, sous contrôle thermodynamique. Par contre, les cristaux anisotropes, qui sont métastables du fait de leur grande énergie de surface, ont été formés sous contrôle cinétique et via une croissance rapide dans un milieu riche en monomères⁷.

3. Vieillissement : le mûrissement d'Ostwald

La formation de particules engendre la création de multiples interfaces qui « coûte de l'énergie » au système. Celui-ci va chercher à minimiser cette énergie interfaciale totale et pour cela il va tendre vers le rassemblement de toute la matière en une seule particule. Le mûrissement d'Ostwald est l'un des phénomènes, avec l'agréation ou la coalescence de particules, qui va permettre au système de tendre vers l'équilibre thermodynamique.

Le rapport surface/volume des particules est l'un des facteurs à l'origine du mûrissement d'Ostwald : il est bien plus élevé pour les petites que pour les grosses particules. Un flux de soluté, partant des petites particules et allant vers les grosses, va donc apparaître afin de réduire l'énergie interfaciale totale. Le transfert de matière se fait via la solution par des équilibres de « dissolution-cristallisation » et la vitesse à laquelle il se produit dépend en grande partie de la solubilité des monomères². Le mûrissement peut être limité soit par la diffusion des monomères, soit par réaction de surface. Une description mathématique complète du phénomène, que nous ne détaillerons pas ici, a été développée de façon indépendante par Lifshitz et Slyozov⁸ d'un côté, et Wagner de l'autre⁹ (théorie LSW).

4. Conclusion

L'apparition de la phase de nucléation dépend du rayon des nuclei formés : si ceux-ci n'ont pas atteint une taille critique, alors leur croissance n'est pas favorable au système du point de vue thermodynamique et ils se re-dissolvent. Le taux de sursaturation et la tension interfaciale solide-liquide sont finalement les deux paramètres gouvernant la taille du nucleus critique et la vitesse de nucléation. Si la vitesse de génération des monomères est supérieure à la vitesse de nucléation, alors la solution est constamment saturée en monomères : plusieurs phases de nucléation ont donc lieu, en même temps que les phases de croissance des premiers nuclei. Une population polydisperse en taille en découle. La vitesse de croissance des particules

dépend elle aussi du taux de sursaturation et peut également avoir une influence sur la distribution en taille et sur la forme des particules synthétisées. Enfin, le mûrissement d'Ostwald mène au déplacement de la taille moyenne des particules vers les grosses populations.

L'introduction dans le milieu réactionnel d'agents stabilisants, comme des tensioactifs, permet de modifier la tension interfaciale solide-liquide et de jouer ainsi sur des paramètres tels que le rayon du nucleus critique, les vitesses de nucléation et de croissance. Leur présence peut ainsi permettre de maîtriser, dans une certaine mesure, le déroulement des phases de nucléation et de croissance des particules. L'utilisation d'auto-assemblages de molécules amphiphiles (milieux colloïdaux) comme microréacteurs chimiques constitue ainsi une voie de synthèse permettant d'envisager un contrôle de la vitesse de génération des précurseurs (taux de sursaturation), des vitesses de nucléation et de croissance. L'influence de tels milieux confinés sur la taille et la forme des nanoparticules obtenues a été largement étudiée, comme nous allons le voir dans la partie suivante.

B- Contrôle de la morphologie des particules via les milieux colloïdaux

Afin d'avoir une vision d'ensemble concernant les méthodes de synthèse des nanoparticules inorganiques, le lecteur peut se reporter aux revues de Cushing et O'Connor¹⁰, Burda et El-Sayed¹¹, et, plus particulièrement sur les nanoparticules d'or, Daniel et Astruc¹². Les enjeux de contrôle de taille et de forme sont décrits dans la revue de Pileni¹³.

1. Ligands, tensioactifs et polymères

Le terme de « **ligands** » est utilisé pour des molécules organiques amphiphiles (tensioactifs) contenant un groupement électro-donneur : acide carboxylique, thiol, amine ou phosphine. Ces groupements présentant une forte affinité pour les métaux^{7,14}, elles vont s'adsorber à la surface des nanoparticules métalliques une fois formées. La taille des particules est ainsi limitée en contrôlant le rapport entre ligands et réactifs mis en présence dans le milieu réactionnel, comme le montrent les exemples suivants.

La réduction des ions précurseurs AuCl_4^- en phase aqueuse et en présence de ligands citrates constitue une méthode bien connue pour synthétiser des nanoparticules d'or de taille contrôlée¹⁵. Le rapport citrate/ AuCl_4^- permet en effet de contrôler le diamètre des particules de 15 à 147 nm¹⁶.

La synthèse de nanoparticules d'or stabilisées par des ligands thiolés mise au point par Brust *et coll.* en 1994 se fait en phase organique¹⁷. Les particules obtenues sont recouvertes d'une monocouche de ligands thiolés. Le diamètre du cœur cristallin peut être contrôlé via le rapport thiol/ AuCl_4^- : plus celui-ci est élevé, plus la taille des particules est petite. Le diamètre moyen des particules ainsi synthétisées est compris entre 1.5 et 5.2 nm (selon le rapport thiol/ AuCl_4^- mais aussi selon la structure du ligand utilisé).

Le contrôle de la taille des particules peut également être réalisé via des **polymères**, le plus couramment utilisé étant le poly(*N*-vinyl-2-pyrrolidone) (PVP)¹⁸. Là aussi, le rapport ions précurseurs/PVP constitue le principal outil de contrôle de la taille des nanoparticules formées. Lors de la synthèse de particules de palladium par exemple¹⁹, un rapport PVP/Pd de 0.1, 1, 10 et 40 permet d'obtenir des particules de 3.2, 2.8, 2.5 et 1.9 nm. Ainsi l'augmentation du nombre de molécules de PVP par rapport aux ions précurseurs introduits engendre une diminution de la taille des nanoparticules formées.

La longueur des chaînes de polymère constitue aussi un facteur indirect de contrôle de la taille des nanoparticules. Longenberger et Mills ont synthétisé des nanoparticules de palladium, d'argent et d'or en présence de poly(éthylène glycol) (PEG) à l'abri de la lumière en phase organique²⁰. Dans le cas de l'or, la réaction est plus rapide. Des analyses par spectroscopie infrarouge ont montré que le PEG sert à la fois d'agent réducteur et de complexant pour les ions AuCl_4^- via les groupements oxyde d'éthylène. L'augmentation de la concentration ou de la masse moléculaire du PEG permet d'augmenter le nombre de sites de nucléation que constituent les groupements oxyde d'éthylène, et ainsi diminuer la taille des particules.

Il est possible, dans un régime sous contrôle cinétique, de favoriser une croissance anisotrope des particules, en jouant sur différents paramètres de synthèse comme une concentration élevée en réactifs et/ou la présence de tensioactifs s'adsorbant de manière sélective sur certaines facettes du cristal en croissance. Ceci permet d'induire une croissance dirigée selon un axe préférentiel et de former des particules anisotropes. En effet, la vitesse de croissance d'une facette dépend de façon exponentielle de l'énergie de surface de cette facette, c'est-à-dire que, dans un milieu favorisant une vitesse de croissance élevée (milieu riche en

monomères), les facettes présentant une énergie de surface élevée vont croître plus rapidement que les facettes d'énergie de surface plus faible^{7,21}. Ainsi l'adsorption sélective d'un tensioactif à la surface de certaines facettes va diminuer leur tension interfaciale et donc ralentir leur croissance au profit de la facette « non fonctionnalisée » (**figure 2.2**, d'après ⁷).

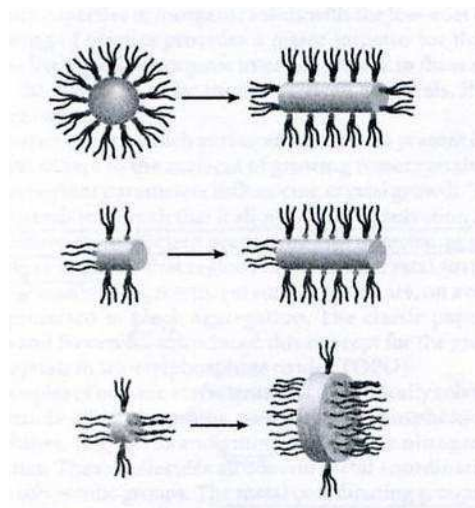


Figure 2.2 : Adsorption sélective de tensioactifs orientant la croissance de la particule⁷

Cette modulation de la forme des particules dépend évidemment de la nature des ligands utilisés, de leur structure et du rapport entre ligands et monomères introduits dans le milieu réactionnel. Peng *et coll.* ont par exemple synthétisé des particules de CdTe en présence d'acide oléique et d'un autre tensioactif comportant un groupement phosphine dont les chaînes alkyles sont de longueur variable²². Ils obtiennent ainsi :

- des particules sphériques en présence de tributylphosphine (TBP)
- des tétrapodes en présence de trioctylphosphine (TOP).

Ils constatent que le nombre de nuclei formés est plus faible en présence de TOP que de TBP. La concentration en monomères « restante » dans le milieu est donc plus importante après nucléation dans le cas où TOP est utilisé comme ligand. Or une concentration élevée en monomères favorise une croissance anisotrope des particules, ce qui explique l'obtention de tétrapodes avec TOP.

Les tensioactifs peuvent également être utilisés afin d'orienter la croissance de « germes » introduits dans un milieu contenant agent réducteur et ions précurseurs (seed-mediated growth

method)²³. De nombreux travaux rapportent par exemple la synthèse de nanobâtonnets d'or par ce procédé²⁴.

2. Micelles de copolymères à blocs

Les copolymères à blocs amphiphiles peuvent être utilisés comme microréacteurs pour la synthèse de nanoparticules métalliques ou semi-conductrices, dans la mesure où l'un des deux blocs présente une affinité pour les ions précurseurs²⁵.

Bronstein *et coll.* ont par exemple utilisé des micelles de polybutadiène-bloc-poly(oxyde d'éthylène) (PB-*b*-PEO) en phase aqueuse pour synthétiser des nanoparticules de platine²⁶. Les ions métalliques précurseurs PtCl_4^{2-} présentent une affinité chimique pour le bloc polybutadiène, via des liaisons π . Leur réduction est réalisée en faisant buller H_2 dans la solution. Des particules de 2 nm de diamètre sont ainsi obtenues après ultrafiltration. La variation de la longueur des blocs copolymères permet d'ajuster la taille des nanoparticules métalliques.

De même, des nanoparticules d'or de diamètre inférieur à 5 nm ont été produites par photoréduction dans des micelles d'acide polyacrylique/polystyrène²⁷.

3. Dendrimères

Les dendrimères sont des oligomères très ramifiés possédant une structure régulière²⁸. Les chaînes ramifiées sont organisées en génération : plus il y a de ramifications, plus l'ordre de génération caractérisant le dendrimère est élevé et plus celui-ci adopte une configuration sphérique. Les dendrimères sont donc constitués d'un cœur, d'où partent des chaînes ramifiées de façon symétrique, et de groupements fonctionnels terminaux à leur surface.

Plusieurs groupes ont réalisé la synthèse de nanoparticules inorganiques en présence de dendrimères, qui agissent comme des agents stabilisants. Des nanoparticules de cuivre²⁹, d'argent³⁰, d'or³¹ ou d'oxyde de fer³² ont ainsi pu être synthétisées, par réduction chimique, photoréduction (UV-visible) ou coprécipitation.

L'influence de l'ordre de génération, c'est-à-dire de la taille, de dendrimères poly(amidoamine) (PAMAM) a été étudiée dans le cas de la synthèse de nanoparticules d'or³¹. Pour des dendrimères de génération 10 (G10), les particules font 3 nm de diamètre, elles sont synthétisées à l'intérieur du dendrimère. Pour G4-G9, les particules mesurent entre 1,8 et 4 nm de diamètre : une seule particule par dendrimère peut être stabilisée. Pour G2, le

diamètre moyen des particules est de 4 nm : les dendrimères stabilisent les particules à leur surface et limite ainsi leur croissance. Ainsi l'ordre de génération des dendrimères va conditionner leur capacité à servir de matrice pour la nucléation de particules. Les dendrimères de génération suffisamment élevée pour constituer une sphère comportent des espaces « vides » assez grands pour accueillir une particule. La croissance de celle-ci sera alors limitée par cet espace confiné³³. Par contre, les dendrimères de génération plus faible vont stabiliser les particules via une adsorption en surface³⁴.

Le rapport ions précurseurs/dendrimères intervient également dans le contrôle de la taille des nanoparticules obtenues. Des nanoparticules d'oxyde de fer ont été synthétisées par ajout d'ions ferreux et d'un oxydant puissant $(\text{CH}_3)_3\text{NO}$ à des dendrimères PAMAM de génération 4 (4-5 nm de diamètre) en milieu aqueux alcalin³². Pour des rapports Fe^{2+} /dendrimères égaux à 50, 100 et 200, le diamètre des particules est de 8.5 nm, 9.5 nm et 11 nm. Les fonctions acides carboxyliques présentes à la surface des dendrimères constituent des sites de nucléation privilégiés et c'est la densité de charge surfacique importante qui permet de stabiliser les nuclei.

4. Micelles inverses

Les tensioactifs de forme conique, c'est-à-dire avec une petite tête polaire et une chaîne carbonée très ramifiée, ont tendance à s'assembler en micelles inverses. Le cœur des gouttes est constitué d'eau pour laquelle les têtes polaires ont une forte affinité. Précisons que lorsque les quantités d'eau et d'huile dans le milieu sont importantes, la forme et la dimension des micelles changent : on obtient alors un réseau interconnecté tridimensionnel de cylindres.

Les micelles inverses sont caractérisées par deux propriétés qui rendent leur utilisation en tant que microréacteurs pour la synthèse de nanoparticules inorganiques^{35,36} très intéressantes :

- la taille des gouttes formées peut être contrôlée via le rapport w entre la quantité d'eau et la quantité de tensioactifs introduites³⁷.
- le phénomène d'échange micellaire, résultant de la formation d'un dimère à la suite de la collision entre deux micelles (mouvement brownien) aboutit à un mélange homogène des coeurs des deux micelles impliqués³⁸.

De façon générale, deux procédés peuvent être employés pour synthétiser les nanoparticules inorganiques. La première méthode consiste à mélanger deux solutions micellaires contenant chacune un réactif impliqué dans la réaction. Les réactifs sont mis en contact grâce aux échanges micellaires (synthèse de nanoparticules de nickel³⁹, cuivre⁴⁰, bismuth⁴¹, rhodium⁴², argent⁴³, palladium et platine⁴⁴ par échange entre solutions micellaires d'ions précurseurs et d'agent réducteur). La seconde méthode consiste à injecter l'un des réactifs à la solution micellaire contenant l'autre réactif. La mise en contact se fait alors par diffusion (synthèse de semi-conducteurs⁴⁵ et de ferrites métalliques⁴⁶ MFe_2O_4 avec $\text{M} = \text{Fe}, \text{Mn}$ ou Co).

Il faut préciser que l'utilisation de tensioactifs fonctionnalisés, c'est-à-dire dont le contre-ion est l'ion métallique précurseur, améliore fortement la cristallinité des particules synthétisées⁴⁷.

Les micelles inverses peuvent servir d'empreintes pour contrôler la taille des nanoparticules. Celle-ci dépend en effet de la taille des micelles qui peut être contrôlée via le rapport w eau/tensioactifs. Ainsi pour des micelles dont le diamètre varie de 0.6 à 6 nm, la taille de particules de semi-conducteurs CdS, CdTe et CdMnS varie de 2 à 4 nm⁴⁵, celle de particules de sulfure d'argent Ag_2S varie de 2 à 6 nm⁴⁸ et celle de particules de cuivre de 2 à 10 nm³⁵. Pour des micelles plus grosses, de taille comprise entre 6 et 12 nm, le diamètre des particules n'évolue plus. Ce phénomène peut s'expliquer par la structure de l'eau au sein de la goutte⁴⁸.

L'effet d'empreinte des micelles inverses sur la forme des particules a également été exploré. Par exemple, des particules de cuivre cylindriques et sphériques sont obtenues au sein d'un réseau interconnecté de cylindres du système $\text{Cu}(\text{AOT})_2$ -isooctane-eau (**figure 2.3**), alors que seules des particules sphériques sont obtenues au sein du même système organisé en micelles sphériques^{49, 21}.

D'autre part, la synthèse de nanoparticules de CdS au sein de micelles cylindriques ou de gel résultant de l'ajout de phosphatidylcholine à des micelles inverses de $\text{Na}(\text{AOT})$, permet de faire varier la forme du nanocristal de la sphère au bâtonnet⁵⁰.

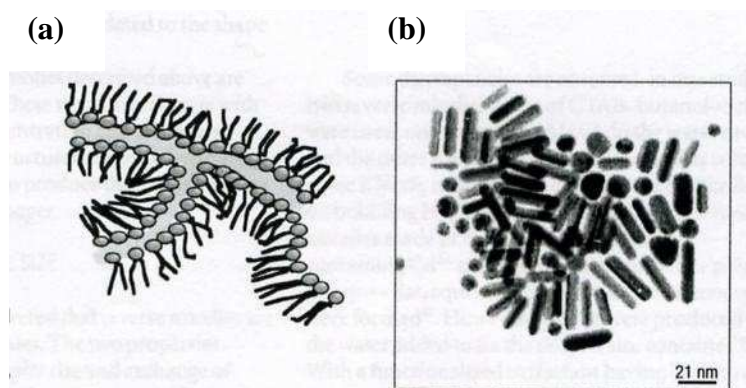


Figure 2.3 : Effet d’empreinte des micelles inverses sur la forme des particules obtenues²¹ :
 (a) représentation de réseau interconnecté de micelles cylindriques, (b) cliché de MET de nanoparticules de cuivre cylindriques et sphériques

5. Phases lamellaires

Dans le cas d’un système tensioactif-eau, selon sa composition et selon la géométrie du tensioactif, les molécules amphiphiles sont susceptibles de former des phases lamellaires, constituées d’une alternance de couches aqueuses et de bicouches de tensioactifs. Ce type d’auto-assemblage a beaucoup moins été étudié pour la synthèse de nanoparticules que les autres milieux confinés. Elles sont pourtant intéressantes car la distance entre feuillet lamellaires peut être modulée : elles ont ainsi pu être utilisées comme « empreinte » pour contrôler la taille et la forme de nanoparticules inorganiques.

Concernant l’effet sur la taille, il a été montré que le diamètre de nanoparticules d’argent n’évolue pas de la même manière en fonction du temps, selon que les particules sont formées *in situ* ou par agrégation de nuclei d’argent préalablement incorporés dans la phase lamellaire⁵¹. Les auteurs en concluent que la phase lamellaire ralentit l’agrégation des nuclei et confine la croissance des particules d’argent (3.3 nm de diamètre).

L’exemple suivant nous permet de mesurer l’effet de la présence, au sein du milieu confiné, de groupements présentant une affinité chimique forte pour le métal en croissance, sur la forme finale de la particule. Pour réaliser la synthèse de nanoparticules de CdS au sein de phases lamellaires, Adair *et coll.* ont utilisé le système ternaire sodium

dodécylsulfate/octadécylamine-toluène-eau⁵². Deux phases lamellaires, l'une contenant les ions métalliques Cd^{2+} et l'autre contenant les ions sulfure S^{2-} , sont mélangées dans un rapport 1:1 et la coprécipitation a lieu au sein de la couche aqueuse. Les particules de CdS obtenues sont des plaquettes de 200 nm de large et 20 nm d'épaisseur, alors que les particules formées par coprécipitation classique présentent des morphologies arbitraires. Les auteurs ont montré que la coordination des ions Cd^{2+} par les groupements amine présents au sein des bicouches de tensioactifs limite la croissance d'une facette du cristal et favorise la formation de plaquettes. La figure 2.4 présente un schéma de cette croissance dirigée. En l'absence du ligand amine au sein des bicouches, aucune particule ayant la forme de plaquette ne peut être synthétisée.

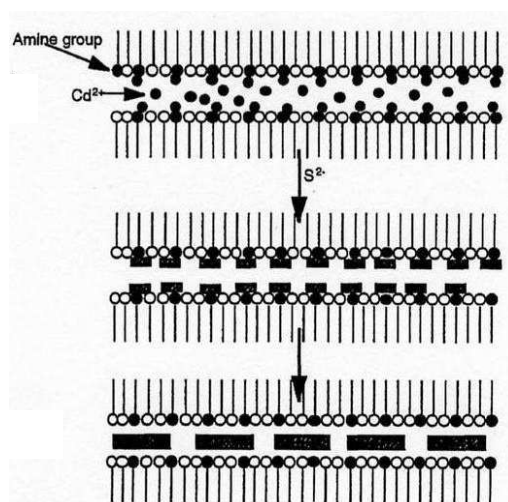


Figure 2.4 : Croissance 2D induite par la coordination des ions Cd^{2+} par les groupements amine⁵²

L'effet d'empreinte de la phase lamellaire ainsi que la présence de ligand ayant une affinité chimique pour les ions précurseurs semblent donc favoriser la croissance « bidimensionnelle » des particules de CdS.

6. Vésicules unilamellaires lipidiques

Les vésicules unilamellaires lipidiques, encore appelées *liposomes*, sont constituées d'une membrane lipidique renfermant un cœur interne aqueux. Elles ont déjà été utilisées pour la

synthèse de nombreux matériaux comme des nanoparticules d'argent⁵³, d'oxyde de fer^{54,55}, de semi-conducteurs⁵⁶, de silice⁵⁷, de particules composites Al/Mg⁵⁸, etc.

La synthèse de nanoparticules d'argent a servi de synthèse modèle pour évaluer l'influence de la membrane lipidique sur la précipitation⁵³. En l'absence de vésicules, la précipitation des ions Ag^+ peut avoir lieu à partir d'un pH égal à 7. Au sein des vésicules unilamellaires, la précipitation ne se produit qu'à partir d'un pH du milieu extérieur égal à 11. La membrane lipidique contrôle la vitesse de diffusion des ions OH^- et donc les conditions de précipitation.

Li *et coll.* ont synthétisé des nanoparticules de magnétite au sein de vésicules unilamellaires lipidiques⁵⁴. La coprécipitation des sels de chlorures de fer est réalisée par augmentation du pH du milieu dispersant à 8-9. Les ions Fe^{2+} et Fe^{3+} non encapsulés ne sont pas éliminés, une synthèse extravésiculaire a donc également lieu. Les particules formées à l'extérieur des vésicules font 160 nm de diamètre, alors que celles formées à l'intérieur font 7 nm. Cet exemple démontre également l'effet de la membrane sur la croissance (via un contrôle de la diffusion des ions OH^-) et sur l'agrégation (via l'adsorption des phospholipides à la surface des particules, démontrée par infra-rouge).

La synthèse de nanoparticules d'oxyde de fer a également été réalisée au sein de vésicules de 60 nm de diamètre, composées de phosphatidylcholine pure^{59,60}. Les ions précurseurs Fe^{2+} et Fe^{3+} non encapsulés ont été éliminés sur colonne échangeuse d'ions, puis le pH est augmenté par ajout de NaOH (pH=12). Les particules formées font entre 2 et 5 nm de diamètre après 30min d'incubation, et elles sont sphériques. Il a été montré que la taille des particules obtenues dépend de la quantité d'ions précurseurs présents au sein de la vésicule (donc du taux d'encapsulation).

7. Vésicules multilamellaires de type « oignon »

Les oignons sont des vésicules multilamellaires comportant des bicouches de molécules amphiphiles jusqu'au centre de l'objet, comme nous l'avons décrit dans le chapitre 1. Leur utilisation comme microréacteur chimique pour la synthèse de nanoparticules inorganiques de taille contrôlée a été envisagée au vu de leurs propriétés particulières. D'une part, le choix de la molécule amphiphile peut permettre de complexer certains ions, aboutissant ainsi à des taux d'encapsulation d'ions métalliques assez important. Ainsi par exemple, des oignons constitués

d'un tensioactif (Genamin T020) capable de chélater les ions métalliques divalents via un groupement *N,N*-di(hydroxyéthyl)amine, permettent d'encapsuler jusqu'à 80% d'ions cuivriques^{61, 62}. D'autre part, nous venons de voir que, dans le cas de vésicules unilamellaires lipidiques, la membrane induit un contrôle cinétique de la diffusion des ions. Ce phénomène est encore plus marqué dans le cas des oignons du fait de la succession de bicouches, ce qui permet d'envisager un contrôle des phénomènes de nucléation-croissance et donc un contrôle de la taille des particules. Enfin, la croissance et l'agrégation des particules synthétisées *in situ* peuvent également être limitées via le confinement entre les bicouches.

Gaufre *et coll.*⁶¹ ont réalisé la synthèse de particules d'oxyde de cuivre au sein d'oignons composés de Genamin T020. La réduction des ions Cu^{2+} encapsulés au sein des oignons se fait par introduction de l'agent réducteur (l'hydrazine) dans le milieu dispersant. Des particules de 10 à 30 nm sont ainsi obtenues. La diffusion lente de l'hydrazine au sein des couches successives de l'oignon explique la polydispersité des particules obtenues.

Lorsque la diffusion des réactifs est plus rapide, alors une population de particules monodisperses en taille est obtenue. C'est le cas de la synthèse de nanoparticules d'argent⁶³ réalisée par diffusion des ions Ag^+ au sein d'oignons composés de Genamin T020. Il a été montré que la basicité du milieu interne de l'oignon, due aux groupements amine présents dans le tensioactif, suffisait à induire la précipitation des ions métalliques Ag^+ en oxyde Ag_2O . La présence de cet oxyde catalyse la réduction de Ag^+ en Ag^0 par les groupements oxo et hydroxyle de Genamin T020. Des particules d'argent monodisperses de 3 à 10 nm de diamètre sont formées pour un temps d'incubation variant de 30min à 17h. Le temps d'incubation permet donc de contrôler la taille des particules formées dans le cas d'une diffusion rapide.

La forme des nanoparticules peut aussi être contrôlée. Faure *et coll.* ont par exemple réalisé la synthèse de nanoparticules d'or au sein d'oignons⁶⁴, par une méthode de préparation où les ions précurseurs AuCl_4^- sont directement introduits dans la phase lamellaire (composée d'un mélange de phosphatidylcholine et d'un tensioactif non ionique, le Brij30). Des particules de 6 nm ayant la forme de grains de riz sont ainsi obtenues. La synthèse extravésiculaire donne lieu à des particules de formes variées (triangles, rhomboèdres, etc) d'une centaine de nanomètre. Dans le cas de la synthèse *in situ*, les principales conditions nécessaires à la formation d'une population monodisperse de particules sont réunies. La nucléation se fait sur

plusieurs sites en même temps, et la croissance est contrôlée via un niveau de sursaturation faible. Le confinement au sein des bicouches induit une croissance anisotrope des particules.

Enfin Kim *et coll.* ont développé un procédé original pour la synthèse de nanoparticules composites d'oxydes⁶⁵. Deux phases lamellaires sont mélangées : l'une étant hydratée par un mélange de deux sels précurseurs $\text{In}(\text{NO}_3)_3$ et SnCl_4 , l'autre par une base NH_4OH . Les deux phases lamellaires sont ensuite cisailées, et la précipitation conduit à la formation d'hydroxydes « purs » ($\text{In}(\text{OH})_3$ et $\text{Sn}(\text{OH})_4$) et d'hydroxydes d'indium dopés par l'hydroxyde d'étain. La calcination de ces dernières particules à 700°C permet d'obtenir des particules composites d'oxyde indium-étain. La distribution en taille des particules est très large du fait de l'excès d'ions OH^- dans le milieu menant à une concentration toujours très supérieure à la sursaturation : plusieurs nucléations ont lieu, toutes suivies par une étape de croissance des particules.

C- Conclusion

Les phénomènes de nucléation-croissance gouvernent entièrement la morphologie des particules synthétisées. Il est possible de jouer sur le rayon du nucleus critique, sur les vitesses de nucléation et de croissance par la réalisation d'une synthèse en milieu colloïdal organique. Les exemples que nous venons de citer témoignent de la multiplicité des paramètres influençant taille et forme des particules, et donc de la complexité de l'étude de ces systèmes. Dans le cas d'une synthèse en présence de tensioactifs « libres », le rapport ions précurseurs/tensioactifs permet de contrôler la taille. Dans le cas de l'utilisation de polymères, le rapport ions précurseurs/polymères ainsi que la longueur des chaînes (en fait, le nombre de sites de nucléation) peuvent avoir une influence. Le contrôle de la taille des micelles inverses et des micelles de copolymères permet celui de la taille des particules : ici le milieu confiné sert d'empreinte au cours de la synthèse. C'est le cas également au sein de phases lamellaires cisailées. Concernant la forme des particules, il faut remarquer qu'une synthèse au sein de vésicules unilamellaires donne lieu à des particules sphériques là où une synthèse en solution génère des particules de formes variées. L'effet d'empreinte du milieu colloïdal a été mis en évidence pour une synthèse au sein de micelles cylindriques. Pour le reste, il semble que ce

soit plutôt l'adsorption sélective de tensioactifs qui oriente la croissance selon un axe préférentiel et permette d'obtenir des particules anisotropes.

Nous avons vu, dans le cas de vésicules unilamellaires lipidiques, que le cœur interne de la vésicule possède des propriétés de pH, de concentrations en précurseurs, etc, bien différentes du milieu dispersant, du fait du contrôle cinétique sur la diffusion exercée par la membrane. Dans des vésicules multilamellaires de type oignon, non seulement les membranes sont susceptibles d'exercer un contrôle sur la vitesse de génération des monomères et donc sur les étapes de nucléation-croissance, mais la succession de bicouches offre en plus un milieu confiné privilégié. Le contrôle de la morphologie des particules peut ainsi être réalisée grâce à la géométrie particulière de cette vésicule.

La suite de ce chapitre étant consacrée à la synthèse de nanoparticules d'or dans les oignons, voyons maintenant les propriétés et applications des nanoparticules d'or dans les domaines du biomédical et de la catalyse.

II- Les nanoparticules d'or : propriétés et intérêt

A- Propriétés des nanoparticules d'or

Les nanoparticules de métaux nobles, et plus particulièrement les nanoparticules d'or, possèdent des propriétés physico-chimiques remarquables, dominées par des effets de surface dus à leur taille nanométrique.

1. Propriétés optiques

Le passage d'un état massif à un état « dispersé » sous forme de nanoparticules confère au métal des **propriétés optiques** intéressantes. En effet, lorsqu'une particule sphérique de métal noble possède un diamètre inférieur à la longueur d'onde d'une onde électromagnétique incidente, il se produit alors une oscillation collective des électrons de la bande de conduction⁶⁶. Lorsque la fréquence de l'onde électromagnétique incidente est égale à la fréquence propre des électrons, il se produit alors un phénomène de résonance, conduisant à une bande d'absorption (et de diffusion) nommée bande de résonance plasmon de surface⁶⁷.

Ce phénomène de résonance confère aux dispersions de nanoparticules de métaux nobles une couleur intense et des propriétés optiques intéressantes. La fréquence de résonance plasmon dépend :

- de la nature du métal
- de la taille des particules
- de leur forme
- des propriétés diélectriques du milieu environnant
- des interactions entre particules

Liz-Marzan *et coll.* ont montré qu'il est possible de changer la couleur de la dispersion de colloïdes métalliques (et donc la position de la bande de résonance plasmon) en modifiant leur taille et leur forme⁶⁸.

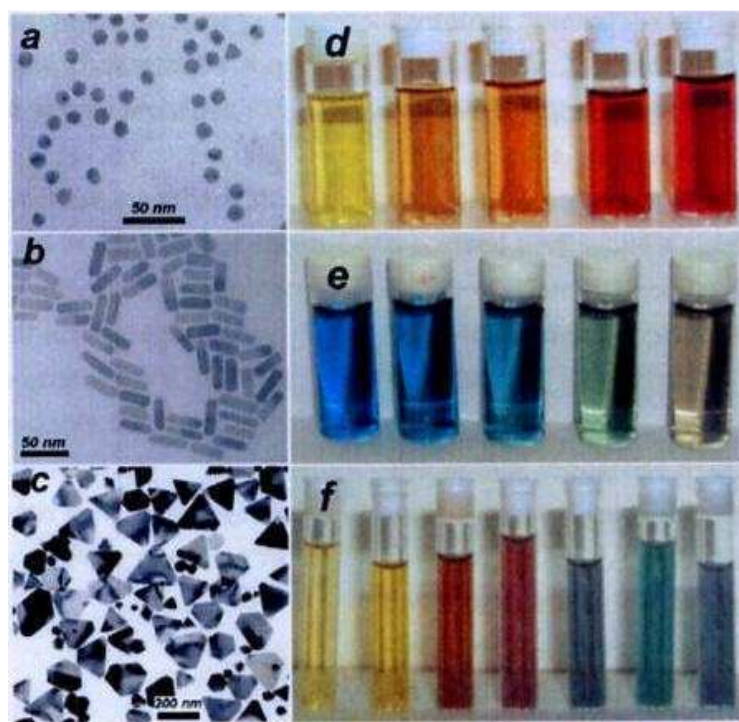


Figure 2.5 : Clichés de MET de : (a) nanosphères d'or, (b) nanobâtonnets d'or, (c) nanoprismes d'argent, et images des dispersions colloïdales : (d) alliage AuAg avec une concentration en or qui augmente, (e) nanobâtonnets d'or avec un rapport d'aspect qui augmente, (f) nanoprismes d'argent avec une taille latérale qui augmente (d'après ⁶⁸)

Il est donc possible d'ajuster la position de la bande de résonance plasmon en fonction de la morphologie des nanoparticules ce qui peut avoir un intérêt pour certaines applications médicales comme la photothermie.

2. Propriétés chimiques

Les nanoparticules d'or présentent une forte affinité électronique pour des molécules comportant des thiols, des ponts disulfures, ou des groupements amines. Ces interactions fortes favorisent par exemple leur fonctionnalisation en surface par des molécules organiques fluorescentes, par des peptides, antigènes, anticorps⁶⁹, ou encore par des brins d'ADN⁷⁰.

Les clusters d'or sont classiquement de forme cuboctaédrique. La coordination des atomes constituant le cluster change selon l'endroit où il sont placés : face (plan), arête, ou coin. Les atomes d'arête ou de coin sont des atomes de basse coordination. Ainsi, lorsque la taille des particules d'or diminue, non seulement la proportion des atomes de surface augmente, mais également celle des sites de basse coordination⁷¹. Ce phénomène a des conséquences sur la réactivité de surface des nanoparticules d'or. Par exemple, le monoxyde de carbone ne s'adsorbe pas sur les surfaces planes des nanoparticules d'or (face), par contre il s'adsorbe sur les sites de basses coordinations (coins et arêtes). Il en est de même pour le dihydrogène, pour lequel l'adsorption est dissociative, et pour le monoxyde d'azote.

La taille des nanoparticules d'or va donc conditionner leur réactivité de surface et leurs éventuelles applications en catalyse.

B- Applications biomédicales

Les nanoparticules d'or sont biocompatibles et non cytotoxiques⁷², il est par conséquent possible d'envisager leur utilisation dans le domaine médical. Les recherches concernent principalement l'exploitation de leurs propriétés optiques exceptionnelles pour la détection de biomolécules⁷⁰, l'imagerie cellulaire⁷⁴ ou la photothermie⁷³. Leur chimie de surface favorise leur fonctionnalisation par diverses biomolécules et leur implication dans la mise au point d'un vecteur. Ce vecteur présenterait la double capacité de diagnostic et de thérapie.

1. Imagerie

La diffusion intense des nanoparticules d'or, due à leurs propriétés de résonance plasmon de surface, permet de les utiliser comme « marqueurs optiques » pour la détection de tumeurs cancéreuses par des techniques d'imagerie photonique⁷⁴.

Sokolov *et coll.*⁷⁵ par exemple ont utilisé des nanoparticules d'or fonctionnalisées par des anticorps « anti-EGFR » afin de cibler les récepteurs EGFR surexprimés à la surface de certaines cellules cancéreuses⁷⁶ (cancer de l'estomac, des poumons, des ovaires, etc). Le greffage sur les particules de 12 nm de diamètre se fait par interactions électrostatiques entre la surface chargée négativement des particules (présence de ligands citrate pour la stabilisation) et l'anti-EGFR⁷⁵. Les cellules cancéreuses sont marquées par ce conjugué nanoparticule d'or-anticorps par incubation. L'observation de la suspension en réflectivité sous microscope confocal, en présence d'un laser de longueur d'onde 647 nm permettant d'exciter la résonance plasmon de surface des nanoparticules, montre clairement le marquage des cellules par les nanoparticules d'or. L'intensité de diffusion des cellules non marquées par des nanoparticules d'or est environ 50 fois plus faible et il est impossible de les distinguer de l'image de fond (*comparaison des figure 2.6c et 2.6d*). De plus, lorsqu'elles sont fonctionnalisées par la protéine BSA (bovine serum albumin), les nanoparticules d'or ne permettent pas de marquer les cellules cancéreuses (*figure 2.6e et 2.6f*). Ceci prouve la spécificité du marquage par anti-EGFR, et par comparaison avec les images de microscopie optique en transmission, on constate que les conjugués nanoparticules d'or-anticorps adhèrent à la membrane de la cellule cancéreuse (*figure 2.6a à 2.6d*).

2. Photothermie

La photothermie est en fait une technique d'**hyperthermie laser** qui provoque un échauffement très localisé au niveau d'une tumeur cancéreuse⁷⁷. Comme dans le cas de l'hyperthermie magnétique (abordée dans le chapitre 4), cette technique peut être utilisée pour améliorer l'efficacité des traitements par chimiothérapie ou par radiation, ou pour l'ablation des tumeurs par nécrose complète des cellules cancéreuses.

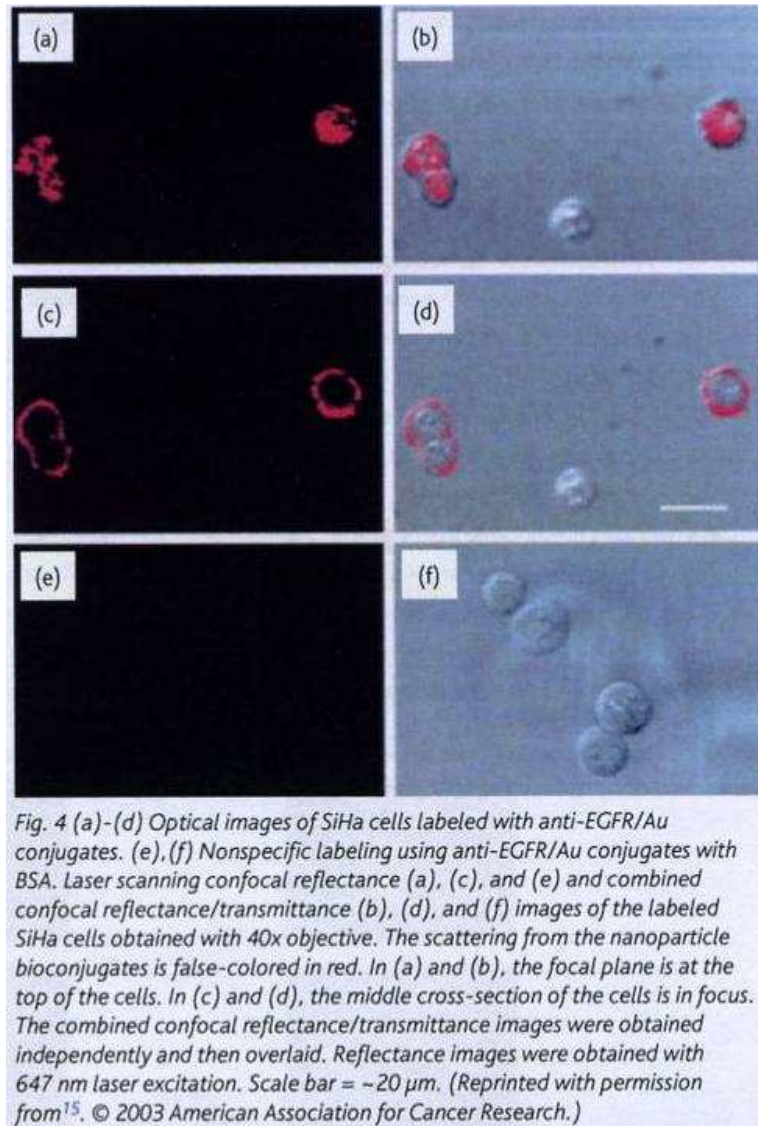


Figure 2.6 : Images de microscopie confocale (réflectivité) et optique (transmission) de NP d'or-anticorps/cellules cancéreuses⁷⁵

Lorsqu'une onde électromagnétique interagit avec une nanoparticule d'or, les électrons au sein de la particule entrent en collision, provoquant ainsi une élévation de température transmise au milieu environnant⁷⁸. L'absorption importante due à la résonance plasmon de surface est suivie d'une conversion rapide de la lumière absorbée en chaleur (1 picoseconde). Les propriétés des nanoparticules d'or offrent de nombreux avantages à leur utilisation pour la photothermie :

- du fait d'une section efficace d'absorption élevée, leur pouvoir chauffant est beaucoup plus important que celui de chromophore classique comme l'indocyanine verte

utilisée lors des premières expériences de photothermie réalisées sur des tumeurs⁷⁹. Le traitement par photothermie via les nanoparticules d'or promet donc une efficacité à des doses d'irradiation plus faibles.

-il est possible de combiner imagerie et diagnostique en se plaçant dans une configuration où l'absorption et la diffusion due à la résonance plasmon de surface sont optimales.

L'utilisation de laser permettant l'excitation des nanoparticules d'or dans le domaine UV-visible peut permettre *in vivo* le traitement photothermique de cancers de la peau ou de tumeurs localisées en surface. Mais le traitement (et l'imagerie) de tumeurs localisées au sein de tissus plus profonds nécessite de travailler dans le **proche infrarouge**. Dans le domaine 650-900nm, la profondeur de pénétration de l'onde électromagnétique peut atteindre plusieurs centimètres⁸⁰. Pour des applications *in vivo*, il est donc nécessaire que la bande de résonance plasmon de surface des nanoparticules d'or se situe dans le domaine du proche infrarouge. Le changement de morphologie et de composition des nanoparticules d'or peut permettre de modifier de façon drastique la position de la bande plasmon. Dans le cas de nanobâtonnets d'or, deux bandes de résonance plasmon de surface sont présentes : l'une correspondant à l'oscillation transverse des électrons et l'autre à l'oscillation longitudinale. La bande longitudinale est la plus intense, et elle est sensible au rapport d'aspect des bâtonnets. En contrôlant ce rapport d'aspect, il est donc possible de déplacer la position de la bande longitudinale vers le proche infrarouge⁸¹. Ainsi, des structures comme des particules cœur-écorce silice-or⁸², des nanobâtonnets d'or⁸³, des nanocages⁸⁴ ou des assemblages de particules d'or^{77b} possèdent donc des propriétés optiques dans le domaine du proche infrarouge et sont adaptées pour des applications *in vivo*.

C- Applications en catalyse

Précisons tout d'abord qu'il existe deux types de catalyse :

- la catalyse homogène, où réactifs et catalyseur sont tous les deux en phase liquide
- la catalyse hétérogène, où réactifs et catalyseur sont dans des phases différentes, le catalyseur étant un solide et les réactifs étant en phase liquide ou gazeuse.

Nous allons ici nous intéresser plus particulièrement à la catalyse hétérogène. Bien souvent, le catalyseur est constitué d'une phase active, qui peut être sous forme de nanoparticules d'oxydes, de métaux, de sulfures, etc, déposée sur un support qui est un oxyde divisé (oxyde de silice ou de titane le plus souvent). Le catalyseur est d'autant plus actif qu'il est capable de « fournir » une quantité importante de produit par unité de temps et par unité de masse de catalyseur.

Les propriétés des nanoparticules d'or en catalyse ont été découvertes en 1987 par le Professeur Haruta. Son équipe a montré que les nanoparticules d'or peuvent catalyser la réaction d'oxydation du monoxyde de carbone CO en CO₂, à condition que les particules d'or soient d'un diamètre inférieur à 5 nm et déposées sur un support composé d'un oxyde réductible⁸⁵. L'or est le seul catalyseur permettant de réaliser la réaction d'oxydation de CO à température ambiante et même à des températures encore plus basse. A T=0°C par exemple, ils ont montré que la vitesse de réaction augmente considérablement pour des tailles de nanoparticules d'or inférieures à 5 nm, pour un catalyseur Au/TiO₂. L'utilisation de Pt/SiO₂ comme catalyseur nécessite de se placer au moins à 150°C, et la vitesse de réaction est moindre.

Jusqu'à cette découverte, l'or n'était pas considéré comme un bon catalyseur. Son inactivité provenait des méthodes de préparation employées, qui ne permettaient pas d'obtenir de petites particules (< 5 nm de diamètre).

La méthode classique de préparation était l'**imprégnation** : le support et une solution d'acide tétrachloroaurique sont chauffés à 80°C et agités, puis séchés à 100°C sous vide, et enfin calcinés à 300°C sous air (les oxydes de l'or n'étant pas stables, il n'est pas nécessaire d'opérer sous atmosphère inerte). La calcination provoque le frittage des particules d'or qui ont finalement un diamètre >10 nm.

Haruta *et coll.* ont mis au point une méthode de **dépôt-précipitation**⁸⁵, où le support et la solution d'acide tétrachloroaurique sont ramenés à pH basique (pH=8). Les hydroxydes d'or qui se forment interagissent avec l'oxyde formant le support. Les étapes suivantes sont identiques : séchage et calcination à 300°C. Des nanoparticules d'or de 2-3nm sont ainsi obtenues. Seulement 30% de ces particules est déposé sur le support. Il est possible d'améliorer ce rendement en procédant à une méthode de dépôt-précipitation en présence d'urée : les particules obtenues font 2-3 nm et 100% des particules est déposé sur le support⁸⁶. Un autre mode de préparation des catalyseurs consiste à utiliser des nanoparticules d'or « pré-formées » et de les déposer ensuite sur le support. Dans ces cas, la synthèse des

nanoparticules requiert l'utilisation d'agents stabilisants qu'il faut ensuite pouvoir éliminer sans modifier la distribution en taille des particules (frittage, aggrégation).

Les catalyseurs à base d'or trouvent des applications pour la dépollution de l'air et de l'eau. Ils pourraient par exemple jouer un rôle dans le contrôle de la pollution automobile. Une grande partie du CO rejeté dans l'air provient du démarrage des moteurs à froid. En effet, les pots catalytiques utilisés actuellement sont constitués de catalyseurs au platine/rhodium, qui sont efficaces pour convertir CO et les hydrocarbures non brûlés à chaud, mais pas à froid. L'or est un bon candidat pour ce type d'enjeu.

Son utilisation est également envisagée pour la décomposition des composés organiques volatiles (COV), issus principalement du transport et des cheminées industrielles. Les COV conduisent à une accumulation d'ozone via des réactions de chimie atmosphérique impliquant également les monoxyde et dioxyde d'azote. Ce sont pour l'instant des procédés thermiques qui servent à leur dégradation, mais des procédés catalytiques sont à l'étude⁸⁷.

Enfin la décomposition de la dioxine, composé provenant de la combustion des déchets ménagers et très toxique, présente des difficultés car la dioxine est une molécule très stable. C'est actuellement un catalyseur multicomposant qui est utilisé et permet sa décomposition à 98% à 150°C⁸⁸. Ce catalyseur contient notamment de l'or métallique.

PARTIE 2 : RESULTATS

L'incorporation de nanoparticules d'or au sein des oignons permet d'étendre les potentialités de ces vésicules lipidiques dans le domaine biomédical. En effet, la biocompatibilité, l'encapsulation de principes actifs, et la fonctionnalisation pour une plus grande furtivité et pour le ciblage spécifique, en font déjà une plateforme prometteuse pour la vectorisation. La présence de nanoparticules d'or rend possible l'utilisation de l'hybride oignon/particules à la fois comme outil diagnostique (imagerie) et thérapeutique (photothermie). Dans le domaine de la catalyse, l'hybride oignon/nanoparticules d'or pourrait permettre d'incorporer les particules sur le support d'oxyde de silice ou de titane divisé, la succession des bicouches lipidiques permettant d'éviter les phénomènes de frittage des particules dus au traitement thermique souvent employé durant l'élaboration de ces catalyseurs (chapitre 4). De plus, la synthèse de nanoparticules inorganiques au sein de ces édifices particuliers revêt un aspect plus fondamental concernant la compréhension de l'influence des mécanismes de nucléation-croissance d'une part, et du milieu confiné d'autre part, sur la morphologie des particules.

La suite de ce chapitre présente donc les résultats concernant la fabrication de ces hybrides. Dans un premier temps, nous expliquerons le mécanisme de réduction permettant de former les précurseurs de charge nulle, par réduction des ions métalliques par une molécule insérée dans les bicouches lipidiques. Ensuite nous développerons les différentes stratégies employées pour préparer les hybrides, qui diffèrent par le mode d'introduction des ions précurseurs. Les principaux résultats de la première méthode explorée seront donnés. Puis nous présenterons de manière plus détaillée les caractéristiques des particules obtenues par la deuxième méthode, que ce soit par voie chimique, par photoréduction UV ou par radiolyse γ .

I- Formation des précurseurs de charge nulle

Ces résultats ont été publiés dans la référence [89].

Plusieurs travaux ont rapporté la formation de nanoparticules métalliques au sein de matrices participant à la réduction des ions précurseurs comme par exemple des gels de poly(*N*-vinyl-2-pyrrolidone)¹⁹ et polyéthylène glycol²⁰, des dendrimères de poly(amidoamine)^{33,90}, des vésicules comportant un acide phosphatidique ou un phosphohydroxyéthanol⁹¹, des phases lamellaires de C₁₂E₄ (tétraéthylène glycol monododecyl éther)⁹² ou encore au sein de matrice inorganique de silice comportant des groupements silanol⁹³.

Dans notre cas, les constituants des oignons (phosphatidylcholine PC et monooléine) vont également être impliqués directement dans la synthèse des précurseurs Au(0). En effet, lorsque la phase lamellaire est hydratée par le sel d'or, un changement de couleur se produit, signature de la formation de particules d'or. Afin de savoir lequel est responsable de la réduction, nous avons testé chaque constituant des oignons en le mettant en contact avec le sel d'or. Le tableau 2.1 récapitule les différents changements de couleur observés.

Composition des bicouches des oignons	Couleur	Temps d'apparition de la couleur
Monooléine	Violet	5h
PC	Bleu-gris	10min
PC à l'abri de la lumière	Bleu-gris	40min
POPC	Bleu-gris	5h
DPPA	Pas de changement	

Tableau 2.1 : Changements de couleur des pâtes (phases lamellaires cisailées après hydratation par $[\text{KAuCl}_4] = 10^{-3}\text{M}$)

Nous avons mis en évidence le rôle de chaque constituant des bicouches (PC et monooléine) dans la réduction des ions précurseurs AuCl_4^- par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier.

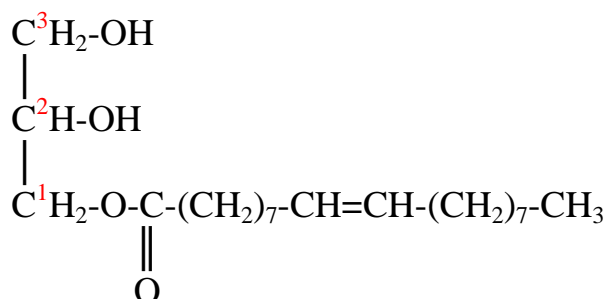
Ce travail a été réalisé en collaboration avec Bernard Desbat (LPCM, Bordeaux).

A- La monooléine comme agent réducteur

Le tableau 2.1 montre qu'un changement de couleur se produit lorsqu'on met en contact le sel d'or ($[\text{KAuCl}_4] = 10^{-3}\text{M}$) et la monooléine : la solution passe du jaune pâle au violet. Il y a donc formation de nanoparticules d'or. La monooléine porte des groupements alcool, présents dans la plupart des matrices utilisées pour la synthèse d'or⁹⁰⁻⁹³ et supposés être à l'origine de la réduction de Au(III). Nous allons montrer par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier que l'un des groupements OH de la monooléine est oxydé au cours de la synthèse des particules d'or.

Nous avons comparé le spectre IR de la monooléine hydratée par de l'eau distillée (25mg/mL) à celui de la monooléine hydratée par le sel d'or à 10^{-1}M (2mg/mL), afin de mettre en évidence l'oxydation des groupements alcool (**figure 2.7**).

Rappelons ici la formule semi-développée de la monooléine :



Des différences significatives apparaissent entre le spectre de monooléine/eau et celui de monooléine/or. Tout d'abord une nouvelle bande est détectée à 1708 cm^{-1} dans le spectre de monooléine/or (**figure 2.7b**). Cette bande est attribuée à la vibration de C=O dans un groupement acide carboxylique. Elle ne peut provenir d'un groupement cétone car si tel était le cas, elle s'accompagnerait de l'apparition d'une bande à 1430 cm^{-1} correspondant aux vibrations $\text{CH}_2\text{-C=O}$ et à $620\text{-}630\text{ cm}^{-1}$ correspondant aux vibrations de C-CO-C ⁹⁴. De plus, l'apparition de trois bandes à 1125 , 1182 et 1215 cm^{-1} (**figure 2.7c**) vient conforter cette attribution puisqu'elles correspondent aux vibrations de C-O couplées aux déformations des OH. En effet, nous retrouvons ce triplet dans le spectre de l'acide hydroxycaproïque⁹⁵, dont la formule développée se rapproche beaucoup de celle de la monooléine où le groupement OH porté par le carbone 3 est substitué par un groupement acide.

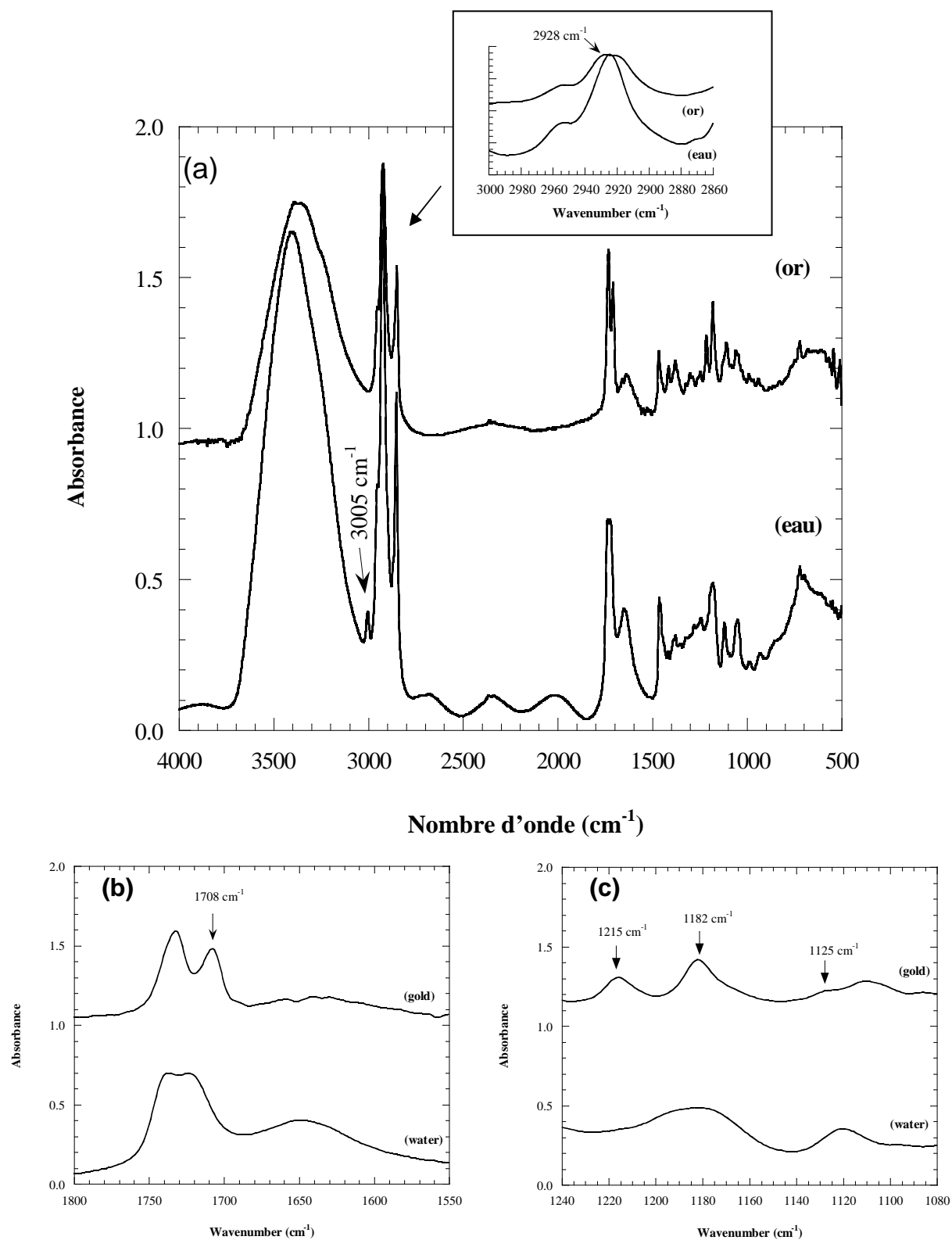


Figure 2.7 : Comparaison des spectres infra-rouge de la monooléine hydratée par de l'eau distillée (25mg/mL) et de la monooléine hydratée par le sel d'or à 10^{-1}M (2mg/mL) ; (b) et (c) zooms du spectre (a)

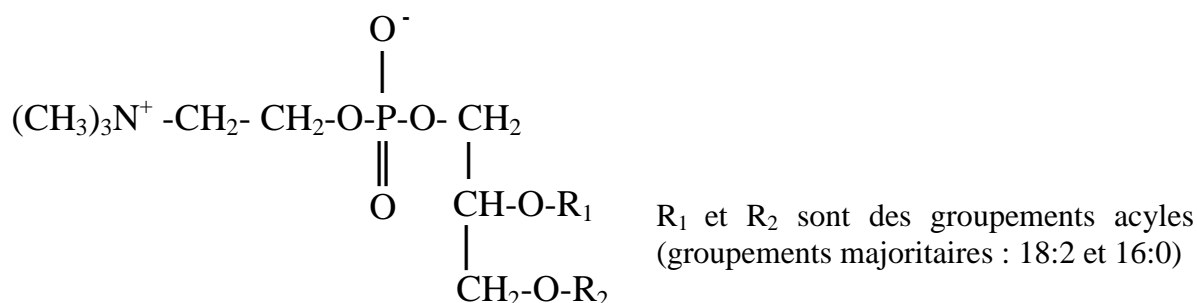
Un autre point intéressant est la disparition de la bande à 3005 cm^{-1} dans le spectre monooléine/or que l'on observe dans le spectre monooléine/eau (**figure 2.7a**) et correspondant aux vibrations d'élongation des C-H autour d'une double liaison. Corrélié à cela, une nouvelle bande apparaît à 2928 cm^{-1} (**insert figure 2.7a**) que nous pouvons attribuer aux élongations des CH_2 saturés en interaction avec les particules d'or. Ces deux modifications sont vraisemblablement liées à la présence de particules d'or. En effet, la chimisorption des atomes métalliques du groupe 1B (Cu, Ag, Au) sur les doubles liaisons a été rapportée dans la littérature⁹⁶ dans le cas de catalyse de réactions d'hydrogénation par des nanoparticules de Pd, Pt ou Au⁹⁷.

Ainsi nous avons montré que la monooléine agit comme réducteur des ions précurseurs, $\text{R-CH(OH)-CH}_2\text{(OH)}$ étant oxydé en R-CH(OH)-COOH pendant que Au(+III) est réduit, comme nous le détaillerons dans la partie I-C.

B- Les phosphatidylcholines (PC) comme catalyseur de la réduction

La PC change de couleur au contact du sel d'or à 10^{-3}M (1g/mL) : elle passe du jaune pâle au bleu-gris (**tableau 2.1**). La synthèse de nanoparticules d'or peut donc se produire en l'absence de monooléine. Afin de savoir si la PC est également réductrice de Au(III) , nous avons comparé le spectre infrarouge de la PC hydratée par de l'eau (1g/mL) et de la PC hydratée par le sel d'or à 10^{-1}M (0.1g/mL) (**figure 2.8**). L'analyse infrarouge montre que les nanoparticules d'or interagissent avec la tête polaire des lipides, avec le groupement acyle et avec les groupements éthylène des chaînes lipidiques.

Rappelons ici la formule semi-développée d'une phosphatidylcholine :



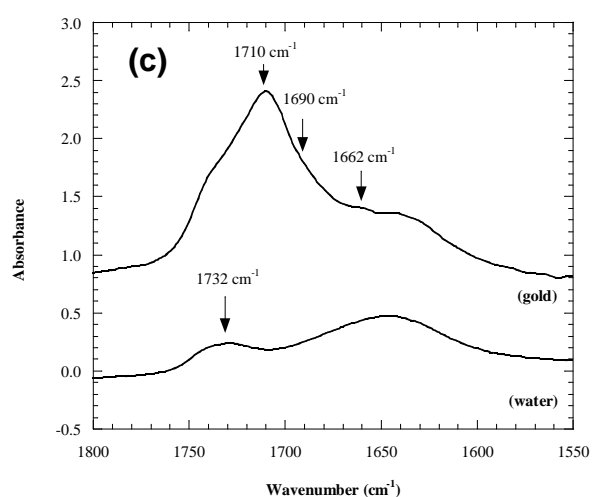
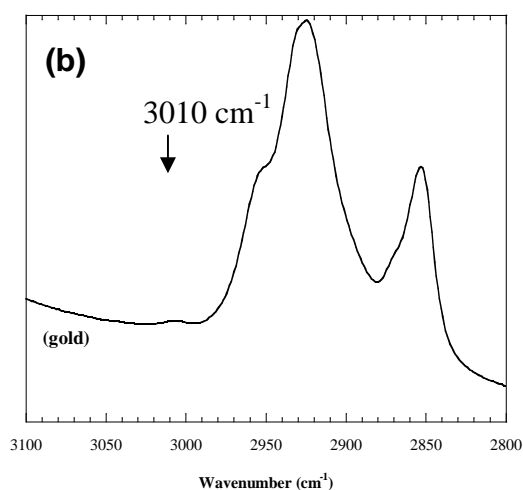
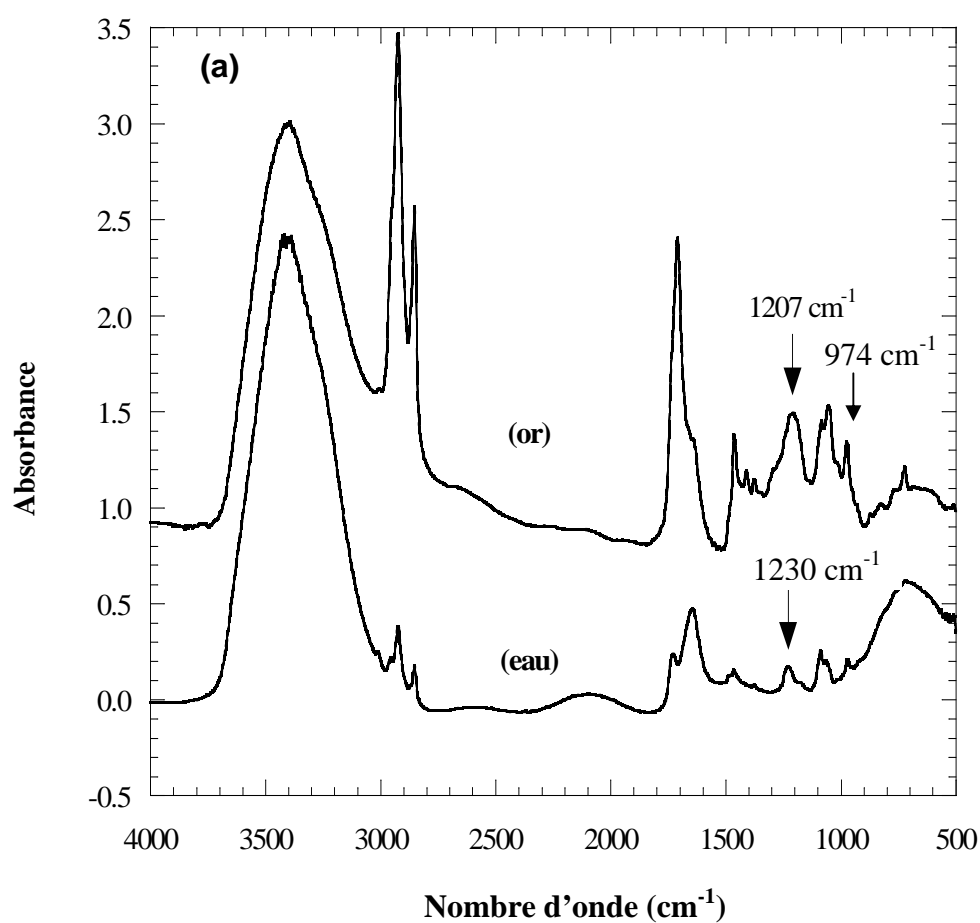


Figure 2.8 : Comparaison des spectres infra-rouge de la phosphatidylcholine hydratée par de l'eau distillée (1g/mL) et de la phosphatidylcholine hydratée par le sel d'or à 10^{-1}M (0.1g/mL) ; (b) et (c) zooms du spectre

Comme dans le cas de la monooléine, les doubles liaisons présentes dans les groupements acyles résiduels des PC (18 :2) sont susceptibles d'interagir avec les nanoparticules d'or. Nous observons en effet que la bande à 3010 cm^{-1} , correspondant aux élongations des C-H autour des doubles liaisons, diminue d'intensité (**figure 2.8b**). Corrélié à cela, la bande de la région $2880\text{-}2950\text{ cm}^{-1}$ s'élargit (**figure 2.8a**). Il existe donc une interaction entre les doubles liaisons des phosphatidylcholines et l'or.

De plus, une nouvelle bande apparaît à 1710 cm^{-1} avec deux autres composantes : l'une à 1690 cm^{-1} et l'autre à 1662 cm^{-1} (**figure 2.8c**). Ceci peut être interprété comme le glissement de la bande à 1732 cm^{-1} du groupement C=O de la chaîne acyle. Markowitz *et coll.* ont déjà observé ce phénomène pour un mélange contenant de la PC mis en présence d'or⁹¹ : la bande C=O glisse de 1741 cm^{-1} à 1711 cm^{-1} . Ils expliquent cela par une association entre les chaînes acyles des PC et l'or par l'intermédiaire du groupement C=O.

La tête polaire est elle aussi affectée puisque nous observons (**figure 2.8a**) :

- un glissement de la bande des élongations de P-O, de 1230 cm^{-1} vers 1207 cm^{-1} ,
- l'apparition de plusieurs bandes vers 1300 cm^{-1} , région correspondant au groupe PO_4^- ,
- un léger glissement de la bande des déformations du groupe $\text{N}(\text{CH}_3)_3^+$, de 970 cm^{-1} vers 974 cm^{-1} .

Ces changements dans les bandes de vibrations des groupements phosphate et triméthylammonium peuvent provenir d'une modification de la répartition des électrons de ces groupements au voisinage des atomes d'or. Pour les groupes phosphate, de nouvelles bandes apparaissant à des fréquences plus élevées suggèrent l'établissement de liaison P-O avec un caractère de double liaison plus prononcé : par exemple, la fréquence de P-O peut augmenter de 1261 à 1290 et 1415 cm^{-1} pour POBr_3 , POCl_3 , et POF_3 respectivement⁹⁸.

La bande détectée à 970 cm^{-1} correspond à l'élongation antisymétrique des liaisons C-N dans le groupement triméthylammonium (**figure 2.8a**). Le voisinage d'atomes d'or peut modifier localement la densité électronique autant que la géométrie de groupe : ces deux facteurs sont susceptibles de conduire à un glissement de fréquence vibrationnelle en changeant la constante de force et les interactions de couplage.

Si des interactions or-PC ont été détectées, aucune modification chimique provenant de l'oxydation de l'un des groupements de la PC n'a donc été observée. Afin de comprendre pourquoi des nanoparticules d'or se forment en présence de S100 seul, nous avons hydraté par

le sel d'or des lipides de structure proche de celle du S100 et observé les changements de couleur des pâtes formées (**tableau 2.1**).

Le S100 étant un mélange commercial de lipides, il peut contenir des impuretés (d'autres molécules que les phosphatidylcholines) qui pourraient être responsables de la réduction. C'est pourquoi nous avons testé le mélange KAuCl_4 avec POPC (1-palmitoyl-2-oléoyl-sn-glycero-3-phosphatidylcholine), qui est une phosphatidylcholine pure, contenant une chaîne insaturée à 18 carbones et une chaîne saturée à 16 carbones. Le mélange devient bleu-gris au bout de 5h, éliminant ainsi l'hypothèse de l'intervention unique des impuretés du mélange lipidique dans la réduction. D'autre part, lorsque le DPPA (acide dipalmitoylphosphatidique), phospholipide ne contenant pas de groupement $\text{N}(\text{CH}_3)_3^+$, est mélangé au sel d'or à 10^{-3}M , aucun changement de couleur n'est observé (**tableau 2.1**). Nous pouvons donc dire que les groupements triméthylammonium interviennent dans le processus de synthèse des particules d'or. Des observations concernant la cinétique d'apparition du changement de couleur laissent penser que les groupements triméthylammonium agissent comme catalyseur de la réduction. En effet, pour le même rapport molaire $\text{Au}(+\text{III})/\text{monooléine}$, l'échantillon monooléine/sel d'or change de couleur en 5h alors qu'il se fait en seulement 10min pour PC-monooléine/sel d'or.

Nous avons donc mis en évidence le rôle de catalyseur de la PC, mais nous ne savons pas comment la réduction se produit en absence de monooléine. Le retard dans le changement de couleur pour l'échantillon PC/sel d'or à l'abri de la lumière laisse supposer l'intervention des rayons UV dans la réduction, comme nous allons le voir dans la partie I-C.

L'analyse infrarouge développée dans les parties I-A et I-B nous a donc permis de dégager les groupements-clé de la bicouche intervenant dans la réduction des ions précurseurs, à savoir l'un des groupements OH de la monooléine (réducteur) et le groupement triméthylammonium de la PC (catalyseur). Ces résultats nous ont permis de proposer un mécanisme de réduction.

C- Mécanisme de réduction de $\text{Au}(+\text{III})$ en $\text{Au}(0)$

La formation de clusters d'or, que ce soit par réduction chimique, par photoréduction UV ou par radiolyse γ , est décrite par Gachard *et coll.*⁹⁹. Elle se décompose en trois étapes :

- réduction de Au(III) en Au(II)
- dismutation de Au(II) en Au(III) et Au(I)
- dismutation de Au(I) en Au(0) et Au(II)

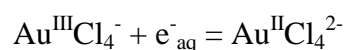
Nous nous appuyons sur cet article et sur nos résultats pour proposer le mécanisme de réduction de Au(III) dans notre système.

Première étape :

Les ions Cl^- présents dans AuCl_4^- peuvent permettre de créer un électron solvate par photodétachement lorsqu'ils sont exposés à la lumière :

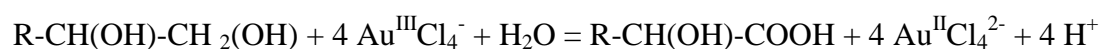


Les ions Au(III) peuvent capter les électrons ainsi produits pour être réduits en Au(II) :



Nous pensons que cette première étape peut se faire par intervention des rayons UV dans notre cas, puisque tous les échantillons ont été exposés à la lumière. De plus, nous avons noté que dans le cas de l'hydratation de PC/sel d'or (PC seule) à l'abri de la lumière, le changement de couleur est retardé (**tableau 2.1**).

Dans les cas où la formulation comporte de la monooléine, les ions Au(II) sont également produits par réduction chimique comme l'ont montré les analyses IR :



Il est à noter que le pH de la solution passe de 5.2 à 3.6 après synthèse des particules, allant dans le sens de la réaction proposée.

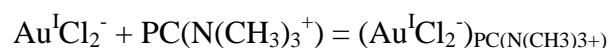
Deuxième étape : dismutation de Au(II) en Au(I) et Au(III)

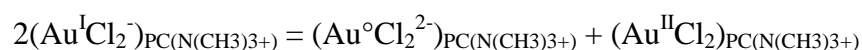
Cette étape est spontanée et rapide, les ions Au(II) étant instables :



Troisième étape : dismutation de Au(I) en Au(II) et Au(0)

Gachard *et coll.*⁹⁹ ont montré que les ions Au(I) s'accumulent et la dismutation de Au(I) en Au(II) et Au(0) est fortement retardée, à moins que Au(I) ne soit complexé par des ligands. L'analyse IR et les résultats obtenus sur le DPPA nous ont montré que la PC a un effet catalytique via ses groupements $\text{N}(\text{CH}_3)_3^+$. On peut donc penser que ce groupement va complexer Au(I) pour finalement accélérer sa dismutation :





La cinétique de réduction de Au(III) en Au(0) est principalement gouvernée par l'étape de dismutation de Au(I) en Au(0) et Au(II)⁹⁹.

Ainsi les espèces Au(I) résultent de la dismutation de Au(II). Les ions Au(II) peuvent être produits par une réduction photo-induite ou par une réduction chimique des ions $\text{Au}^{\text{III}}\text{Cl}_4^-$. La voie chimique a lieu pour les échantillons contenant de la monooléine. La voie photochimique se produit pour tous les échantillons, et elle apparaît comme la meilleure explication pour les échantillons ne contenant pas de monooléine. La dismutation des espèces Au(I) est un procédé lent, qui peut être accéléré par complexation des ions Au(I) par des ligands particuliers, ce qui semble être le cas ici via les groupements $\text{N}(\text{CH}_3)_3^+$ des PC.

II- Stratégies utilisées pour la préparation d'hybrides oignon/nanoparticules d'or

Nous venons de montrer que l'agent réducteur des ions AuCl_4^- est inclus dans les bicouches des oignons, puisque c'est la monooléine. Ceci permet d'envisager deux stratégies de préparation de l'hybride oignon/nanoparticules d'or : l'une où les ions précurseurs AuCl_4^- diffusent du milieu dispersant vers l'intérieur de l'oignon pour y être réduits (« méthode de diffusion »), l'autre où les ions précurseurs sont directement encapsulés dans les oignons où ils seront réduits. Chacune de ces méthodes présente des avantages et des inconvénients que nous détaillerons par la suite. Nous présenterons les résultats caractérisant les particules d'or obtenues via la méthode de diffusion dans la partie III, et ceux concernant la méthode d'encapsulation des ions AuCl_4^- dans la phase lamellaire cisailée dans la partie IV.

A- Diffusion des ions précurseurs

1. Principe

Le mélange lipide-tensioactif (phosphatidylcholine-monooléine) est hydraté par de l'eau ultra-pure et laissé reposé 3 jours pour former la phase lamellaire (*figure 2.9a*). Celle-ci est ensuite

soumise à un cisaillement en cellule de Couette (1 minute, 250 tours/minute). On obtient ainsi des oignons « compactés », sous forme de pâte (**figure 2.9b**). Cette pâte est ensuite dispersée dans une solution de sel d'or KAuCl_4 (10^{-3}M) : on obtient alors des oignons isolés les uns des autres en solution (**figure 2.9c**). Le sel d'or diffuse au travers des bicouches du milieu dispersant vers l'intérieur des oignons, afin d'équilibrer les potentiels chimiques du sel d'or externe/interne. Les particules d'or se forment au bout de quelques heures (temps d'incubation de 1h minimum) et la dispersion devient rouge.

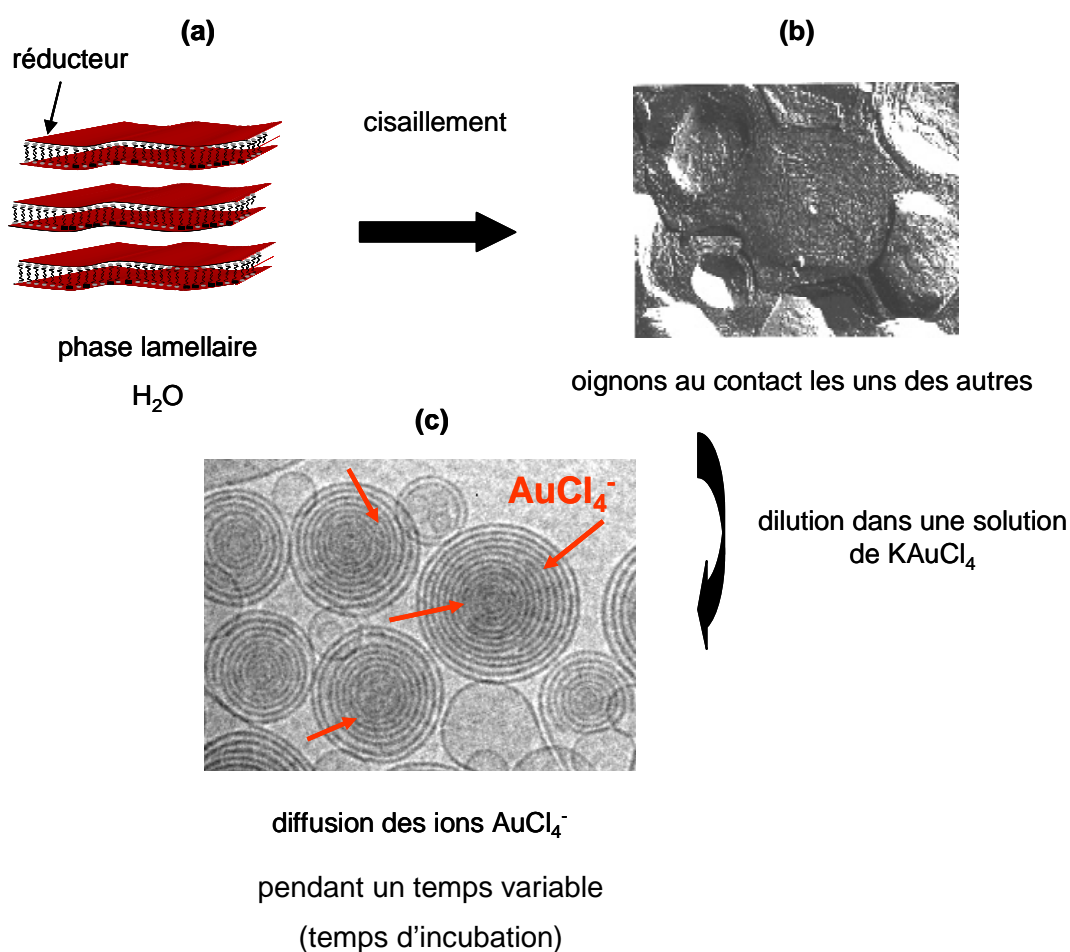


Figure 2.9 : Principe de préparation d'hybrides oignon/nanoparticules d'or par la méthode de diffusion des ions précurseurs : (a) phase lamellaire hydratée par l'eau distillée ; (b) image de MEB d'une phase lamellaire cisailée après cryo-fracture ; (c) image de cryo-MET d'une dispersion d'oignons

2. Avantages et inconvénients de la méthode

Afin d'obtenir des particules homogènes en taille, nous avons vu que les phases de nucléation et de croissance doivent être nettement séparées du point de vue cinétique. La concentration en précurseurs apparaît en fait comme le paramètre déterminant : elle doit être dans un premier temps bien supérieure au seuil critique pour provoquer la nucléation, puis elle doit se maintenir au niveau de ce seuil pour qu'il y ait simplement croissance des germes.

Ainsi contrôler la concentration en précurseurs est un élément-clé pour obtenir une distribution de taille des particules étroite. La diffusion des ions précurseurs au travers des bicouches lipidiques peut constituer un moyen de contrôler ce paramètre. En effet, la concentration en ions AuCl_4^- (donc en précurseurs Au(0)) à l'intérieur de l'oignon va augmenter progressivement jusqu'à finalement atteindre la sursaturation. Les germes formés pourront alors croître par l'alimentation lente imposée par les bicouches. Cette stratégie de synthèse des nanoparticules permet finalement de séparer les phases de nucléation et de croissance.

Toutefois, une polydispersité en taille des particules est à craindre. En effet, l'ion AuCl_4^- étant un gros anion, sa capacité à diffuser est faible. Nous pouvons donc penser que la diffusion des ions précurseurs vers les couches internes de l'oignon va être d'autant plus limitée et ralentie par la succession des bicouches. La concentration de sursaturation en précurseurs sera donc atteinte dans les couches internes bien après que la nucléation n'a eu lieu dans les couches externes de l'oignon. Les nuclei des couches externes vont donc croître pendant que ceux des couches internes se forment. Les particules ayant poussé dans les couches externes devraient donc être plus grosses que celles des couches internes.

Il existe également un risque de croissance non contrôlée des particules menant à la déstructuration de l'oignon. Notons que le contrôle de la croissance des particules est d'autant plus difficile que le rapport nombre de AuCl_4^- / nombre de groupements réducteurs n'est pas connu et contrôlé.

Une synthèse extra-vésiculaire est également possible à la surface des oignons.

Par cette méthode, une population de particules polydisperse à la fois en taille (à cause de la faible capacité à diffuser des ions AuCl_4^-) et en morphologie (à cause de la possibilité d'une synthèse extra-vésiculaire) est donc attendue.

B- Encapsulation des ions précurseurs

Dans une seconde approche, nous avons utilisé les propriétés d'encapsulation de la phase lamellaire cisailée pour la synthèse des nanoparticules d'or.

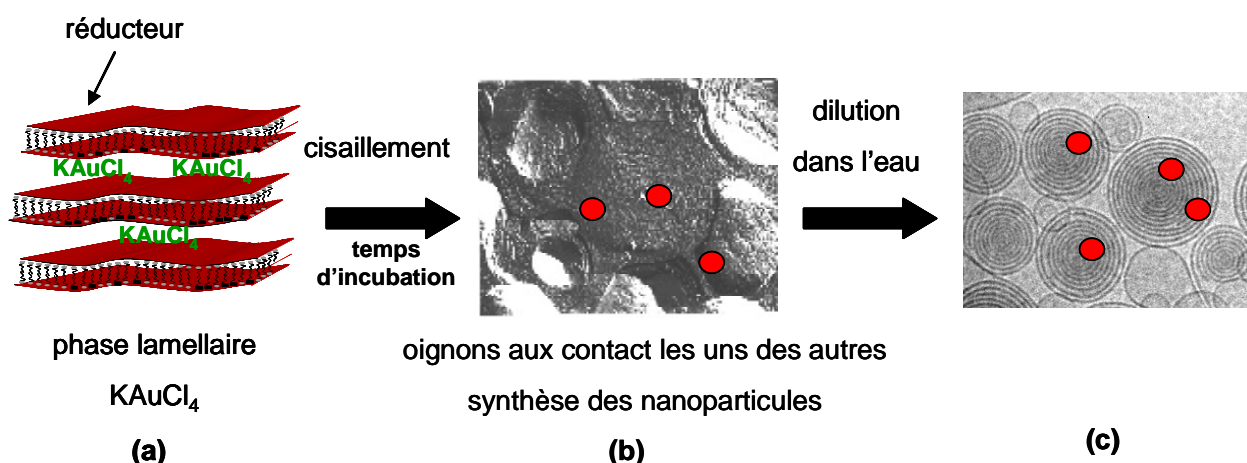


Figure 2.10 : Principe de préparation d'hybrides oignon/nanoparticules d'or par la méthode d'encapsulation des ions précurseurs : (a) phase lamellaire hydratée par le sel d'or ; (b) image de MEB d'oignons après cryo-fracture ; (c) image de cryo-MET d'une dispersion d'oignons
Les nanoparticules d'or sont symbolisées par des cercles rouges.

1. Principe

Le mélange lipide-tensioactifs (phosphatidylcholine-monooléine ou phosphatidylcholine-octadecylamine-monooléine) est cette fois hydraté directement par le sel précurseur KAuCl_4 (10^{-3}M ou 10^{-2}M) (*figure 2.10a*). La phase lamellaire est ensuite cisailée durant 1 minute dans une cellule de Couette, à 250 tours/minute. La synthèse des précurseurs $\text{Au}(0)$, et donc des particules d'or se fait à ce niveau de la préparation puisque le réducteur est l'un des composants de l'oignon (*figure 2.10b*). La pâte (phase lamellaire cisailée) va changer de couleur au bout de quelques minutes ou quelques jours (temps d'incubation) suivant la formulation des oignons (composition des bicouches ou concentration en ions précurseurs introduite, voir partie IV). La pâte colorée est ensuite dispersée dans de l'eau ultra-pure afin d'obtenir une dispersion dans l'eau d'oignons contenant des particules d'or (*figure 2.10c*).

2. Avantages et inconvénients de la méthode

L'avantage de ce procédé réside dans la présence initiale des ions précurseurs dans la phase lamellaire cisailée. En effet, tous les ions AuCl_4^- sont localisés entre les bicouches où se situe le groupement responsable de leur réduction en précurseurs $\text{Au}(0)$. Le rapport ions précurseurs/groupements réducteurs pour l'oignon est donc connu. La croissance des particules peut ainsi être davantage contrôlée via la quantité d'ions AuCl_4^- introduite.

De plus, la concentration en ions précurseurs introduite est identique dans tous les compartiments de l'oignon. L'encapsulation des ions AuCl_4^- au sein de la phase lamellaire cisailée permet ainsi d'éviter le phénomène de « nucléation retardée » dans les couches internes de l'oignon, possible inconvénient de la méthode de diffusion. La concentration de sursaturation est atteinte au même moment partout dans la vésicule : nous pouvons donc penser qu'une seule nucléation se produit. Mais ici les phases de nucléation et de croissance peuvent avoir lieu de façon simultanée et conduire ainsi à une population polydisperse en taille.

D'autre part, cette méthode permet d'éviter la synthèse extra-vésiculaire. Très peu d'ions métalliques se trouve dans le milieu dispersant une fois les oignons dilués, ceux-ci ayant été réduits au sein de la phase lamellaire cisailée. Aucune synthèse ne peut donc se faire à la surface de l'oignon.

Cette méthode devrait permettre de former une population homogène du point de vue morphologique puisque la synthèse des particules ne peut se faire qu'à l'intérieur des oignons. Quant à l'homogénéité de la distribution en taille des particules, elle dépendra de la séparation (ou non) des phases de nucléation et de croissance.

III- Formation de nanoparticules d'or par diffusion des ions précurseurs

Une étude précédente sur la formation de nanoparticules d'or par diffusion des ions précurseurs a été réalisée dans l'équipe^{64,100}. Cette étude n'a pas fait partie de ce travail de

thèse. Cependant, afin de pouvoir comparer les deux méthodes de synthèse de l'hybride, les principaux résultats seront présentés. L'étude s'appuie sur des analyses par spectroscopie UV-visible et des observations par microscopie électronique en transmission (MET) et par cryo-MET des hybrides oignon/nanoparticules d'or formés.

A- Mise en évidence de la synthèse des nanoparticules d'or

Après formation des oignons par hydratation de la phase lamellaire avec de l'eau distillée et dispersion dans une solution de sel d'or, un temps d'incubation est nécessaire pour synthétiser les nanoparticules d'or. Cette synthèse s'accompagne d'un changement de couleur des dispersions qu'il est possible de suivre par spectroscopie UV-visible. La figure 2.11 présente l'évolution des courbes représentant l'absorbance en fonction de la longueur d'onde, avec le temps d'incubation de la dispersion d'oignons : de 17 min pour la courbe (a), à 135 min pour la courbe (g).

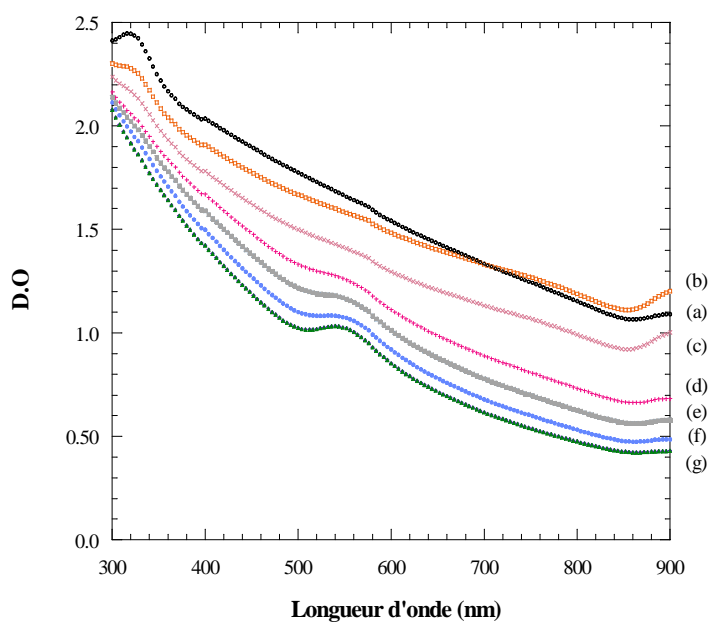


Figure 2.11 : Spectres UV-visible de dispersions d'oignons après différents temps d'incubation : (a) 17, (b) 26, (c) 43, (d) 60, (e) 75, (f) 100, (g) 135 min (d'après [64])

Une diminution progressive de la bande d'absorption à 320 nm a lieu entre 17 et 60 min, pour disparaître complètement au bout de 75 min. Cette diminution est due à des transferts de charges au sein de l'ion AuCl_4^- . Ce phénomène s'accompagne de l'apparition d'une bande d'absorption à 550 nm après 43 min d'incubation, correspondant à la bande de résonance plasmon de surface des nanoparticules d'or, nettement visible sur la courbe (g) (temps d'incubation de 135 min). Le spectre reste inchangé pour des temps d'incubation plus longs que 135 min.

Ainsi la formation de nanoparticules d'or au sein d'oignons dispersés dans la solution contenant les ions AuCl_4^- est mise en évidence par l'apparition de la bande de résonance plasmon de surface.

B- Morphologie des particules formées

Les observations par MET ont permis de connaître la taille des particules formées, ainsi que leur morphologie. Les particules sont polydisperses à la fois en taille et en forme (*figure 2.12*).

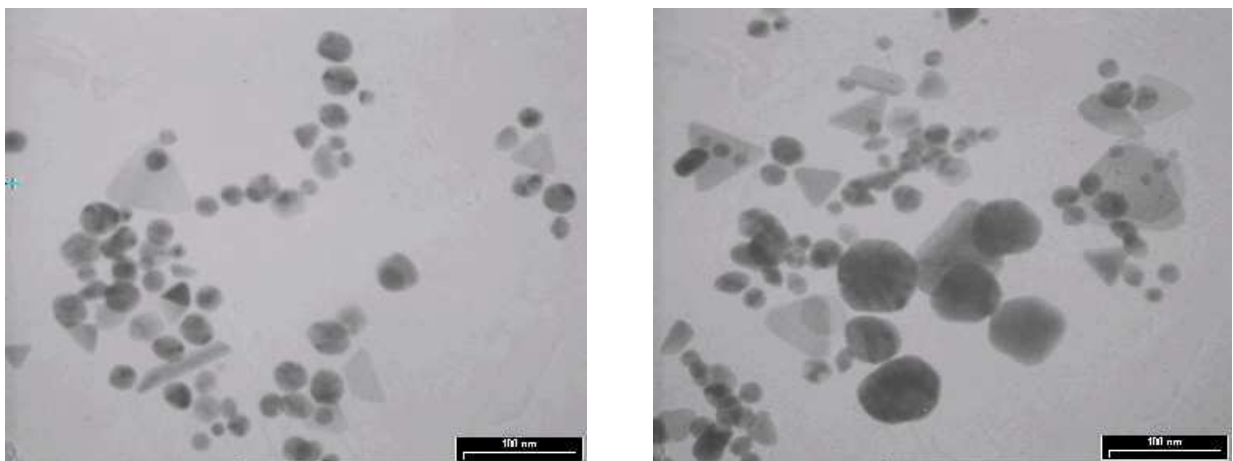


Figure 2.12 : Particules d'or formées par la méthode de diffusion des ions précurseurs (d'après [64])

La taille des particules varie de 8 à 105 nm. Le diamètre important des particules (bien supérieur à l'espace interlamellaire qui est de 2 nm) et la diversité des morphologies laissent

penser que la croissance des nanoparticules d'or n'est pas contrôlée par le confinement des bicouches des oignons. De plus, la diversité de morphologies indique l'existence d'une croissance extra-vésiculaire des particules. Des morphologies classiques des nanoparticules d'or sont observées : des particules quasi-sphériques, « allongées », triangulaires, hexagonales, décahédrales, caractéristiques d'une croissance non confinée.

C- Stabilité de l'hybride oignon/nanoparticules d'or

Les observations par cryo-MET ont permis de visualiser l'arrangement des bicouches lipidiques après croissance des nanoparticules d'or (*figure 2.13*).

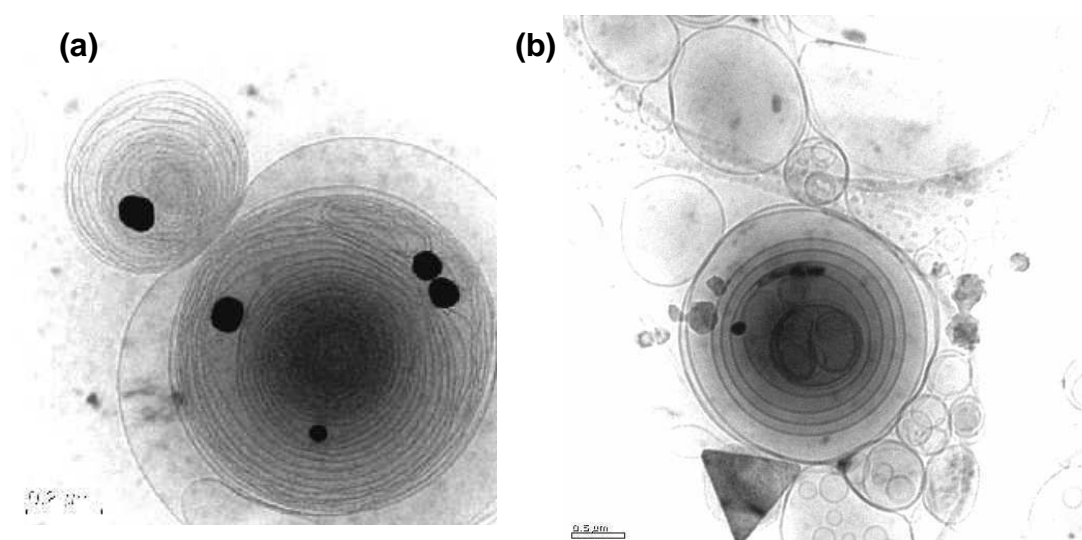


Figure 2.13 : Images de cryo-MET d'hybrides oignon/nanoparticules d'or, après 12h d'incubation, formés par la méthode de diffusion des ions précurseurs (d'après [64])

Un très faible nombre d'hybrides oignon/nanoparticules d'or a été observé. Les particules d'or ont un diamètre assez élevé, compris entre 80 et 100 nm (*figure 2.13a*). Elles sont localisées principalement dans les couches externes des oignons. D'autre part, sur la figure

2.13b une particule triangulaire est présente, mettant en évidence une synthèse extra-vésiculaire.

D- Conclusion

La diffusion des ions précurseurs AuCl_4^- , de grosse taille, au travers des bicouches lipidiques entraîne la formation de particules d'or dans les couches externes des oignons principalement.

Cette méthode de synthèse ne permet donc pas d'obtenir des hybrides oignon/nanoparticules d'or stables puisque le confinement des nuclei entre les bicouches ne suffit pas à limiter leur croissance. Les particules, trop grosses, provoquent une déstructuration locale des bicouches lipidiques pour mener finalement à la destruction des oignons.

Nous allons maintenant détailler les résultats concernant la préparation des hybrides par encapsulation des ions AuCl_4^- au sein de la phase lamellaire, méthode plus prometteuse que la diffusion en terme de stabilité de l'hybride oignon/nanoparticules d'or.

IV- Formation de nanoparticules d'or par encapsulation des ions précurseurs

A- Réduction chimique

Les articles des références [89] et [101] regroupent les résultats exposés dans cette partie.

Plusieurs formulations ont été testées afin de mettre en évidence une éventuelle influence de la composition des bicouches des oignons et de la concentration de la solution de sel d'or introduite sur la taille et la morphologie des particules d'or synthétisées (*tableau 2.2*). L'influence du vieillissement des oignons a également été étudiée.

Formulation des bicouches	PC (% molaire)	Octadécylamine (ODA) (% molaire)	Monooléine (% molaire)	Concentration en KAuCl_4 (mol/L)	Age des pâtes analysées (jours)
PC-monooléine	90	-	10	10^{-3}	1 et 21
	75	-	25	10^{-3}	
	90	-	10	10^{-2}	
	75	-	25	10^{-2}	
PC-ODA-monooléine	75	10	15	10^{-3}	5 et 21
	70	15	15	10^{-3}	
	75	15	10	10^{-3}	
	65	15	20	10^{-3}	
	75	10	15	10^{-2}	5 et 6
	70	15	15	10^{-2}	5
	75	15	10	10^{-2}	5 et 6
	65	15	20	10^{-2}	5 et 6

Tableau 2.2 : Récapitulatif des différentes formulations testées

Nous verrons que de simples observations macroscopiques des échantillons nous permettent de savoir si la synthèse des nanoparticules d'or au sein des oignons a eu lieu, synthèse confirmée par la spectroscopie UV-visible. Puis nous montrerons l'effet d'une modification de la composition chimique des bicouches des oignons sur la distribution en taille des particules, en nous basant sur des observations par microscopie électronique en transmission (MET). Nous aborderons ensuite les différentes morphologies de particules observées : des particules sphériques et des dendrites. Nous discuterons de l'influence de la composition des bicouches, de la concentration en ions précurseurs introduite et du vieillissement sur l'apparition et l'évolution de ces différentes morphologies de particules. A partir de cette discussion et des données de la littérature, nous ferons l'hypothèse d'un « mécanisme » de croissance des structures dendritiques observées par MET et par cryo-MET. Enfin nous étudierons la structuration de la phase lamellaire en présence des particules en nous basant sur des analyses par diffraction des rayons X aux moyens angles et nous verrons la stabilité des hybrides oignon/nanoparticules d'or par cryo-MET.

Le tableau 2.3 résume les changements de couleur des pâtes (phases lamellaires cisillées), le temps d'apparition de la couleur définitive, ainsi que les observations de MET pour les différentes formulations caractérisées.

[KAuCl ₄]	Composition des bicouches	Couleur + temps d'apparition de la couleur	Forme des particules (MET)	Diamètre moyen des particules
10 ⁻³ M	PC-monooléine	rose - 20min	particules sphériques	20 nm
	PC-ODA-monooléine	vert - 5 jours	quelques particules sphériques et beaucoup de dendrites	5 nm
10 ⁻² M	PC-monooléine	rose - 20min	particules sphériques	20 nm
	PC-ODA-monooléine	violet - 5 jours	particules sphériques	5 nm

Tableau 2.3 : Couleur, morphologie et taille des particules en fonction de la composition de la phase lamellaire cisailée

Ce tableau va constituer une base d'informations pour ce qui suit.

1. Mise en évidence de la synthèse des nanoparticules d'or

Les observations macroscopiques des échantillons nous permettent de constater la formation des nanoparticules d'or via un changement de couleur des pâtes (phases lamellaires cisillées). Ceci traduit les interactions électroniques de surface entre les particules d'or qui se manifestent par l'apparition d'une bande de résonance plasmon de surface en spectroscopie UV-visible. La figure 2.14 présente les différentes couleurs observées pour nos échantillons : ils passent du jaune pâle au rose, violet ou vert suivant les formulations. Nous verrons dans la partie IV-A-3 que chaque couleur correspond à une morphologie de particule.

La figure 2.15 présente deux exemples de spectres d'absorption UV-visible obtenus sur des dispersions d'oignons de formulation PC-monooléine 75-25 (%mol) et PC-ODA-monooléine 70-15-15 (%mol) hydratés par une solution de sel d'or à 10⁻³M.

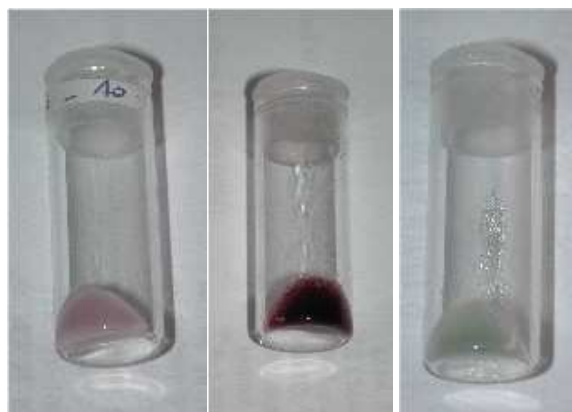


Figure 2.14 : Les différentes couleurs observées sur les pâtes :

(a) PC-monooléine / $[\text{KAuCl}_4]=10^{-3}\text{M}$; (b) PC-monooléine-ODA / $[\text{KAuCl}_4]=10^{-2}\text{M}$; (c) PC-monooléine-ODA / $[\text{KAuCl}_4]=10^{-3}\text{M}$

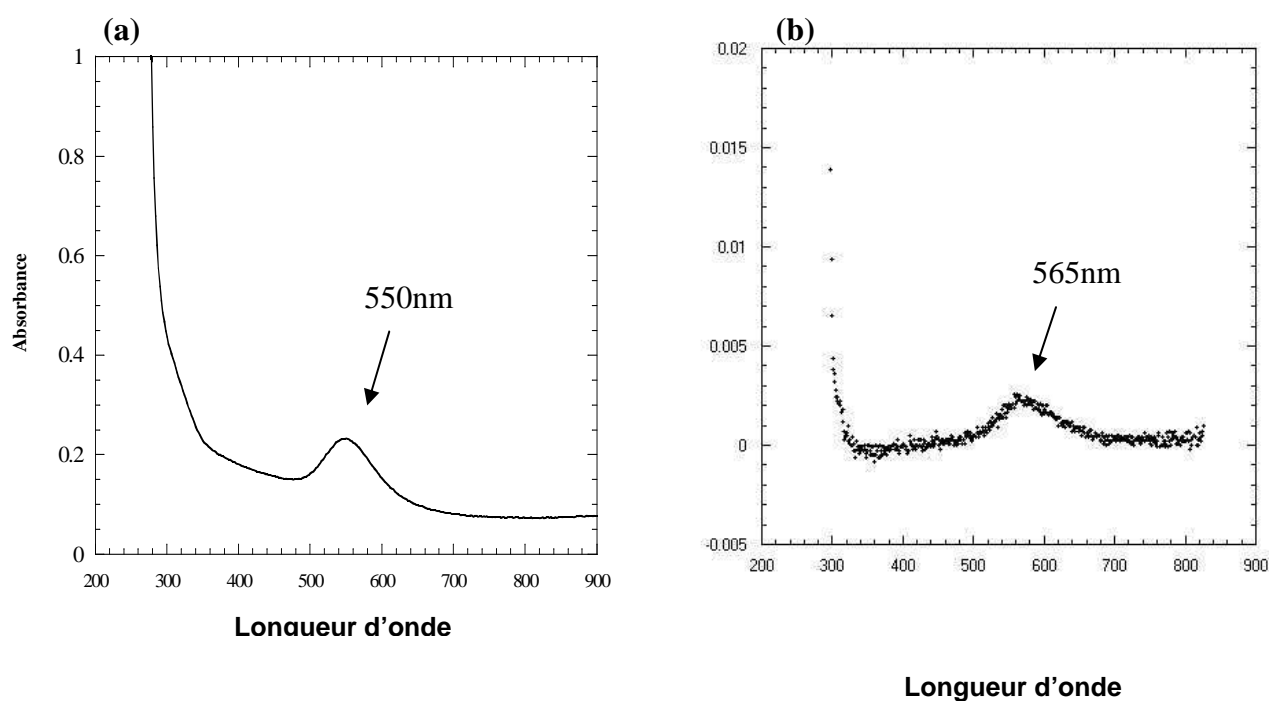


Figure 2.15 : Spectre UV-visible de la dispersion d'oignons de formulation

(a) PC-monooléine 75-25 (%mol) / $[\text{KAuCl}_4] = 10^{-3}\text{M}$ et
 (b) PC-ODA-monooléine 75-10-15 (%mol) / $[\text{KAuCl}_4]=10^{-3}\text{M}$

La bande de résonance plasmon de surface est située à 550nm pour PC-monooléine/[KAuCl₄]=10⁻³M (échantillon rose) (*figure 2.15a*), valeur classique pour des nanoparticules d'or⁶⁶. Elle confirme leur présence dans la dispersion d'oignons. Pour PC-ODA-monooléine/[KAuCl₄]=10⁻³M (échantillon vert), la bande d'absorption est décalée vers les grandes longueurs d'onde, à 565nm (*figure 2.15b*). Un changement dans la forme des particules peut expliquer ce déplacement de la bande plasmon vers les grandes longueurs d'onde, comme nous le verrons dans la partie IV-A-3.

2. Contrôle de la taille des particules via la composition des bicouches

La synthèse de particules nanométriques de taille et de morphologie contrôlées reste un enjeu essentiel pour les diverses applications envisagées de ces matériaux. Dans notre cas, nous avons vu que ce contrôle ne peut pas être simplement apporté par le confinement. En effet, les résultats de l'étude précédente sur la méthode d'introduction des ions précurseurs par diffusion montrent que les particules grossissent au point de détruire les oignons⁶⁴.

Nous pouvons néanmoins induire un contrôle de la croissance des particules via les bicouches, en introduisant dans celles-ci des groupements chimiques ayant une forte affinité pour Au(0). Ils vont permettre de limiter la croissance des particules en limitant la diffusion des précurseurs Au(0). Les groupements chimiques mis en jeu sont des groupements NH₂ via une molécule à 18 carbones, l'octadécylamine ODA. Les groupements amine primaire sont connus pour présenter une forte affinité électronique pour l'or à l'état métallique¹⁰².

Afin de mettre en évidence l'effet de l'insertion du groupement NH₂ dans les bicouches, nous nous sommes intéressés plus particulièrement aux formulations d'oignons hydratés par une solution de sel d'or à 10⁻²M car, pour cette concentration, seules des particules d'or sont formées (pas de dendrites) (*tableau 2.3*). Une étude statistique des tailles de particules obtenues a été réalisée à partir des images de MET (*figure 2.16*).

Pour les formulations PC-monooléine (voir *tableau 2.2* pour le détail des compositions), les particules sont peu nombreuses et très polydisperses en taille (moyenne : 20 ± 13 nm). Il apparaît clairement sur la figure 2.16 que l'insertion d'un groupement amine primaire dans les

bicouches resserre la distribution en taille et la déplace vers les plus petites particules (moyenne : 5 ± 2 nm).

Le contrôle de la taille des particules peut donc être réalisé via les groupements amine, mais nous allons voir que ces groupements chimiques ont également une influence sur le mode de croissance des clusters de Au(0).

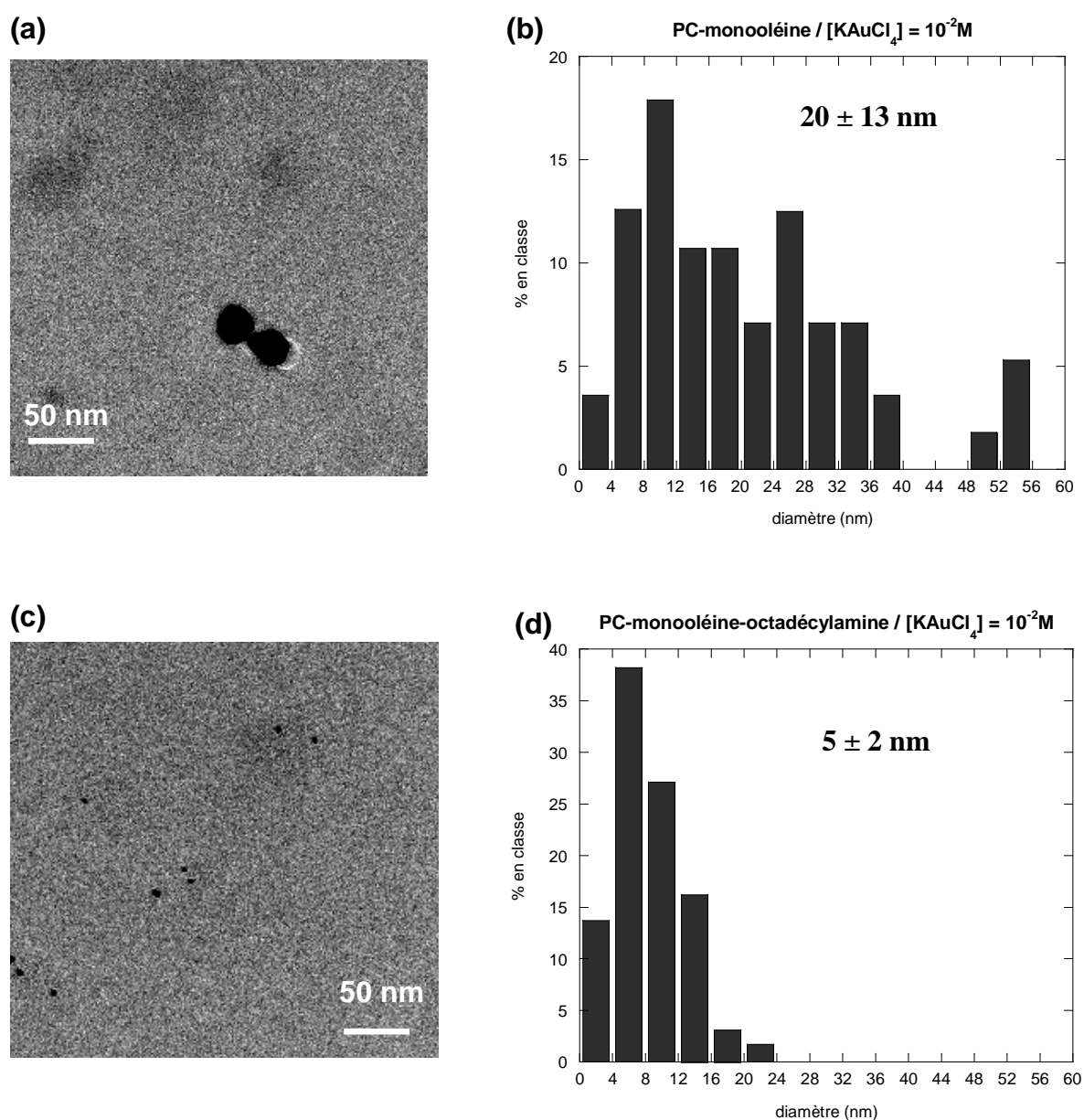


Figure 2.16 : Images de MET représentatives des particules obtenues (a) sans NH_2 ; (c) avec NH_2 et distribution en taille des particules d'or obtenues (b) sur toutes les formulations PC-monooléine (sur 56 particules) ; (d) sur toutes les formulations PC-ODA-monooléine (sur 517 particules)

3. Différentes morphologies de particules observées

Nous avons vu que les interactions entre les particules d'or se manifestent par l'apparition d'une bande de résonance plasmon de surface, celle-ci provoquant un changement de couleur de l'échantillon. Il est connu que la position de la bande plasmon (donc le changement de couleur) dépend de la taille des particules, mais aussi de leur forme⁶⁶. Par exemple, des suspensions contenant des particules sphériques de 5 nm de diamètre sont rouges, alors que des suspensions contenant des bâtonnets de 40 nm de long apparaissent vertes⁶⁸. Ici, nous constatons un déplacement de la bande de résonance plasmon de 550 nm pour des échantillons roses, à 565 nm pour des échantillons verts (*figure 2.15*).

D'après le tableau 2.3, dans notre cas les échantillons deviennent roses, violets ou verts selon les formulations (*figure 2.14*), ce qui laisse supposer la formation de particules de taille et de morphologie différentes. La microscopie électronique en transmission nous a permis de confirmer cette hypothèse puisque nous observons deux types de structures des clusters d'or (*tableau 2.3*) :

- une morphologie dendritique, en 2D, sur les échantillons verts
- des particules sphériques sur les échantillons roses ou violets

Le tableau 2.3 permet de dégager deux paramètres gouvernant le développement de ces morphologies : la composition des bicouches et la concentration en ions précurseurs. Le vieillissement des particules est aussi un facteur à prendre en compte : nous verrons qu'il modifie sensiblement les caractéristiques des particules obtenues.

a)- Influence de la composition des bicouches

L'étude du mécanisme de réduction nous a montré que les constituants des bicouches jouent un rôle essentiel dans la génération des précurseurs Au(0), que ce soit en tant qu'agent réducteur (monooléine) ou en tant que catalyseur (PC) (partie I). Des interactions chimiques entre les clusters d'or et certains groupements chimiques de la bicouche ont été mises en évidence par spectroscopie infrarouge. Les étapes de nucléation et de croissance des particules vont donc fortement dépendre de la composition des bicouches lipidiques.

Afin de mettre en évidence cet effet, nous avons choisi d'étudier plus particulièrement les échantillons hydratés par une solution de sel d'or à 10^{-3}M .

Les formulations PC-monooléine permettent de former uniquement des particules quasi sphériques. La figure 2.17 montre des clichés MET représentatifs de ces échantillons.

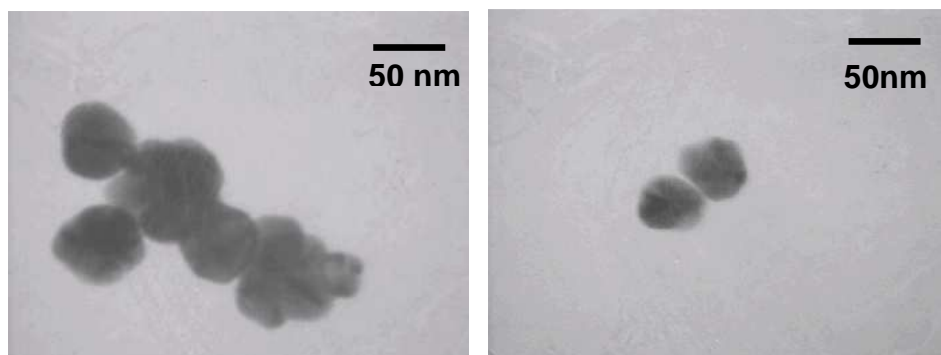


Figure 2.17 : Particules d'or quasi sphériques (PC-monooléine 90-10 / $[\text{KAuCl}_4]=10^{-3}\text{M}$)

L'insertion d'un groupement amine primaire dans les bicouches hydratées par une solution de sel d'or à 10^{-3}M induit une croissance dendritique des clusters d'or, en deux dimensions (formulations PC-ODA-monooléine, *tableau 2.3* et *figure 2.18*).

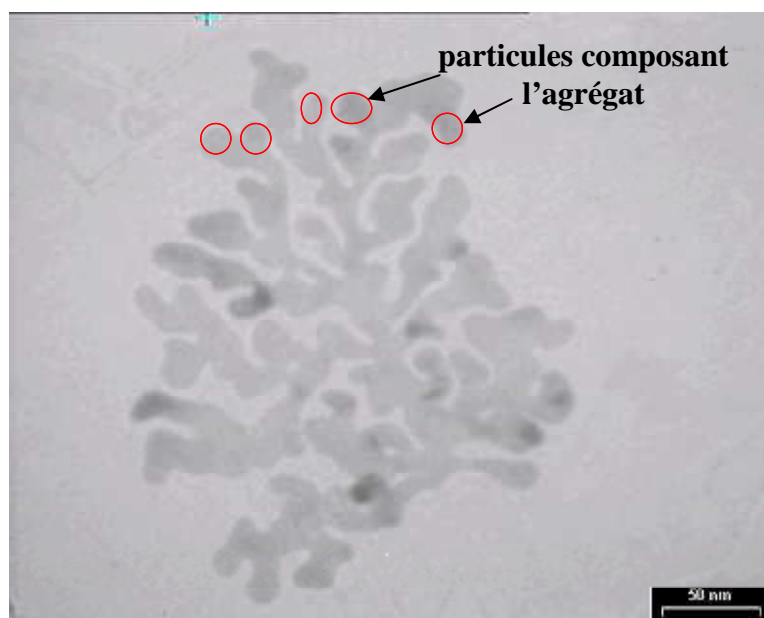


Figure 2.18 : Structure dendritique d'or : croissance en 2D
(PC-ODA-monooléine 70-15-15 / $[\text{KAuCl}_4]=10^{-3}\text{M}$)

Afin de savoir si ces dendrites sont de type fractal, nous avons compté le nombre de particules N d'un certain rayon R qui composent l'agrégat présenté dans la figure 2.18. Pour les structures fractales, la relation $N(R) \approx R^D$ avec D dimension fractale de l'agrégat doit être vérifiée¹⁰³ : c'est la méthode de distribution de la masse radiale. En traçant $\ln N(R)$ en fonction de $\ln R$ pour la structure dendritique de la figure 2.18, on obtient une droite de pente $D = 1.8$ (figure 2.19).

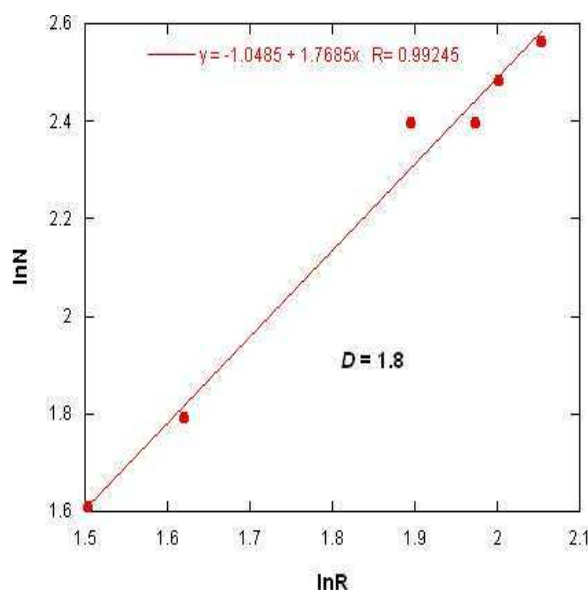


Figure 2.19 : Détermination de la dimension fractale des agrégats dendritiques sur l'échantillon PC-ODA-monooléine 70-15-15 / $[\text{KAuCl}_4]=10^{-3}\text{M}$ par la méthode de distribution de masse radiale

Ce type de structure dendritique a déjà été décrit dans la littérature et il est connu comme le produit d'un mécanisme d'agrégation des colloïdes¹⁰⁴. La valeur de la dimension fractale renseigne sur le mécanisme mis en jeu. En effet, deux régimes limitant de l'agrégation irréversible des colloïdes ont été identifiés¹⁰⁵. Dans le premier, les forces répulsives entre les particules colloïdales sont négligeables, de sorte que la vitesse d'agrégation est limitée seulement par le temps que mettent les clusters à se rencontrer, par diffusion. C'est l'agrégation limitée par la diffusion (DLCA, diffusion-limited colloid aggregation). Les dendrites issues de ce type d'agrégation ont une dimension fractale $D < 2$. Dans le deuxième régime, les forces répulsives ne sont pas négligeables mais pas insurmontables : la vitesse d'agrégation n'est limitée que par le temps que mettent deux clusters à surmonter la barrière

répulsive par activation thermique. C'est l'agrégation limitée par la réactivité (RLCA, reaction-limited colloid aggregation), qui donne lieu à des agrégats de dimension fractale $D > 2$. Les dendrites sont plus « compactes » que celles issues de la DLCA.

Dans notre cas, les dendrites semblent être générées par DLCA puisque la dimension fractale est inférieure à 2 ($D = 1.8$).

Ainsi l'insertion de groupements amine primaire dans les bicouches des oignons a deux effets sur les structures d'or formées. Le premier est la limitation de la croissance des particules en utilisant la forte affinité existant entre les clusters d'or et les NH_2 , comme nous l'avons démontré au paragraphe IV-A-2. Le deuxième vient d'être décrit ici : l'agrégation des clusters d'or est confinée à deux dimensions, engendrant la formation de structures dendritiques de type fractale. Là aussi, les interactions privilégiées entre $\text{Au}(0)$ et NH_2 permettent en partie d'expliquer ce phénomène. L'adsorption possible de l'octadécylamine sur les clusters d'or diminue leur tension de surface : la croissance selon certains plans cristallins est ralentie, favorisant une croissance anisotrope⁵². De plus, la diffusion des clusters au sein de l'oignon est limitée à l'interface bicouche lipidique/couche aqueuse par la présence des NH_2 .

Nous allons montrer par la suite que d'autres paramètres entrent en jeu dans le développement des dendrites, comme la concentration en ions précurseurs et le vieillissement.

b)- Influence de la concentration en ions précurseurs

Sur la base des images de MET, nous avons fait une étude statistique pour connaître la part de dendrites et de particules au sein des échantillons de formulation PC-ODA-monooléine. Nous avons compté le nombre d'agrégats de particules et le nombre de structures dendritiques pour cette formulation hydratée par le sel d'or à 10^{-3}M et à 10^{-2}M (**figure 2.20**).

Nous constatons qu'aucune dendrite n'est détectée pour 10^{-2}M , alors que 75% des structures d'or sont dendritiques pour 10^{-3}M . La quantité d'ions AuCl_4^- introduite au sein de la phase lamellaire semble donc avoir une influence sur la croissance des structures dendritiques.

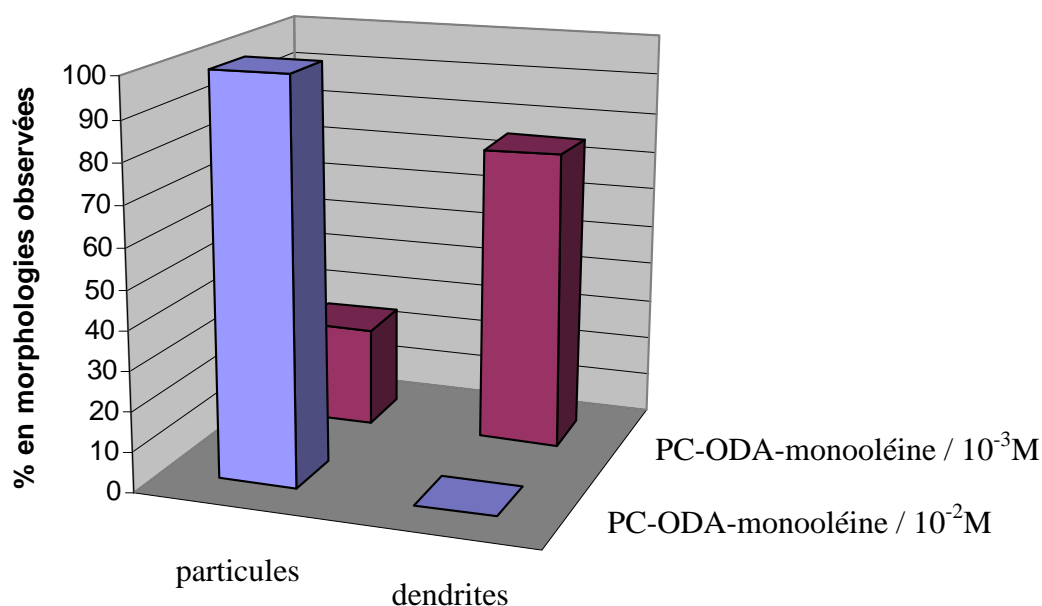


Figure 2.20 : Influence de la concentration en ions $AuCl_4^-$ sur la morphologie des structures d'or formées. Toutes les formulations de composition PC-ODA-monooléine (pâtes âgées de 5 jours) sont considérées.

c)- Influence du temps : vieillissement

Il est connu que le vieillissement des suspensions de nanoparticules conduit à des modifications au niveau de leur distribution en taille et de leur morphologie. Les particules d'or synthétisées dans un milieu confiné tel que l'oignon n'échappent pas à cette règle. Nous basant sur des analyses de MET sur des échantillons issus de pâtes âgées de 5, 6 et 21 jours, nous avons distingué deux manifestations du vieillissement des suspensions. Un phénomène de mûrissement d'Ostwald et d'agrégation/coalescence entre particules mène à une modification de leur distribution en taille. L'agrégation/coalescence des clusters est également en partie responsable de l'apparition des structures dendritiques.

Particules :

L'augmentation de taille des particules est un phénomène « spontané » dû à la tension interfaciale solide-liquide : le système cherche à atteindre l'état de stabilité thermodynamique

en minimisant l'aire de la surface du solide, donc en rassemblant toute la matière précipitée en une seule particule.

Ici, la comparaison des distributions en taille des particules (obtenues à partir des images de MET) issues de pâtes PC-ODA-monooléine / $[\text{KAuCl}_4] = 10^{-2}\text{M}$ âgées de 5 jours et 6 jours (*figure 2.21*) montre que la taille moyenne et la polydispersité des particules augmentent.

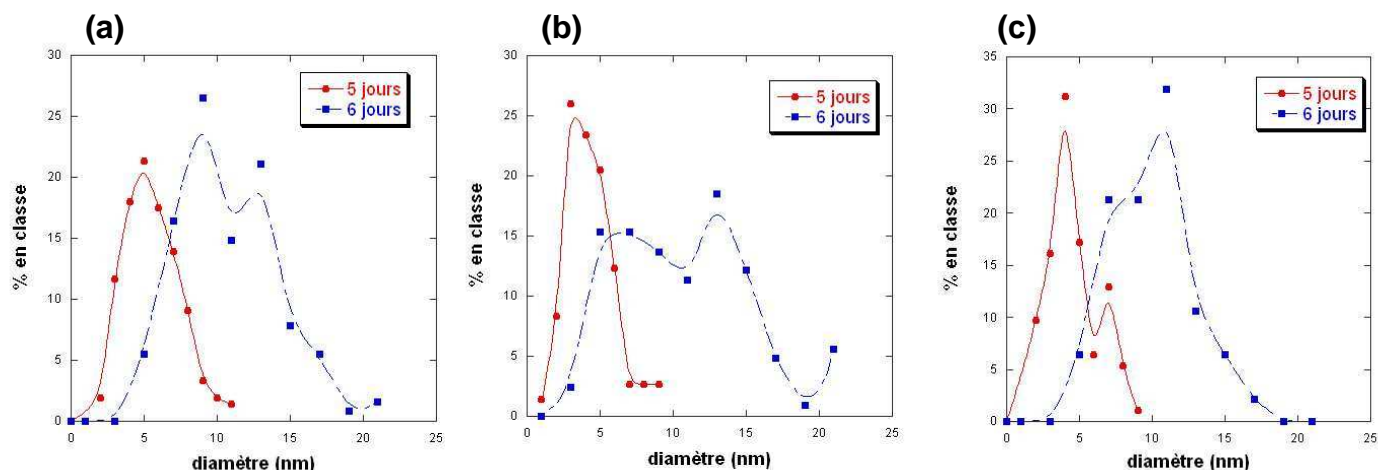


Figure 2.21 : Evolution de la distribution en taille des particules d'or entre 5 et 6 jours pour les formulations PC-ODA-monooléine / $[\text{KAuCl}_4]=10^{-2}\text{M}$: (a) 75-10-15, (b) 75-15-10, (c) 65-15-20 (Les courbes tracées ne sont pas des ajustements.)

Pour information, 70-15-15 / 10^{-2}M n'a pas été tracé car nous n'avons pas les données pour 6 jours (*tableau 2.2*).

Tout d'abord, vue la cinétique très lente de la réduction des ions Au(III) , il est possible que des précurseurs Au(0) se forment encore après 5 jours et qu'ils viennent alimenter la croissance des nuclei. Seulement le déplacement et l'élargissement de la distribution en taille laissent penser que des phénomènes de vieillissement se produisent.

Deux mécanismes peuvent expliquer l'évolution de la distribution en taille des particules au cours du temps : la croissance secondaire des particules et leur coalescence². La croissance secondaire met en jeu le transport de matière à travers le milieu dispersant par des équilibres de « dissolution-cristallisation ». D'un point de vue cinétique, une croissance secondaire sans intervention d'aucun phénomène de coalescence se caractérise par une distribution en taille des particules déplacée vers les grosses particules, alors que la distribution normalisée est

stationnaire¹⁰⁶. Ainsi la dissolution des petites particules va venir alimenter les plus grosses particules : c'est ce que l'on nomme le mûrissement d'Ostwald.

Dans notre cas, une seule population, autour de 4 nm, est présente à 5 jours, alors que deux populations sont présentes à 6 jours, l'une autour de 8 nm et l'autre autour de 13 nm. Nous pouvons penser que les deux phénomènes se « superposent » : le mûrissement d'Ostwald et la coalescence des particules d'environ 4 nm.

La population autour de 13 nm peut raisonnablement provenir de la coalescence des particules de 4 nm. La population autour de 8 nm peut résulter d'une croissance via un mûrissement d'Ostwald. Afin de le vérifier, nous avons tracé les distributions en taille normalisées pour la population autour de 4 nm à 5 jours et pour la population autour de 8 nm à 6 jours (*figure 2.22*), en éliminant les points correspondant à la population autour de 13 nm pour chaque formulation (puisque nous supposons que celle-ci résulte de la coalescence des particules de 4nm).

Le tableau 2.4 résume les positions des extrema des courbes pour chaque échantillon (d'après le paramètre m_2 des ajustements des courbes de la figure 2.22).

Formulation PC-ODA- monooléine (%mol)	Position extremum à « 5 jours »	Position extremum à « 6 jours »
75-10-15	0.86 ± 0.01	0.87 ± 0.01
75-15-10	0.86 ± 0.02	0.83 ± 0.08
65-15-20	0.82 ± 0.06	0.91 ± 0.03

Tableau 2.4 : Positions des extrema des courbes

D'après la figure 2.22 et le tableau 2.4, nous pouvons dire que les positions des extrema des ajustements sont identiques à l'erreur près : la distribution en taille normalisée est stationnaire au cours du temps. La population de particules située autour de 4 nm à 5 jours subit donc un mûrissement d'Ostwald.

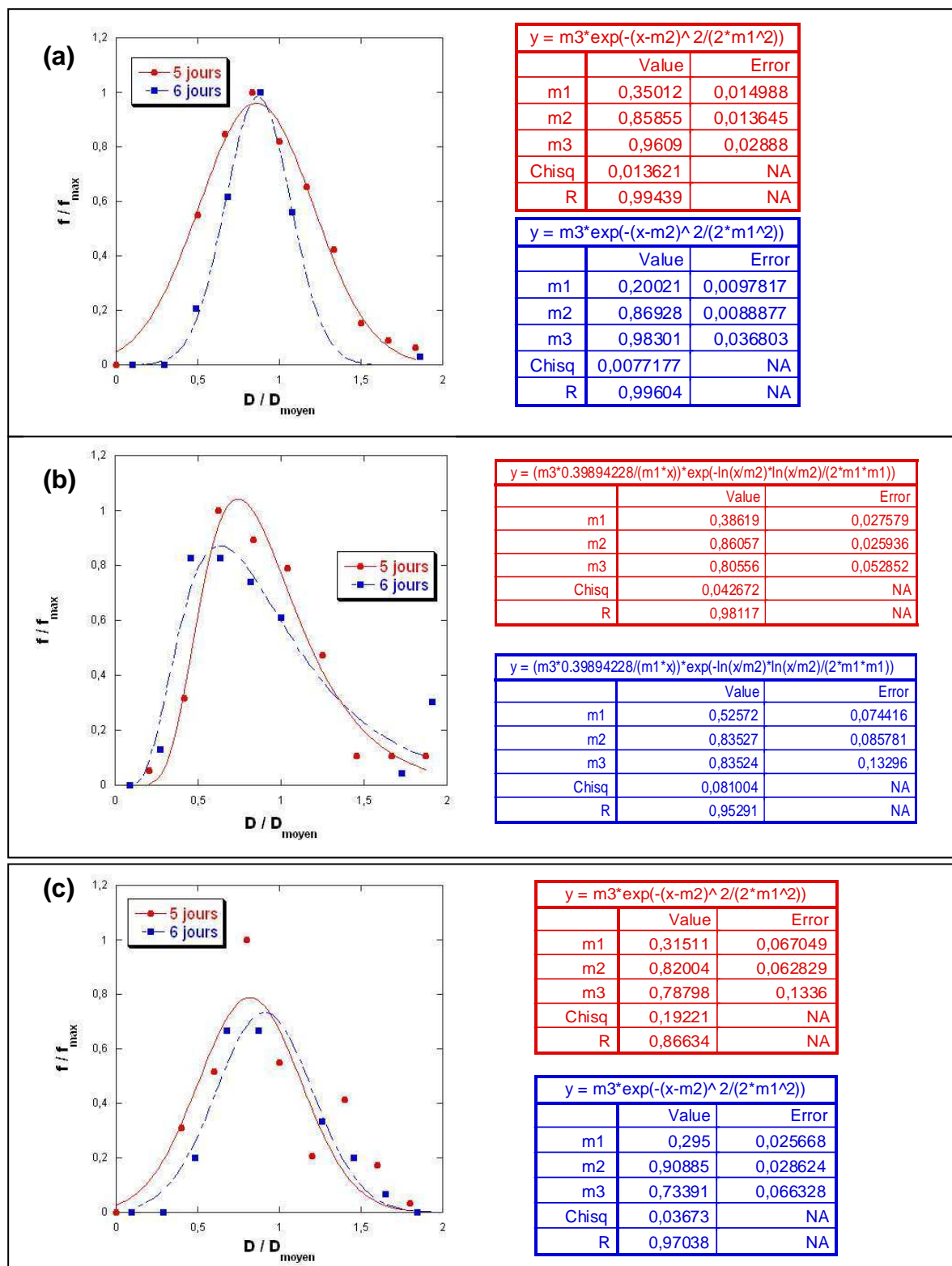


Figure 2.22 : Evolution de la distribution en taille normalisée des particules d'or entre 5 et 6 jours pour les formulations PC-ODA-monooléine / $[KAuCl_4]=10^{-2}M$: (a) 75-10-15, (b) 75-15-10, (c) 65-15-20. Ajustements : m_2 est la moyenne des D/D_{moyen} , et m_1 est l'écart-type sur cette moyenne

Dendrites :

Pour la concentration en sel d'or de 10^{-3}M , nous avons utilisé la microscopie électronique en transmission afin de mettre en évidence l'évolution des structures dendritiques au cours du temps.

Nous avons fait une étude statistique sur les formulations présentant à la fois des particules et des dendrites (PC-ODA- monooléine / $[\text{KAuCl}_4]=10^{-3}\text{M}$). Nous avons compté le nombre de dendrites et d'agrégats de particules observés, sur des échantillons issus de pâtes âgées de 5 jours et de 21 jours (*figure 2.23*).

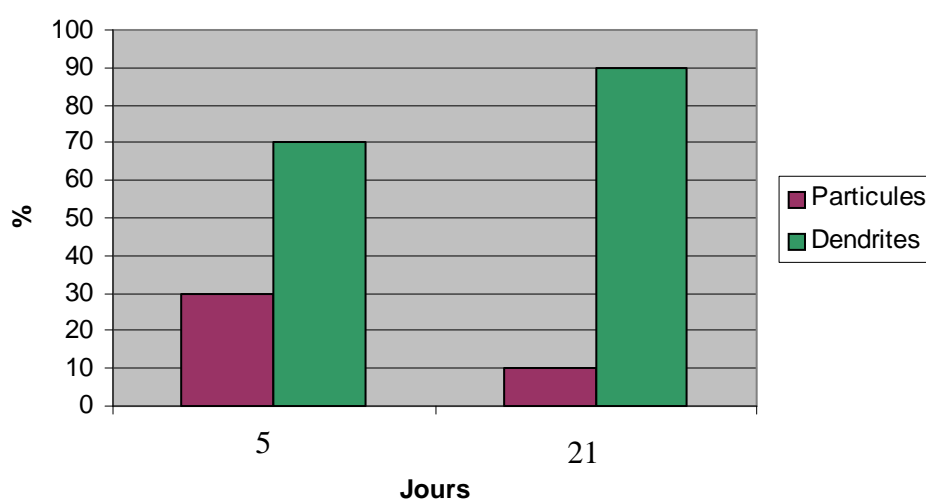


Figure 2.23 : Vieillissement des particules d'or : croissance des dendrites pour les échantillons de formulation PC-ODA- monooléine / $[\text{KAuCl}_4]=10^{-3}\text{M}$

Nous constatons que la population d'agrégats de particules diminue au profit de celle des structures dendritiques au cours du temps. Par ailleurs, des images réalisées sur des échantillons âgés de 5 jours témoignent de la présence à la fois d'objets anisotropes et visiblement de faible épaisseur que nous appellerons « rubans » (*figure 2.24a* et zoom) et de dendrites (*figure 2.24b*). Ces résultats vont dans le sens d'une agrégation/coalescence des particules pour former les dendrites.

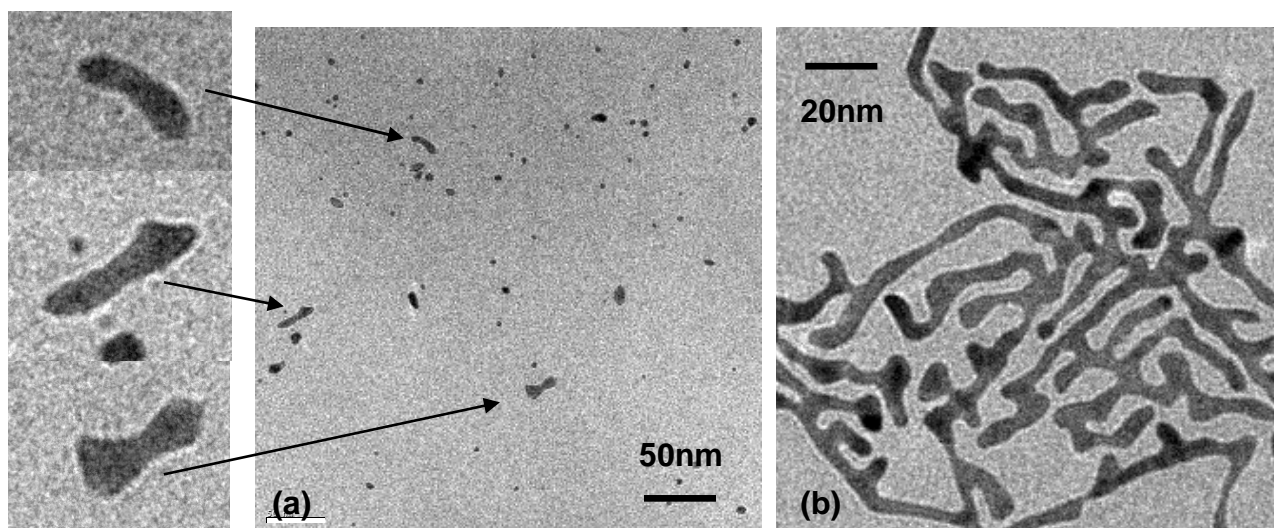


Figure 2.24 : Présence (a) de « rubans » et (b) de dendrites dans PC-ODA-monooléine 70-15-15 / $[\text{KAuCl}_4]=10^{-3}\text{M}$ âgé de 5 jours

En résumé, la croissance des dendrites est lente et l'agrégation des petites particules au cours du temps semble participer à leur formation. La présence de groupements NH_2 et le confinement à l'interface bicouche lipidique/couche aqueuse constituent des éléments indispensables pour leur croissance. En nous basant sur nos conclusions et sur la littérature, nous pouvons proposer une explication à la formation de ces structures dendritiques, présentée dans la partie suivante.

4. Croissance des agrégats dendritiques

La formation de structures dendritiques et fractales dans le cas de l'or a déjà été rapportée dans la littérature^{107,108,109,110,111,112}. Leur synthèse se fait le plus souvent en présence d'une interface eau/couche de molécules tensioactives comportant un groupement amine primaire NH_2 . Ces structures sont développées soit sur des monocouches de Langmuir-Blodgett comportant des ions AuCl_4^- dans la sous-phase^{107,112}, soit sur des bicouches supportées formées par évaporation thermique, le film étant immergé dans une solution de sel d'or¹⁰⁸⁻¹¹¹. Les molécules tensioactives utilisées pour fabriquer ces mono- ou bicouches sont l'hexadécylaniline (HDA), l'octadécylamine (ODA), et le chlorure de benzyldiméthylstearylammmonium (BDSAC). Dans certains cas, un composé chimique « externe » (l'hydrazine $\text{H}_2\text{N}-\text{NH}_2$) est ajouté pour induire la réduction des ions AuCl_4^- .

Afin de pouvoir mettre en relief les facteurs favorisant la croissance des structures fractales, nous avons rassemblé nos résultats et ceux de la littérature qui nous sont apparus les plus pertinents dans le tableau 2.5.

	Méthode et formulation	Interface 2D	Agent complexant des AuCl_4^-	Agent réducteur confiné dans la couche de tensioactifs	Morphologies observées en MET
¹⁰⁷ Swami <i>et coll.</i>	ODA + hydrazine	non	oui	non	particules
¹⁰⁸ Mandal <i>et coll.</i>	Bicouche supportée de HDA	oui	oui	oui	particules et dendrites
¹⁰⁹ Mandal <i>et coll.</i>	Bicouche supportée de ODA + hydrazine	oui	oui	non	particules
^{101(a)} Meyre <i>et coll.</i>	Oignon PC-monooléine $[\text{KAuCl}_4] = 10^{-2}\text{M}$ ou $[\text{KAuCl}_4] = 10^{-3}\text{M}$	oui	non	oui	particules
^{101(b)} Meyre <i>et coll.</i>	Oignon PC-ODA-monooléine $[\text{KAuCl}_4] = 10^{-2}\text{M}$	oui	oui	oui	particules
^{101(c)} Meyre <i>et coll.</i>	Oignon PC-ODA-monooléine $[\text{KAuCl}_4] = 10^{-3}\text{M}$	oui	oui	oui	beaucoup de dendrites et quelques particules

Tableau 2.5 : Synthèse de travaux rapportant la formation de dendrites d'or dans des milieux confinés

La première remarque concerne la nécessité d'avoir une interface 2D pour obtenir des structures bidimensionnelles de l'or. En effet, la synthèse de nanoparticules d'or a été réalisée par Swami *et coll.* en mélangeant ODA (ou BDSAC) + réducteur + AuCl_4^- en l'absence de monocouche de Langmuir-Blodgett¹⁰⁷ : elle a produit des particules sphériques de 10 à 20 nm.

Il semble par ailleurs que la formation de structures dendritiques nécessite la présence à l'interface tensioactif/eau du réducteur et d'un agent complexant ayant une affinité électronique pour l'or.

En effet, Mandal *et coll.*¹⁰⁸ ont obtenu des dendrites en immergeant des bicouches supportées de HDA dans une solution HAuCl_4 à 10^{-4}M à $\text{pH} = 4.5$ pendant 6h. La molécule HDA est protonée à ce pH, elle permet donc de complexer les ions AuCl_4^- . Ils font l'hypothèse qu'elle sert également d'agent réducteur pour les ions métalliques. Dans ce cas, agent complexant et réducteur sont donc confinés à l'interface. Au contraire, lorsque le tensioactif HDA est remplacé par ODA, l'ajout d'un agent réducteur « externe » (l'hydrazine) est nécessaire pour la réduction : les observations de MET montrent alors des particules sphériques¹⁰⁹. Dans ce cas, seul l'agent complexant des ions AuCl_4^- est confiné à l'interface. Le fait que la capacité à diffuser de l'agent réducteur soit limitée par son confinement au sein de la bicouche semble donc favoriser une croissance bidimensionnelle de l'or.

Pour notre système, une formulation des bicouches comportant l'agent réducteur (monooléine) mais pas d'agent complexant des ions précurseurs et des clusters d'or (ODA) produit uniquement des particules sphériques^{101(a)}. Par contre, une formulation comportant à la fois agent réducteur et complexant produit en grande majorité des dendrites dans le cas d'une concentration en sel d'or de 10^{-3}M ^{101(c)}.

Le confinement de l'agent réducteur et la présence de groupements amine à l'interface constituent donc une condition nécessaire à la croissance en deux dimensions de l'or.

Un autre paramètre semble influencer la morphologie des particules : la quantité d'ions AuCl_4^- introduite (comparaison des lignes^{101(b)} et ^{101(c)}). Le rapport entre le nombre de moles d'ions AuCl_4^- et le nombre de moles d'octadécylamine peut permettre d'expliquer l'influence de ce facteur. Pour une formulation PC-ODA-monooléine 70-15-15 (% molaire) par exemple, ce rapport est de 1/300 pour $[\text{KAuCl}_4] = 10^{-3}\text{M}$, alors qu'il est de 1/30 pour $[\text{KAuCl}_4] = 10^{-2}\text{M}$. Nous pouvons donc supposer que dans le cas d'un rapport 1/30, les fréquences de collisions entre précurseurs sont plus élevées et la croissance peut avoir lieu en volume. Dans

le cas d'un rapport 1/300, en plus d'être limitée par les groupements amine, la probabilité de collision entre clusters est plus faible, favorisant ainsi une croissance par DLCA.

Nous pouvons maintenant proposer une hypothèse de formation des dendrites pour notre système, basée sur les observations précédentes (*figure 2.25*).

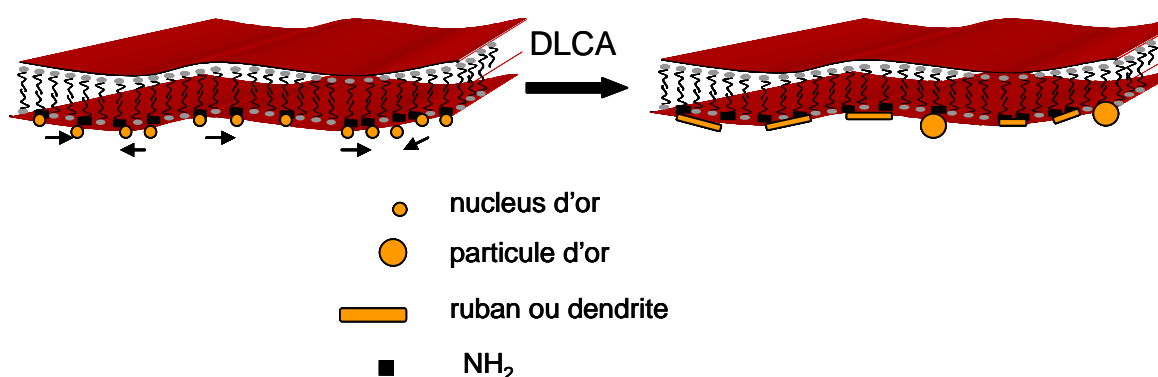


Figure 2.25 : Hypothèse de croissance des structures fractales
(La représentation n'est faite que pour un feuillet de la bicouche.)

La complexation des ions précurseurs AuCl_4^- par les groupements NH_3^+ issus de la protonation de ODA (pH=3.2 dans nos conditions) assure le confinement d'une partie des ions à l'interface bicouche/eau. La monooléine se trouvant dans les bicouches, les ions sont réduits au niveau de l'interface. Les groupements amine primaire ayant une forte affinité électronique pour les clusters d'or, la diffusion des nuclei va être limitée. La croissance va donc se faire lentement, et à l'interface bicouche lipidique/eau, par agrégation des nuclei. Les « rubans » d'or que nous avons montrés dans la figure 2.24a semblent être issus de l'agrégation/coalescence des nanoparticules, première étape de la formation des dendrites. Le mécanisme intervenant ici est l'agrégation limitée par diffusion donnant lieu à des structures fractales, caractérisées par une dimension fractale inférieure à 2 ($D = 1.8$ dans notre cas).

5. Stabilité de l'hybride oignon/nanoparticules d'or

La croissance de particules à l'intérieur des oignons compactés est susceptible de modifier l'arrangement lamellaire des lipides. Nous allons voir, grâce à une étude par diffraction des

rayons X aux moyens angles et par des observations en cryoMET, dans quelle mesure les deux types de structures de l'or observées affectent la phase lamellaire cisainée.

a)- Effet de la croissance des particules sur la structure de l'oignon

Etude de la phase lamellaire cisainée par diffraction des rayons X aux moyens angles :

Tout d'abord, précisons que ces analyses par rayons X ont été réalisées sur des pâtes de formulation PC-ODA-monooléine / $[\text{KAuCl}_4] = 10^{-2}\text{M}$ ayant changé de couleur (c'est-à-dire après formation des particules d'or) et âgées de 6 jours. Nous avons comparé les courbes intensité diffractée en fonction du vecteur d'onde q pour des pâtes contenant des particules d'or et pour des pâtes hydratées par de l'eau distillée. Les résultats sont présentés dans la figure 2.26.

Toutes les formulations que nous avons analysées par diffraction des rayons X présentent un spectre caractéristique d'une phase lamellaire, même en présence des particules. Ici, nous nous sommes focalisés sur les formulations les plus intéressantes en terme de taille des particules synthétisées : PC-ODA-monooléine / $[\text{KAuCl}_4] = 10^{-2}\text{M}$.

Le spectre de la figure 2.26a a été obtenu sur une phase lamellaire contenant des particules de taille moyenne 10 ± 4 nm (**figure 2.26b** sur 130 particules). Celui de la figure 2.26c a été fait sur une phase lamellaire contenant des particules plus petites et plus monodisperses, puisque leur diamètre moyen est de 5 ± 2 nm (**figure 2.26d** sur 218 particules). La valeur du pas smectique passe de 59.9 Å pour 75-10-15 / eau à 60.5 Å pour 75-10-15 / $[\text{KAuCl}_4] = 10^{-2}\text{M}$, tandis qu'elle varie de 59.9 Å pour 70-15-15 / eau à 58.9 Å pour 70-15-15 / $[\text{KAuCl}_4] = 10^{-2}\text{M}$. Ces variations ne sont pas très significatives et peuvent provenir des différences d'hydratation entre les échantillons.

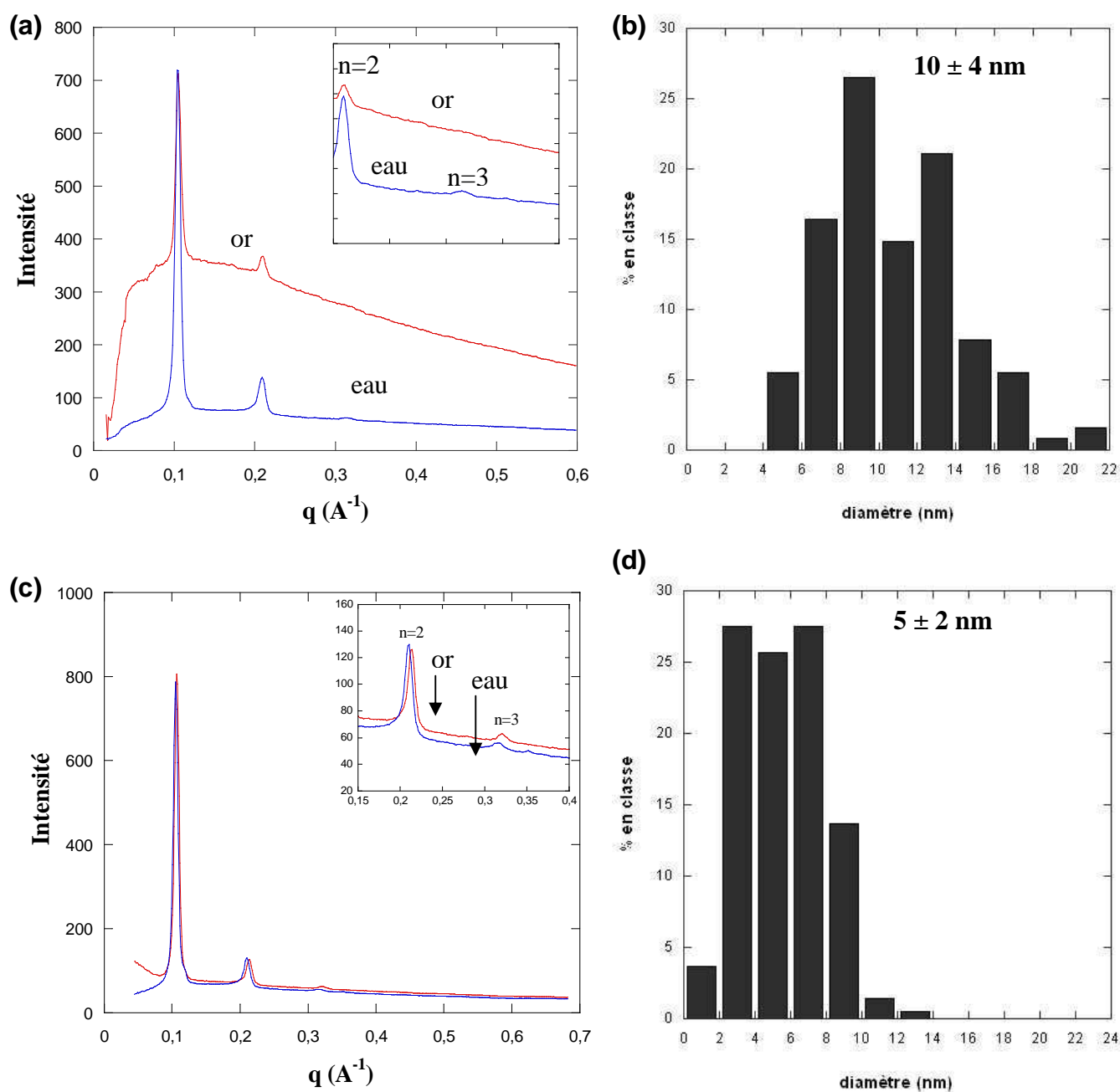


Figure 2.26 : Spectres de diffraction des rayons X pour des phases lamellaires hydratées par le sel d'or et par l'eau distillée, et distributions en taille des particules synthétisées, pour des échantillons de formulation PC-ODA-monooléine / $[\text{KAuCl}_4] = 10^{-2}\text{M}$ (a) et (b) 75-10-15 ; (c) et (d) 70-15-15

Le signal de la formulation 70-15-15 (**figure 2.26c**) est intéressant car, contrairement aux autres, cet échantillon semble peu affecté par la présence de particules dans la phase lamellaire : le nombre d'ordres (le nombre de pics de Bragg) reste inchangé (par comparaison hydratation eau / hydratation sel d'or), de même que l'allure de la ligne de base. Par contre, le nombre d'ordres passe de 3 à 2 pour la formulation 75-10-15 et la ligne de base est « déformée » (**figure 2.26a**). Ces deux derniers résultats peuvent être interprétés comme des fluctuations de la phase lamellaire dues à la présence des particules.

En effet, le nombre de pics dépend du facteur de structure, qui lui-même dépend de plusieurs paramètres. La diminution du nombre de pics peut-être observée, par exemple, quand une transition structurale a lieu¹¹³. Ici aucune transition structurale n'a lieu, mais pour les phases lamellaires, le désordre (par exemple désordre induit par la température) provoque une perte du troisième ordre et un élargissement des pics de Bragg¹¹⁴. Dans notre cas, nous pensons que les particules d'or, trop grosses (10 nm) par rapport à l'épaisseur de la couche d'eau (2 nm, chapitre 1), déstructurent la phase lamellaire.

La densité électronique des structures cristallines constitue un autre paramètre influençant le facteur de structure. Ici, c'est la phase lamellaire qui est considéré comme la structure « cristalline » (puisque'on est aux petits angles on ne peut pas détecter la structure cristalline des particules d'or). Les particules d'or, localisées à l'interface bicouche lipidique/couche aqueuse, sont susceptibles de modifier la densité électronique de la phase lamellaire, comme le suggère le profil de la ligne de base.

En résumé, l'épaisseur de la couche aqueuse entre bicouches lipidiques ayant été mesurée à 2nm (chapitre 1), la présence de nanoparticules d'or de 5 nm de diamètre affecte moins l'arrangement lamellaire des lipides que celle de particules de 10 nm de diamètre.

Observation de la structure interne de l'oignon par cryoMET :

La conservation de la structure interne de l'oignon en présence des particules d'or constitue un point important pour d'éventuelles applications biomédicales. La cryo-microscopie électronique en transmission est une technique de microscopie non destructrice pour les oignons. Elle nous permet donc de visualiser l'hybride oignon/nanoparticules d'or.

Les observations portent sur les formulations produisant des particules de taille comprise entre 5 et 13 nm, c'est-à-dire les formulations PC-ODA-monooléine / $[KAuCl_4] = 10^{-2}M$.

Les images de la figure 2.27 sont représentatives de la structure interne des oignons en présence des particules d'or.

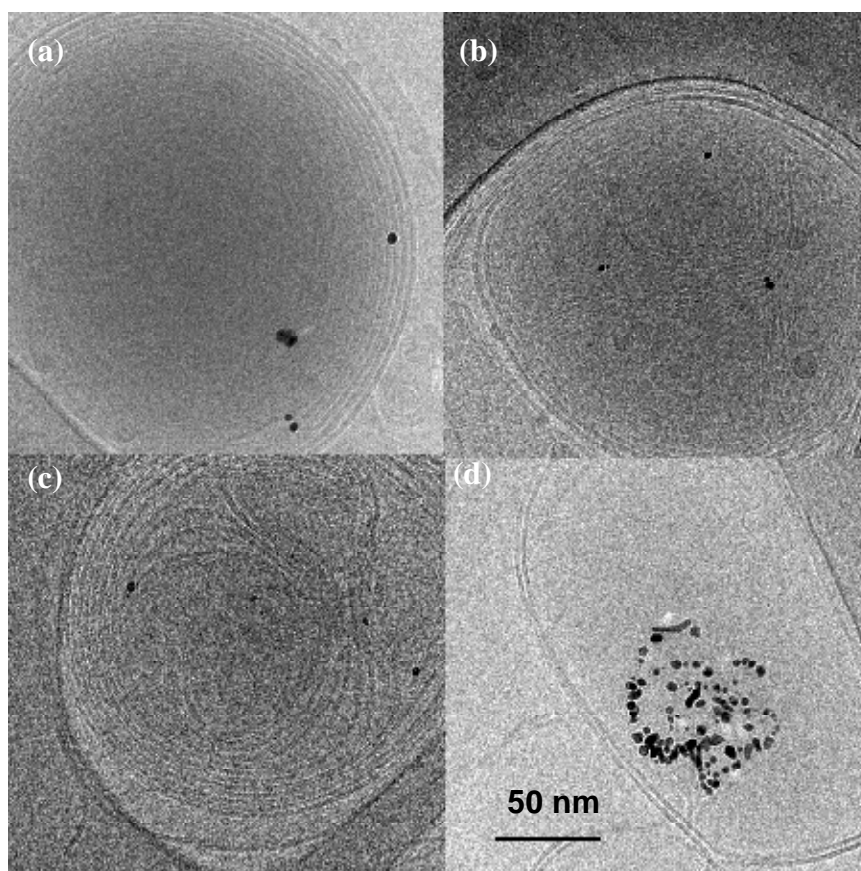


Figure 2.27 : Images de cryoMET : (a) oignon contenant des particules de 3-10nm, (b) particules et défauts de la structure interne, (c) cœur de l'oignon désorganisé, (d) oignon détruit ; PC-ODA-monooléine / $[KAuCl_4] = 10^{-2}M$ (a) et (b) 70-15-15 ; (c) et (d) 75-10-15

La première remarque concerne le faible nombre de particules synthétisées à l'intérieur des oignons : au maximum une dizaine de particules.

La formulation PC-ODA-monooléine 70-15-15, qui présentait un diffractogramme X peu affecté en présence des nanoparticules, se démarque encore une fois des trois autres. En effet, aucun oignon déstructuré n'est observé et tous les oignons contiennent des particules qui mesurent de 3 à 10 nm de diamètre (*figure 2.27a*). La présence des particules affecte tout de même la structure interne des oignons avec l'apparition de « noeuds » entre bicouches (*figure 2.27b*). Pour les autres formulations, où les nanoparticules formées font 10 nm de diamètre en

moyenne d'après la figure 2.26b, la fréquence d'observation de particules dans les oignons est bien plus basse. Les particules d'or formées dans ces oignons intacts font entre 3 et 11 nm de diamètre. Le cœur de l'oignon peut se désorganiser lorsque les particules sont plus nombreuses (7 particules sur la *figure 2.27c*). On observe également des vésicules unilamellaires et des particules d'or à l'extérieur des oignons (*figure 2.27d*).

Ainsi nous avons montré que les oignons sont instables en présence de particules de diamètre ≥ 10 nm et qu'un trop grand nombre de particules conduit à des défauts dans la structure interne des oignons.

b)- Effet de la croissance de dendrites sur la structure de l'oignon

De part leur taille et leur « géométrie », la croissance des structures dendritiques à l'intérieur des oignons n'est sûrement pas sans effet sur l'arrangement lamellaire des lipides et sur l'intégrité de l'oignon au cours de leur croissance. Nous avons donc voulu savoir tout d'abord dans quelle mesure la phase lamellaire cisailée était affectée (diffraction des rayons X aux moyens angles), puis quel était l'aspect des oignons après dispersion et après croissance des dendrites (cryoMET).

Etude de la phase lamellaire cisailée par diffraction des rayons X aux moyens angles :

Précisons ici aussi que les analyses par rayons X ont été réalisées sur des pâtes (oignons « compactés ») ayant changé de couleur, c'est-à-dire au sein desquelles l'or métallique est présent. Nous nous sommes intéressés plus particulièrement aux formulations produisant le plus souvent des dendrites d'après les observations par MET, c'est-à-dire PC-ODA-monooléine / $[\text{KAuCl}_4] = 10^{-3}\text{M}$. La figure 2.28 présente un spectre caractéristique de ces échantillons : nous comparons toujours une formulation hydratée par de l'eau distillée avec une formulation hydratée par le sel d'or.

Nous constatons que les lipides sont dans un arrangement lamellaire même dans le cas où la pâte contient des structures dendritiques. Le pas smectique ne varie quasiment pas (59.9 Å pour l'eau, 58.9 Å pour l'or). Par contre, la ligne de base du signal est très affectée par la présence des dendrites et le nombre d'ordre passe de 3 pour la formulation hydratée par l'eau, à 2 pour la formulation hydratée par le sel d'or. Ces deux derniers résultats peuvent être interprétés comme une désorganisation de la phase lamellaire.

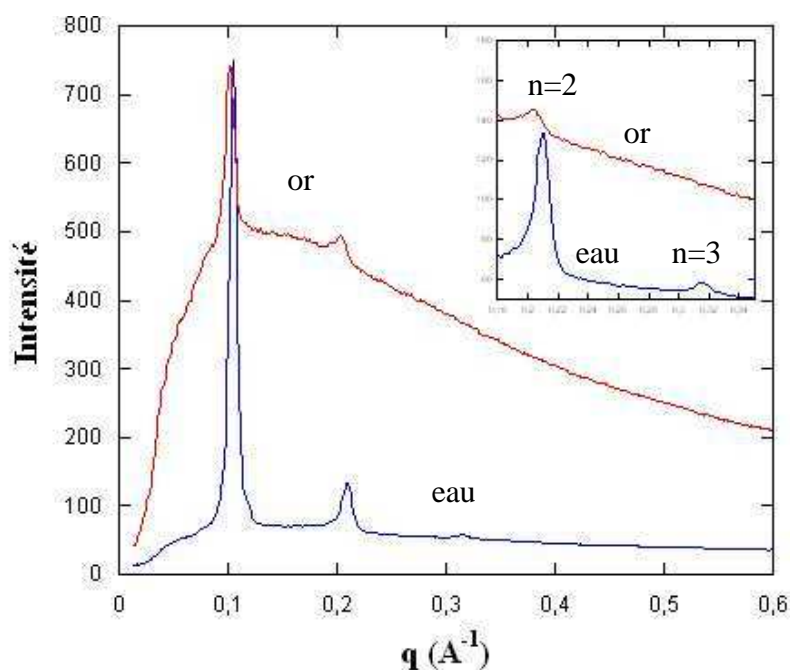


Figure 2.28 : Spectres de diffraction des rayons X pour des phases lamellaires hydratées par le sel d'or et par l'eau distillée ; PC-ODA-monooléine 75-15-10 / $[\text{KAuCl}_4] = 10^{-3}\text{M}$

En effet, comme nous l'avons vu dans la partie IV-5-a), la diminution du nombre d'ordre et la « déformation » de la ligne de base du diffractogramme X traduisent une perturbation du facteur de structure du signal, que nous interprétons comme une déstructuration de la phase lamellaire due à la présence des dendrites.

Observation de la structure interne de l'oignon par cryoMET :

L'observation des structures fractales par cryoMET est l'occasion de préciser que ces structures ne sont pas des artefacts conséquents à la préparation des grilles de MET (dépôt, séchage). Elles ne sont pas non plus formées sous l'effet du faisceau d'électrons : le faisceau a été focalisé sur des agrégats de particules pendant 15 min, aucune coalescence des particules n'a été observée. Enfin l'observation de ces structures dans une goutte de dispersion congelée juste après dépôt (voir préparation des grilles en cryoMET) nous conforte dans l'idée que ces structures ne poussent pas sur la grille de MET, mais bien à l'intérieur des oignons.

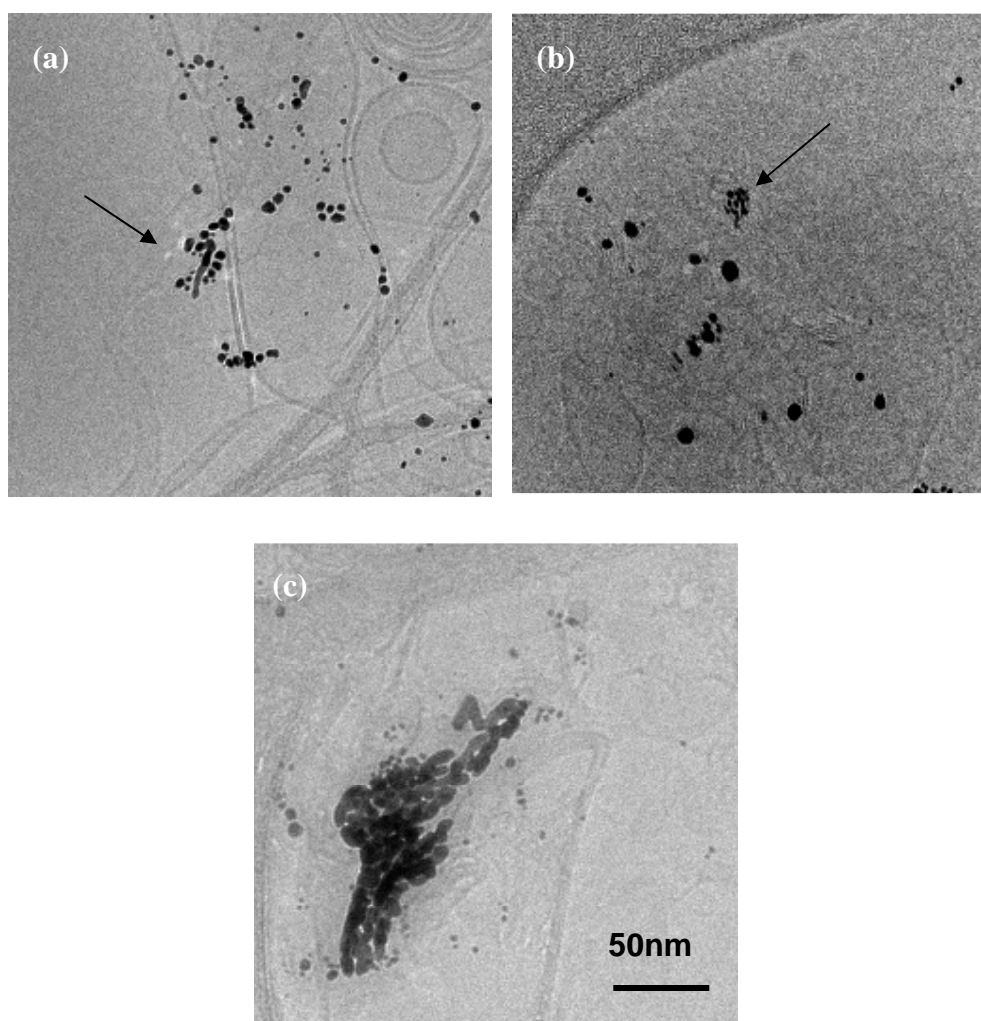


Figure 2.29 : Images de cryoMET : formulation PC-ODA-monooléine / $[KAuCl_4] = 10^{-3}M$
(a) et (b) 70-15-15 ; (c) 75-10-15

La figure 2.29 présente quelques images caractéristiques des échantillons contenant des dendrites (PC-ODA-monooléine / $[KAuCl_4] = 10^{-3}M$) âgés de 5 jours. Des particules coalescées formant un « ruban », également observées par MET, sont présentes (*figure 2.29a*). De « petits » dendrites de 20nm de diamètre (*figure 2.29b*) semblent résulter de la coalescence de particules d'or de 5nm de diamètre. Enfin nous constatons sur la figure 2.29c que ces rubans sont entourés de bicouches lipidiques suggérant une destruction des oignons, conséquence de la formation des rubans et des dendrites.

L'observation directe des oignons par cryoMET nous permet donc de nous rendre compte que la croissance des dendrites induit une déstructuration complète des oignons.

6. Conclusion

L'insertion au sein des bicouches lipidiques d'un tensioactif permettant de limiter la diffusion des nuclei d'or nous a permis d'obtenir des particules de 5 nm de diamètre. Ces particules n'étant pas beaucoup plus grosses que l'épaisseur de couche aqueuse entre deux bicouches (2nm), l'arrangement lamellaire est peu perturbé. Il est possible de former des hybrides oignon/nanoparticules d'or stables. Un autre effet de l'incorporation de groupements amine primaire dans les oignons a été mis en évidence : l'apparition de structures fractales pour lesquelles nous avons pu faire une hypothèse de « mécanisme » de formation.

B- Photoréduction par UV

Dans la littérature, il existe plusieurs voies de réduction des ions métalliques pour la synthèse de nanoparticules : la réduction chimique, électrochimique, la photoactivation par irradiation UV, la radiolyse par irradiation γ , etc. L'utilisation de méthodes d'irradiation pour la préparation de colloïdes métalliques présente d'importants avantages par rapport aux autres méthodes de synthèse. Tout d'abord, la synthèse se fait à température ambiante. Le procédé ne nécessite pas d'un réducteur chimique puisque la réduction est effectuée par les espèces générées à partir du solvant lui-même. Ensuite, la réduction se fait de façon homogène en tout point de la solution, d'où une dispersion homogène des réactifs¹¹⁵ et une distribution étroite des tailles en fin de synthèse¹¹⁶. La réduction par irradiation mène à un état de division extrême des clusters dû à la formation initiale séparée des atomes, ce qui peut conduire à la préparation de très petites particules. Enfin, ces méthodes sont très reproductibles. Dans cette partie nous nous intéresserons donc aux résultats concernant la photoréduction par UV. La radiolyse γ sera abordée dans la partie IV-C.

Nous avons travaillé sur les formulations PC-ODA / $[\text{KAuCl}_4] = 10^{-3}\text{M}$ et PC-ODA-monooléine / $[\text{KAuCl}_4] = 10^{-2}\text{M}$. Les pâtes, après hydratation par la solution de sel d'or et cisaillement, ont été exposées sous lampe UV (à 30cm de la source arc Hg, puissance : 200W)

à différents temps. Les temps d'irradiation UV, les changements de couleur des pâtes et les observations de MET sur les dispersions sont regroupés dans le tableau 2.6.

Formulation	Temps d'irradiation UV	Couleur	Observations par MET
PC-ODA 80-20 / $[KAuCl_4] = 10^{-3}M$	30 min	pas de changement	pas de particule d'or
	1 h	légèrement rosé	quelques particules (5 nm en moyenne)
PC-ODA-monooléine 75-10-15 / $[KAuCl_4] = 10^{-2}M$	8 min	pas de changement	pas de particule d'or
	15 min	violet foncé	beaucoup de particules (5-6 nm en moyenne)
	30 min	violet foncé	beaucoup de particules (6-7 nm en moyenne)
PC-ODA-monooléine 65-15-20 / $[KAuCl_4] = 10^{-2}M$	8 min	pas de changement	pas de particule d'or
	15 min	légèrement rosé	-agrégats de particules de 45-85 nm -beaucoup de particules (5 nm en moyenne)

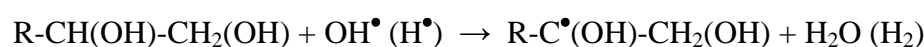
Tableau 2.6 : Changements de couleur des pâtes et observations de MET pour les formulations irradiées par UV

Nous décrirons d'abord le mécanisme de réduction. Ensuite nous discuterons des phénomènes de nucléation et de croissance régissant la distribution en taille des particules. Enfin la stabilité des oignons en présence des particules sera abordée.

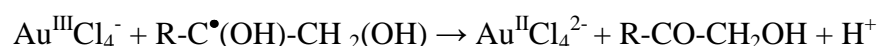
1. Mécanisme de réduction

Le photodétachement d'électrons à partir des ions Cl^- de $AuCl_4^-$ permet de réaliser la réduction de Au(III) en Au(II). La photolyse de l'eau par la source UV^{99,117} permet également de générer des électrons solvatés ainsi que des radicaux H^\bullet et OH^\bullet .

Il est à noter que dans la littérature, la synthèse de nanoparticules d'or ou d'argent par photoactivation UV se fait classiquement en présence d'un agent stabilisant (polymères¹¹⁸, micelles¹¹⁹) et d'un alcool qui joue le rôle de « scavenger ». En effet, les radicaux H^\bullet et OH^\bullet ont de puissantes propriétés oxydantes et ils sont susceptibles de causer la ré-oxydation de Au(II) ou Au(I) en Au(III). Des alcools comme le propanol sont utilisés pour « capter » ces radicaux libres et empêcher ce phénomène d'oxydation-retour. Il a été montré notamment par Gachard *et coll.*⁹⁹ que, lors de la synthèse de nanoparticules d'or par irradiation d'ions $AuCl_4^-$, le rendement de la réaction est plus faible en absence d'alcool dans le milieu réactionnel. Dans notre cas, la monooléine est susceptible de servir de « scavenger » puisqu'elle porte deux groupements alcool :



Le radical libre $R-C^\bullet(OH)-CH_2(OH)$ possède également des propriétés réductrices et il contribue à la réduction des ions $AuCl_4^-$:



Le rôle supposé de la monooléine comme « scavenger » est conforté par le fait qu'en l'absence de monooléine, aucune particule n'est formée à 30min d'irradiation (PC-ODA 80-20 / $[KAuCl_4] = 10^{-3}M$) alors qu'en sa présence, des particules apparaissent dès 15min d'irradiation (PC-ODA-monooléine 65-15-20 / $[KAuCl_4] = 10^{-2}M$, **tableau 2.6**).

L'étape suivante est la dismutation de Au(II) :



Puis la dismutation de Au(I) en Au(0) et Au(II) conduit à la formation de l'atome.

La cinétique de réduction de Au(III) en Au(0) est principalement gouvernée par l'étape de dismutation de Au(I) en Au(0) et Au(II)⁹⁹.

2. Nucléation et croissance des particules

a)- Monodispersité de la population de particules formées

La figure 2.30 présente des images et histogrammes des particules observées par MET pour l'échantillon PC-ODA-monooléine 75-10-15 / $[KAuCl_4] = 10^{-2}M$ après 15min d'irradiation

(figure 2.30a et 2.30b) et pour l'échantillon PC-ODA / $[\text{KAuCl}_4] = 10^{-3}\text{M}$ après 1h d'irradiation UV (figure 2.30c et 2.30d).

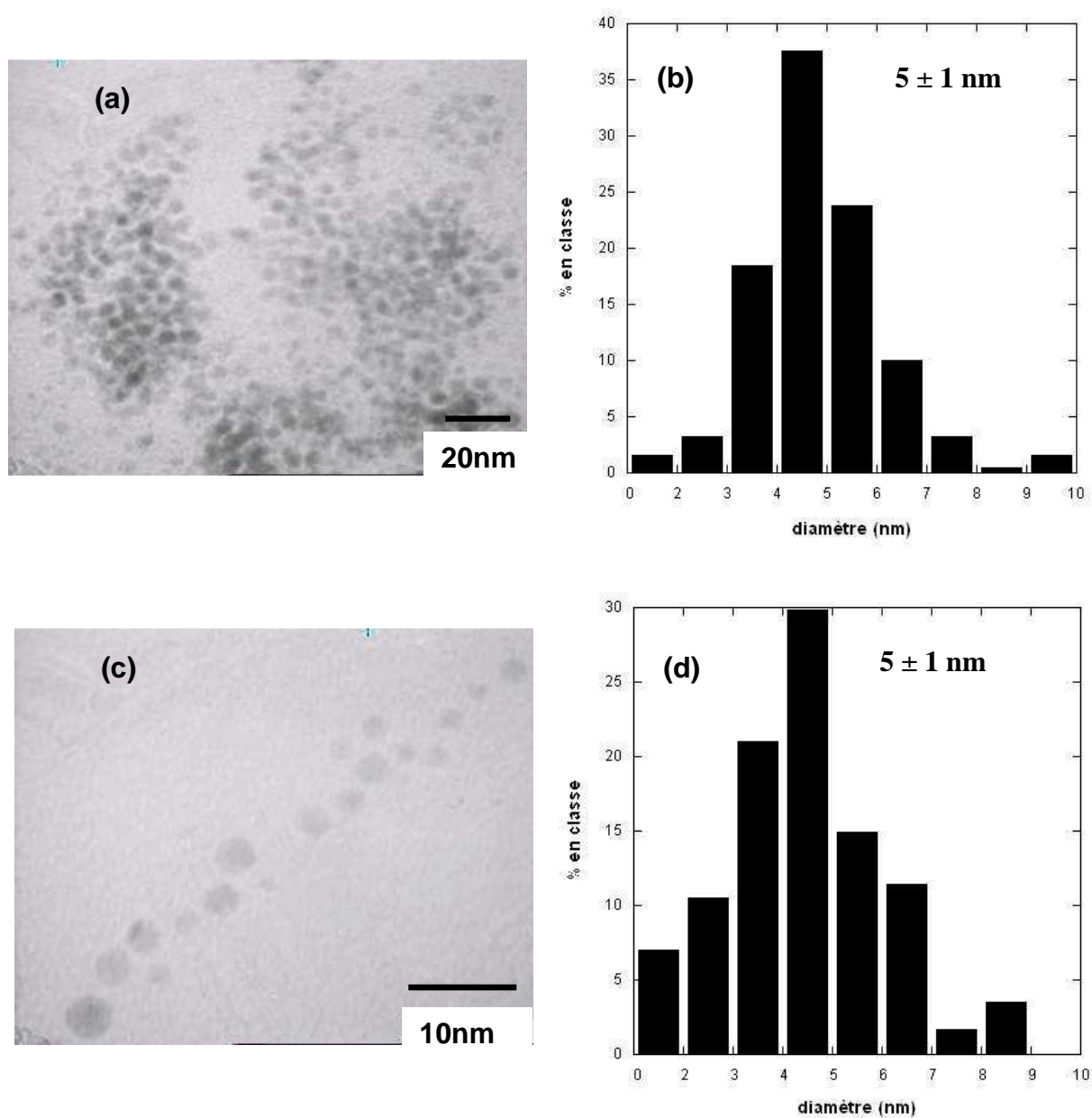


Figure 2.30 : Images de MET et histogrammes pour l'échantillon (a) et (b) PC-ODA-monooléine 75-10-15 / $[\text{KAuCl}_4] = 10^{-2}\text{M}$ irradié pendant 15min (sur 189 particules), et (c) et (d) PC-ODA / $[\text{KAuCl}_4] = 10^{-3}\text{M}$ irradié pendant 1h (sur 114 particules)

Comparons la taille moyenne des particules synthétisées par réduction chimique (sans irradiation) avec celle des particules formées par irradiation UV. Pour PC-ODA-monooléine 75-10-15 / $[KAuCl_4] = 10^{-2}M$, la moyenne des tailles passe de 10 nm à 5 nm pour l'échantillon irradié pendant 15min. D'autre part, l'écart-type passe de 4 nm à respectivement 1 nm. La population synthétisée par irradiation UV est donc plus petite et plus monodisperse.

Nous avons vu que, dans le cas d'échantillons irradiés par UV, la réduction est initiée par les électrons issus du photodétachement des chlorures généré par les UV. L'absorption du rayonnement est homogène ce qui suggère que l'ensemble des ions précurseurs est réduit simultanément, suivi par la croissance des nuclei. Il ne reste alors qu'une faible quantité d'ions précurseurs pour alimenter la croissance de ces nuclei : ceux-ci ne grossissent que très peu et les particules formées sont donc plus petites que celles formées par voie chimique classique.

b)- Croissance des particules

Afin d'étudier l'influence du temps d'irradiation sur la croissance des particules, des analyses des images de MET nous ont permis d'obtenir les distributions en taille des particules (absolues et normalisées).

La figure 2.31 présente les résultats obtenus sur la formulation PC-ODA-monooléine 75-10-15 / $[KAuCl_4] = 10^{-2}M$ pour des temps d'irradiation UV de 15min et de 30min. La distribution en taille des particules est légèrement déplacée vers les grosses populations : elle est centrée sur 5.2 nm après 15min et sur 6.3 nm après 30min (paramètres m_2 des ajustements de la **figure 2.31a**).

La distribution en taille normalisée n'est pas stationnaire car l'extremum de la gaussienne est situé à $D/D_{moyen} = 0.88 \pm 0.01$ pour 15min alors qu'il est situé à $D/D_{moyen} = 0.96 \pm 0.02$ pour 30min (paramètres m_2 des ajustements de la **figure 2.31b**). La croissance des particules ne s'effectue donc pas selon un mûrissement d'Ostwald. Ce résultat est cohérent avec l'obtention d'une population monodisperse en taille.

La nucléation de nouveaux clusters vient donc alimenter la croissance des particules.

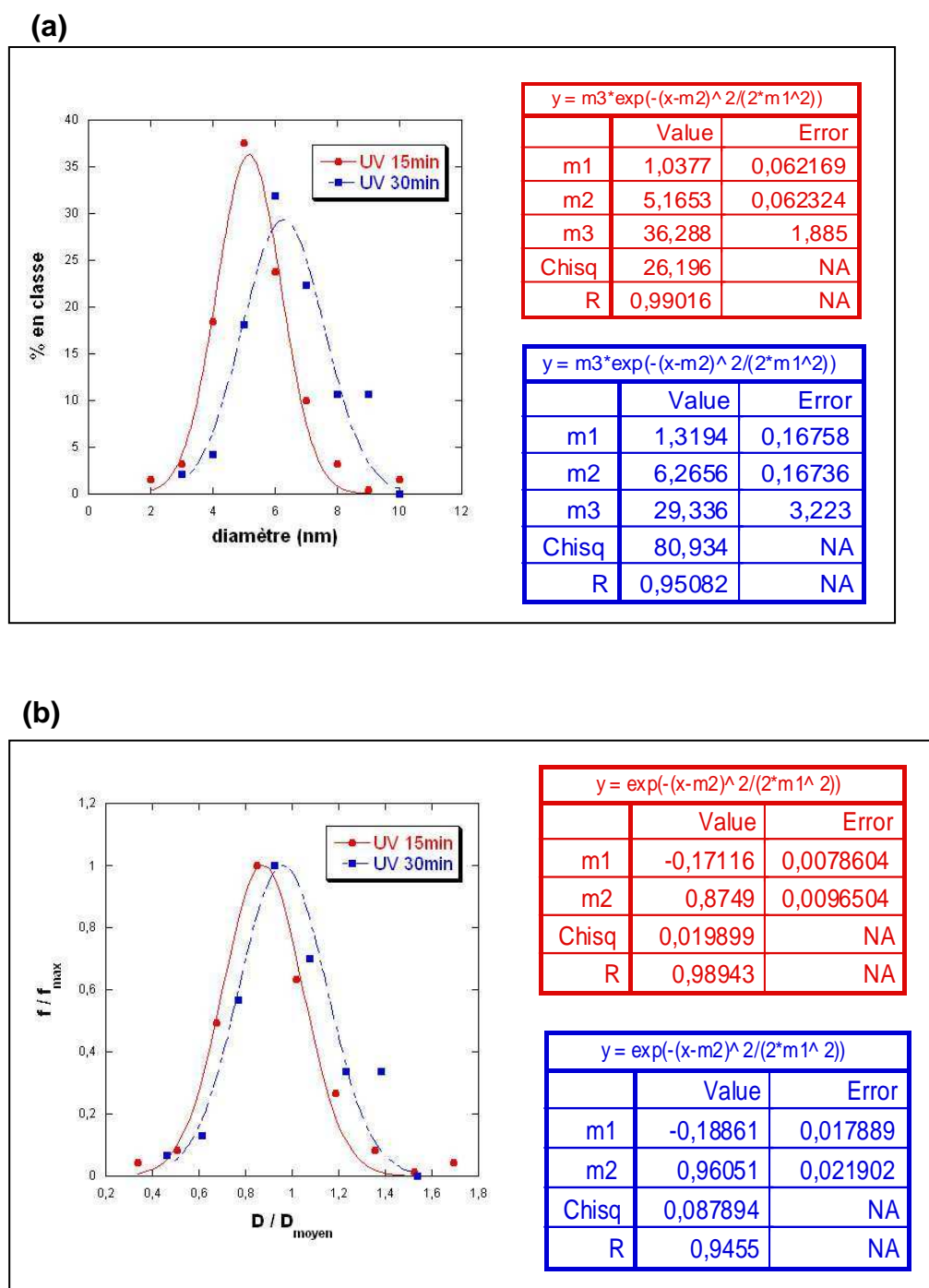


Figure 2.31 : Distribution en taille (a) absolue, (b) normalisée pour l'échantillon PC-ODA-monooléine 75-10-15 / $[KAuCl_4] = 10^{-2}M$ après 15min et 30min d'irradiation UV

3. Stabilité de l'hybride oignon/nanoparticules d'or

a)- Effet des particules sur la phase lamellaire cisailée

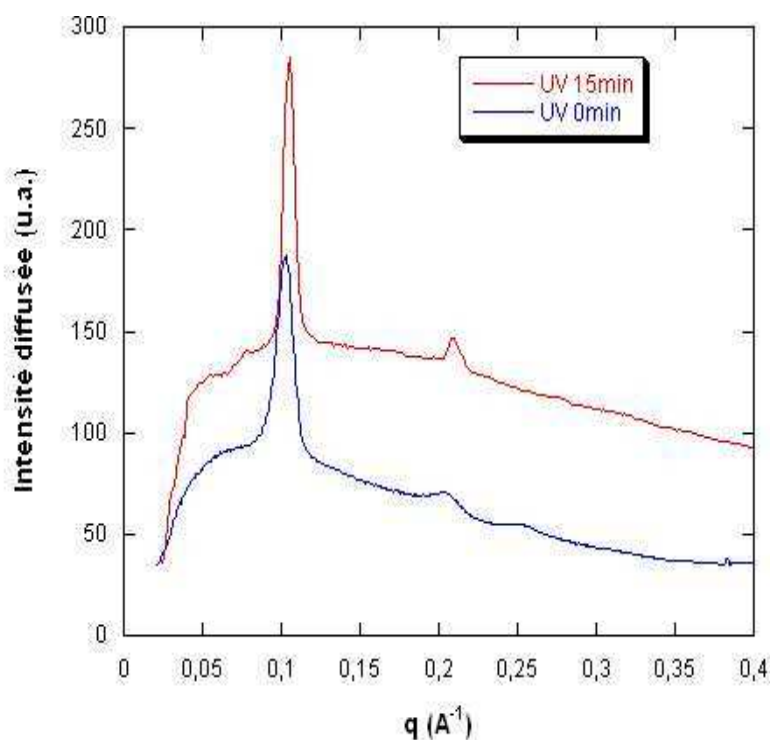


Figure 2.32 : Analyse par diffraction des rayons X aux moyens angles de phases lamellaires cisailées de formulation PC-ODA-monooléine 75-10-15 / $[KAuCl_4] = 10^{-2}M$: comparaison des courbes sans irradiation UV et après 15min d'irradiation UV

La phase lamellaire cisailée après 15min d'irradiation UV est violette, il y a donc bien eu synthèse de nanoparticules d'or sur l'échantillon analysé. Nous remarquons que la largeur à mi-hauteur des pics de Bragg est plus faible sur la courbe correspondant à la phase lamellaire cisailée irradiée (contenant des particules) que sur celle qui n'a pas été irradiée (qui ne contient pas de particules). De plus l'intensité des pics est plus importante. L'intensité et la « définition » des pics est augmentée par la présence des particules d'or à l'interface bicouche lipidique / couche aqueuse. Ajoutons que la faible diminution du pas smectique, qui passe de 61\AA à 59.8\AA pour une phase lamellaire non irradiée et irradiée respectivement, peut provenir d'interactions attractives de Van der Waals entre les lignes de nanoparticules d'or, comme il l'a déjà été montré pour une phase lamellaire contenant des nanoparticules d'or¹²⁰.

b)- Effet des particules sur la stabilité de l'oignon

Afin de connaître la stabilité des oignons en présence des particules d'or et sous l'effet des rayons UV, nous avons fait des observations des dispersions d'oignons après dilution des pâtes irradiées par microscopie à contraste de phase et par cryoMET.

Les observations de microscopie à contraste de phase sont résumées dans le tableau 2.7.

Formulation	Temps d'irradiation UV (min)	Observations au microscope des vésicules	Présence de particules d'or par MET
PC-ODA 80-20 / $[KAuCl_4] = 10^{-3}M$	30 min	gros multilamellaires, unilamellaires, quelques oignons	non
	1 h	gros multilamellaires, unilamellaires, quelques oignons	oui
PC-ODA-monooléine 75-10-15 / $[KAuCl_4] = 10^{-2}M$	8 min	unilamellaires, quelques oignons	non
	15 min	unilamellaires, pas d'oignon	oui
	30 min	unilamellaires, pas d'oignon	oui
PC-ODA-monooléine 65-15-20 / $[KAuCl_4] = 10^{-2}M$	8 min	gros multilamellaires, quelques oignons	non
	15 min	unilamellaires, pas d'oignon	oui

Tableau 2.7 : Observations au microscope à contraste de phase des dispersions d'oignons pour différentes formulations et différents temps d'irradiation UV

Quelque soit l'échantillon, la structure des oignons est affectée puisque l'on observe des vésicules unilamellaires et multilamellaires de gros diamètre, et peu ou pas d'oignons par microscopie à contraste de phase. Les rayons UV peuvent provoquer une coupure des chaînes

phosphatidylcholine formant des radicaux et menant ainsi à la déstructuration de l'oignon. Une autre explication réside dans le fait que la température n'est pas contrôlée durant la durée de l'irradiation : plus celle-ci est longue plus l'échantillon s'échauffe, ce qui peut également contribuer à la destruction des oignons.

Nous notons également que les dispersions présentant des particules d'or par MET (PC-ODA-monooléine 75-10-15 / $[KAuCl_4] = 10^{-2}M$ irradié pendant 15 et 30min et PC-ODA-monooléine 65-15-20 / $[KAuCl_4] = 10^{-2}M$ irradié pendant 15min) ne contiennent pas d'oignons d'après les observations de microscopie à contraste de phase. De plus, la quantité de particules synthétisées dans les formulations PC-ODA-monooléine est plus importante par photoactivation UV que par simple réduction chimique, d'après les observations de MET. D'autre part, nous constatons que les dispersions d'oignons de formulation PC-ODA 80-20 / $[KAuCl_4] = 10^{-3}M$ comporte encore quelques oignons après 1h d'irradiation. Les particules d'or formées sont moins nombreuses dans cet échantillon par rapport aux échantillons PC-ODA-monooléine. Il semblerait donc que la quantité de particules d'or formées ait aussi un effet sur la stabilité de l'oignon.

Les formulations du tableau 2.7 ont été observées par cryoMET. Des images caractéristiques des observations faites sont présentées dans la figure 2.33.

En ce qui concerne la formulation PC-ODA-monooléine, nous constatons que les oignons sont complètement détruits. Des vésicules unilamellaires et des bicouches lipidiques sont observées (*figure 2.33 a,b,c*). De nombreuses particules d'or sont présentes pour la formulation 75-10-15 / $[KAuCl_4] = 10^{-2}M$ (*figure 2.33b*).

En ce qui concerne la formulation PC-ODA, des oignons sont fréquemment observés, et ils comportent une ou deux particules d'or (*figure 2.33d*).

Ainsi les observations de cryoMET confirment celles de microscopie à contraste de phase concernant la structure des oignons. Elles renforcent également l'hypothèse de l'intervention du nombre de particules synthétisées dans la stabilité de l'hybride oignon/nanoparticules d'or. En effet, pour la formulation PC-ODA qui contient encore des oignons après 1h d'irradiation, peu de particules sont observées par MET (*tableau 2.6*) et par cryoMET (*figure 2.33d*). Par contre pour les formulations PC-ODA-monooléine qui ne contiennent que des unilamellaires après 15min d'irradiation, un nombre important de particules est observé par MET et par cryoMET.

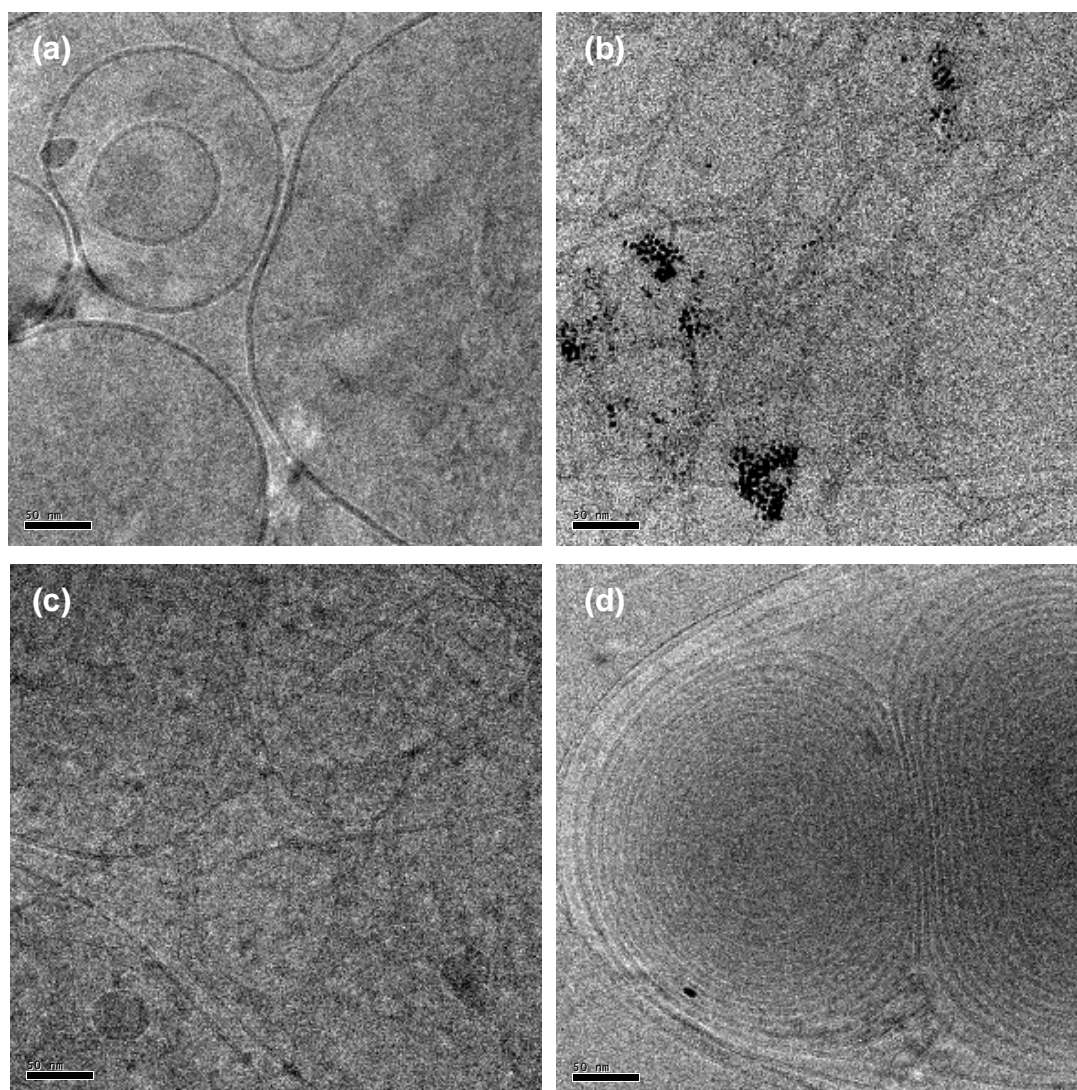


Figure 2.33 : Images de cryoMET : (a) PC-ODA-monooléine 75-10-15 / $[KAuCl_4] = 10^{-2}M$ irradié 8min ; (b) PC-ODA-monooléine 75-10-15 / $[KAuCl_4] = 10^{-2}M$ irradié 15min ; (c) PC-ODA-monooléine 65-15-20 / $[KAuCl_4] = 10^{-2}M$ irradié 15min ; (d) PC-ODA 80-20 / $[KAuCl_4] = 10^{-3}M$ irradié 1h

Plusieurs paramètres pourraient donc contribuer à la destruction des oignons : l'échauffement de l'échantillon durant l'irradiation, la lyse des phospholipides par les rayons UV, et la quantité importante de particules synthétisées. La température atteinte par l'échantillon lors de l'irradiation est de l'ordre de $45^{\circ}C$: cette température ne suffit pas pour induire une déstructuration conséquente de l'oignon. En ce qui concerne une lyse via les rayons UV, les oignons de formulation PC-ODA étant intacts, cette hypothèse ne tient pas. Nous pensons donc que le trop grand nombre de particules est responsable de la destruction des oignons.

4. Conclusion

La photoactivation UV permet de synthétiser des particules plus petites et surtout plus monodisperses en taille par rapport aux populations formées par réduction chimique. Par contre, il est difficile de former des hybrides oignon/nanoparticules d'or car le nombre important de particules formées désorganise l'arrangement lamellaire de l'oignon.

C- Formation de nanoparticules d'or par radiolyse γ

Les expériences d'irradiation γ ont été réalisées en collaboration avec Mona Treguer-Delapierre et Thierry Cardinal (ICMCB, Bordeaux).

La radiolyse γ peut paraître une voie de synthèse exotique, mais elle est connue dans la littérature^{121,122} pour former des particules monodisperses en taille, à température ambiante.

La synthèse de particules d'or au sein des oignons par cette technique est confirmée par la spectroscopie UV-visible : une dispersion d'oignons irradiés pendant 3h par une source de rayons γ présente une bande d'absorption à 565nm correspondant à la bande de résonance plasmon de l'or (**figure 2.34**).

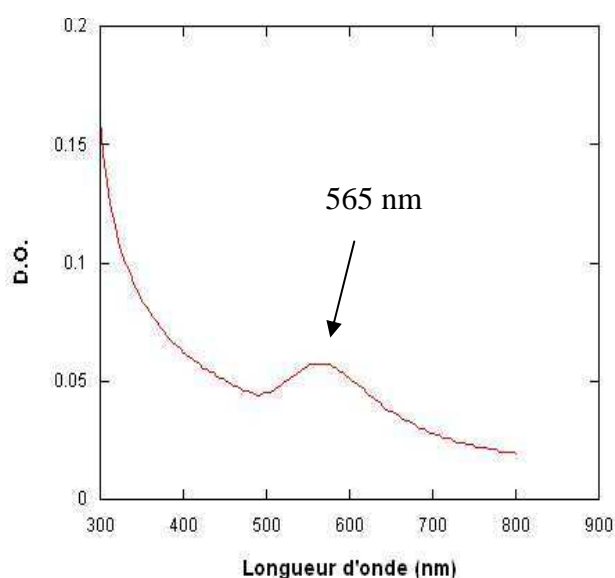


Figure 2.34 : Spectre UV-visible d'une dispersion d'oignons de formulation PC-ODA-monooléine 75-10-15 / $[KAuCl_4] = 10^{-1}M$ irradiés pendant 3h par une source de rayons γ

Le tableau 2.8 présente les temps d'irradiation γ , les changements de couleur des pâtes et les observations par MET pour une formulation des bicouches lipidiques PC-ODA-monooléine 75-10-15 % molaire. Les pâtes sont conservées à l'abri de la lumière avant d'être irradiées par une source ^{137}Cs . Précisons que la solution de sel d'or utilisée pour hydratation a été préalablement dégazée afin d'éviter une réaction entre les électrons solvatés et le dioxygène.

[KAuCl ₄]	Temps d'irradiation γ	Couleur	Observations par MET
10^{-3}M	20min	légèrement rosé	peu de particules
10^{-2}M	30min	rose	beaucoup de particules
	3h	rose	beaucoup de particules
10^{-1}M	30min	rose	beaucoup de particules
	3h	violet	beaucoup de particules

Tableau 2.8 : Changements de couleur des pâtes et observations de MET pour une formulation PC-ODA-monooléine 75-10-15 % molaire, à différents temps d'irradiation γ

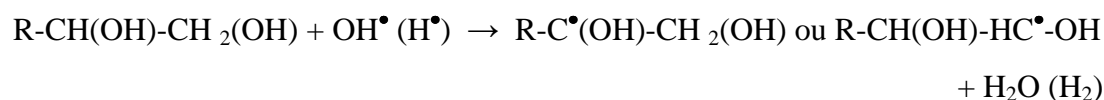
Nous expliquerons d'abord quel est le mécanisme qui entre en jeu lors de la réduction par radiolyse. Nous nous attarderons ensuite sur les étapes de nucléation et de croissance, puis sur l'effet de la croissance des particules sur la stabilité des oignons.

1. Mécanisme de réduction

Les rayonnements γ sont absorbés par le solvant et conduisent à l'excitation et ionisation des molécules d'eau. Quelques nanosecondes après l'absorption du rayonnement, les espèces suivantes sont formées :

$\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{e}^-_{\text{aq}}, \text{H}_3\text{O}^+, \text{H}^\bullet, \text{H}_2, \text{OH}^\bullet, \text{H}_2\text{O}_2$; e^-_{aq} est une espèce très réductrice ; H^\bullet et OH^\bullet sont des espèces plutôt oxydantes.

Ici aussi la monooléine est susceptible de jouer le rôle de « scavenger » et de capter les radicaux libres H^\bullet et OH^\bullet :



Dans ces conditions, la réduction de Au(III) en Au(II) va pouvoir se faire grâce aux électrons solvatés générés par radiolyse de l'eau et grâce aux radicaux $R-C^{\bullet}(OH)-CH_2(OH)$ et $R-CH(OH)-HC^{\bullet}-OH$. La dismutation de Au(II) en Au(III) et Au(I) et celle de Au(I) en Au(0) et Au(II) peuvent avoir lieu.

Contrairement à la photolyse, c'est le solvant (eau) qui fournit les espèces réductrices qui vont amorcer la formation des nuclei.

2. Nucléation et croissance des particules

a)- Monodispersité de la population de particules formées

La figure 2.35 présente un histogramme des particules observées par MET pour l'échantillon PC-ODA-monooléine 75-10-15 / $[KAuCl_4] = 10^{-2}M$, après 3h d'irradiation γ .

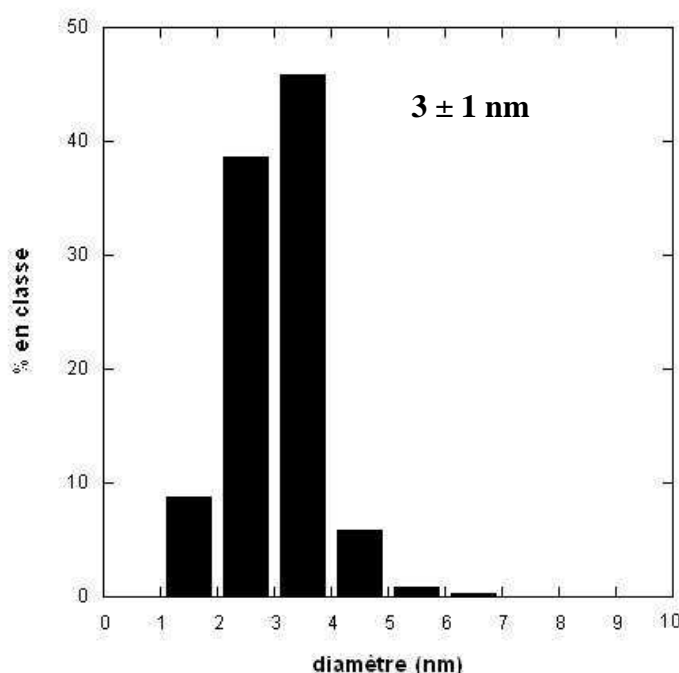


Figure 2.35 : Histogramme de taille pour l'échantillon PC-ODA-monooléine 75-10-15 / $[KAuCl_4] = 10^{-2}M$ après 3h d'irradiation γ (sur 378 particules)

Nous constatons que les particules formées sont petites puisqu'elles mesurent en moyenne 3nm et monodisperses en taille puisque l'écart-type est de 1 nm. Le tableau 2.9 compare les moyennes et écart-type des populations de particules synthétisées à partir d'oignons de formulation PC-ODA-monooléine 75-10-15 / $[\text{KAuCl}_4] = 10^{-2}\text{M}$.

Formulation	Sans irradiation	Avec irradiation UV	Avec irradiation γ
PC-ODA-monooléine 75-10-15 / $[\text{KAuCl}_4] = 10^{-2}\text{M}$	$10 \pm 4 \text{ nm}$	$6 \pm 2 \text{ nm}$ après 30min d'irradiation	$3 \pm 1 \text{ nm}$ après 3h d'irradiation

Tableau 2.9 : Comparaison des moyennes et écart-type sans irradiation, avec irradiation UV de 30min, avec irradiation γ de 3h

L'irradiation γ permet non seulement de diminuer la taille des particules mais aussi d'améliorer la monodispersité (*figure 2.35*) et la quantité de particules synthétisées d'après les images de MET obtenues (*figure 2.36*). La radiolyse de l'eau semble entraîner la formation simultanée d'une quantité importante de nuclei par un apport massif de radicaux. Un nombre limité d'ions précurseurs est par conséquent disponible pour assurer la croissance, ce qui explique une distribution en taille resserrée et une diminution de la taille des particules par rapport aux deux autres méthodes testées (sans irradiation -partie A- et irradiation UV -partie B-).

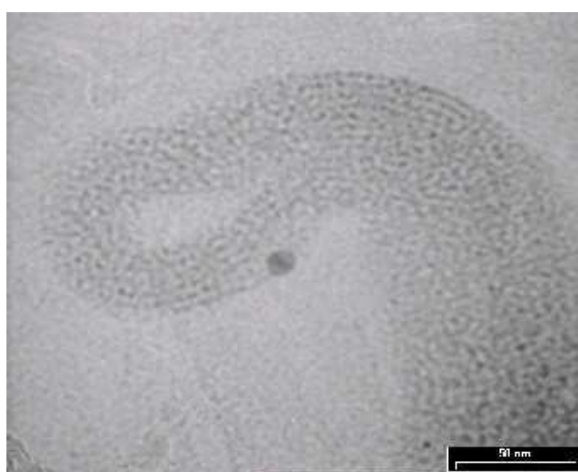


Figure 2.36 : Image de MET pour l'échantillon PC-ODA-monooléine 75-10-15 / $[\text{KAuCl}_4] = 10^{-2}\text{M}$ après 3h d'irradiation γ

b)- Croissance des particules

Les observations par MET nous ont permis d'évaluer l'influence du temps d'irradiation sur l'évolution du profil de distribution en taille des particules. Nous avons comparé les distributions en taille des particules pour une même formulation PC-ODA-monooléine 75-10-15 / $[\text{KAuCl}_4] = 10^{-1}\text{M}$, irradiée pendant 30min (*figure 2.37a*) et pendant 3h (*figure 2.37b*).

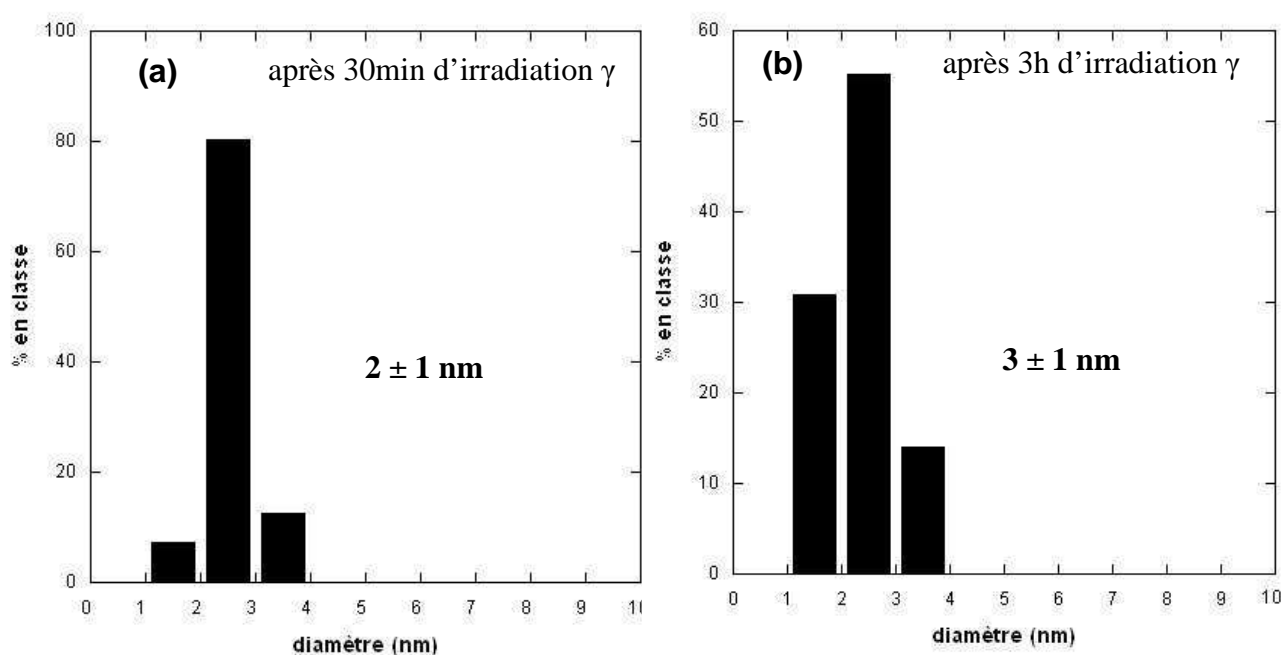


Figure 2.37 : Comparaison des distributions en taille des particules pour l'échantillon PC-ODA-monooléine 75-10-15 / $[\text{KAuCl}_4] = 10^{-1}\text{M}$ (a) après 30min (sur 97 particules), (b) après 3h d'irradiation γ (sur 250 particules)

D'après la figure 2.37, le temps d'irradiation a peu d'influence sur la distribution en taille des particules ce qui suggère que, dès 30 min, tous les ions métalliques sont réduits.

3. Stabilité de l'hybride oignon/nanoparticules d'or

Afin d'évaluer la stabilité des oignons après irradiation et formation des nanoparticules d'or, nous avons observé les dispersions d'oignons de formulation PC-ODA-monooléine 75-10-15 au microscope à contraste de phase. Les observations sont résumées dans le tableau 2.10.

[KAuCl ₄]	Temps d'irradiation γ	Observations au microscope optique
10 ⁻² M	30min	très peu d'oignons, gros MLV
	3h	pas d'oignons, gros MLV, agrégats de MLV, unilamellaires
10 ⁻¹ M	30min	très peu d'oignons, gros MLV
	3h	pas d'oignons, gros MLV, agrégats de MLV, unilamellaires

Tableau 2.10 : Observations au microscope à contraste de phase des dispersions d'oignons pour la formulation PC-ODA-monooléine 75-10-15 et différents temps d'irradiation γ

Le tableau 2.10 montre bien que les oignons sont déstructurés, même après 30min d'irradiation. Nous pouvons penser que là aussi le grand nombre de particules formées est à l'origine de cette déstructuration.

D'autre part, des « morceaux » de phase lamellaire « marquée » par les particules d'or de 2nm (flèches sur les *figure 2.38a* et *2.38b* et *figure 2.36*) sont visibles par MET. Les particules semblent avoir poussé le long de la bicouche. Nous avons mesuré la largeur de la bande observée sur la figure 2.38c : elle est de 6,3nm c'est-à-dire de l'ordre du pas smectique caractérisant la phase lamellaire utilisée qui est de 6,1nm. Les nuclei d'or semble donc s'être formés au niveau des têtes polaires des lipides, et de part la forte affinité existant entre Au⁰ et NH₂, les particules sont ensuite restées « accrochées » à la bicouche lipidique. La figure 2.38d montre plusieurs bicouches enroulées l'une sur l'autre, preuve de l'existence et surtout de la formation des particules à l'intérieur des oignons.

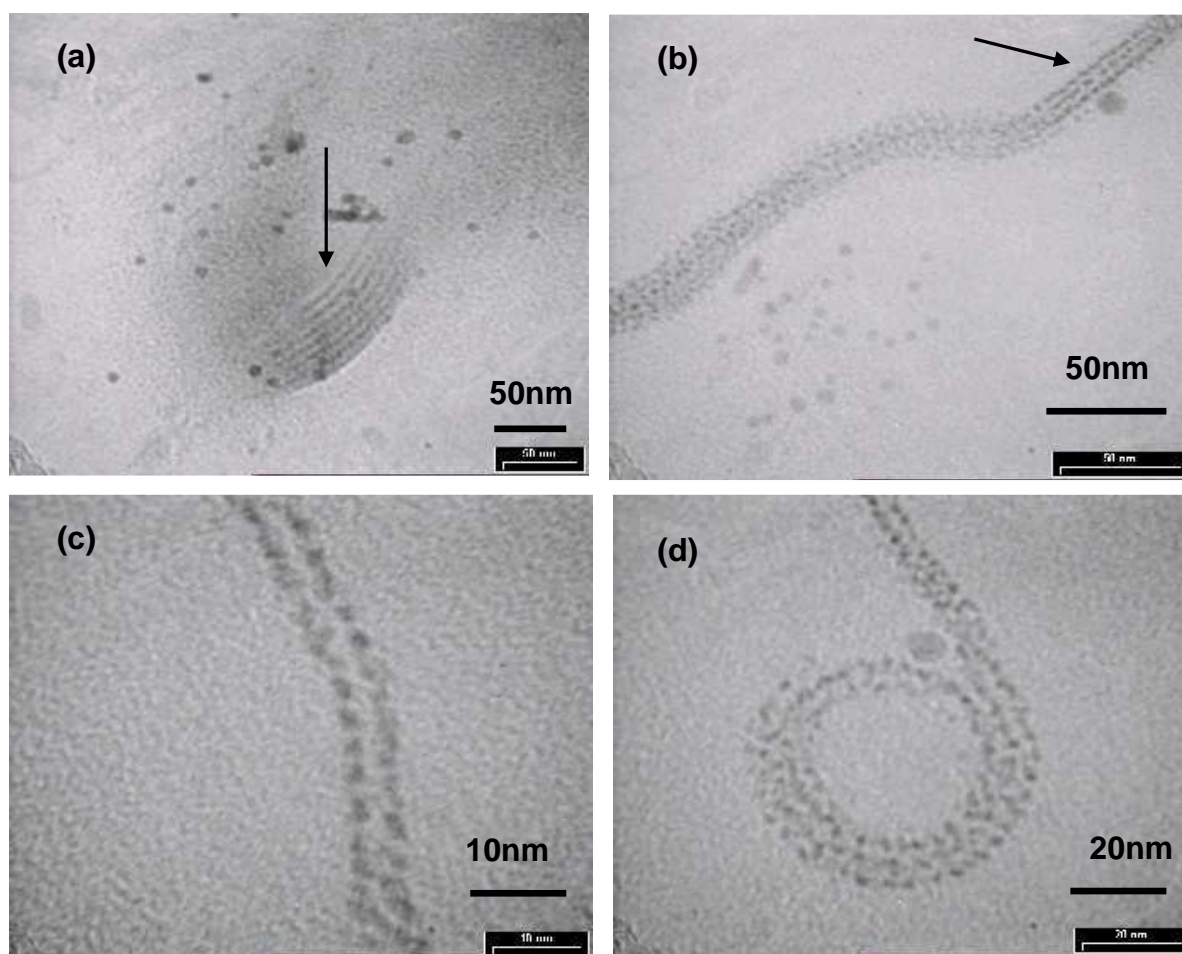


Figure 2.38 : Images de MET de l'échantillon PC-ODA-monooléine 75-10-15 / $[\text{KAuCl}_4] = 10^{-1}\text{M}$ après 3h d'irradiation γ ; (a), (b) et (d) phase lamellaire « marquée » par les particules d'or de 2nm ; (c) bicouche lipidique « marquée » de 6.3nm de largeur

Les oignons sont donc détruits après l'irradiation γ . Les échantillons ne subissent pas d'échauffement donc il n'y a pas d'effet de la température dans la destruction. La coupure des lipides par les rayons γ intervient sûrement de façon minoritaire dans le processus de désorganisation de la phase lamellaire : le nombre considérable de particules formées est le paramètre déterminant.

4. Conclusion

Nous avons vu que l'irradiation γ permet de synthétiser une plus grande quantité de particules et de former une population plus petite et beaucoup plus monodisperse en taille que les autres

voies de synthèse. Le fait que les particules soient de très petite taille et alignées sans coalescer peut leur conférer des propriétés optiques particulières très recherchées, dues à des interactions particule-particule. Du point de vue stabilité de l'hybride oignon/nanoparticules d'or, la structure de l'oignon n'est pas conservée.

V- Conclusion

Le tableau 2.11 permet de comparer les résultats concernant les différentes techniques de préparation des oignons et de synthèse des particules d'or utilisées au cours de ce travail.

L'introduction des ions métalliques par encapsulation au sein des oignons est une technique plus adaptée en terme de taille et de polydispersité des particules d'or formées que la méthode de diffusion. C'est donc cette stratégie de préparation de l'hybride qui a été développée et testée en faisant varier différents paramètres comme la composition des bicouches des oignons, la concentration en sel métallique, le temps d'incubation, mais aussi la voie de synthèse de l'or métallique.

D'après le tableau 2.11, l'insertion de groupements amine primaire au sein des bicouches des oignons permet de diminuer la taille des particules (elle passe de 20-40 nm pour les formulations PC-monooléine à 5-10 nm pour PC-ODA-monooléine) et surtout d'obtenir un hybride stable à la suite de la réduction chimique des ions précurseurs. Cette méthode de préparation pourra donc être utilisée pour réaliser les hybrides oignon/nanoparticules d'or pour des applications où la structure oignon prime (biomédical). Il est à noter cependant la faible quantité de particules par oignon.

Notons qu'une croissance bidimensionnelle et fractale de l'or a été observée dans certaines conditions en présence des groupements NH_2 . Le constat de l'influence de divers facteurs nous a permis de faire l'hypothèse d'un « mécanisme » de croissance des dendrites. En effet, la faible concentration en ions précurseurs introduits, le confinement du réducteur à l'interface bicouche lipidique / eau et surtout la forte affinité électronique existant entre les clusters d'or et les NH_2 semblent être à l'origine d'une croissance de l'or métallique limitée par la diffusion des précurseurs Au(0) .

Mode d'introduction des ions métalliques	Voie de synthèse des particules d'or	Diamètre des particules	Morphologie des particules	Formation d'un hybride oignon/particules d'or stable
diffusion	réduction chimique	20-100 nm	sphériques	non
encapsulation	réduction chimique en l'absence de groupement amine primaire	20-40 nm	sphériques	non
	réduction chimique en présence de groupement amine primaire	4-10 nm	sphériques et dendritiques	oui
	photoréduction par UV	5 nm	sphériques	non
	radiolyse γ	3 nm	sphériques	non

Tableau 2.11 : Comparaison entre les différentes techniques utilisées

Les techniques employant l'irradiation UV ou γ ne permettent pas de conserver la structure de l'oignon intacte, mais elles favorisent la synthèse de particules plus petites et plus monodisperses (5 ± 1 nm par UV, 3 ± 1 nm par γ). De plus, d'après les observations de MET, la quantité de particules formées est améliorée par rapport à la réduction chimique simple. En effet, la très faible taille des particules est un point intéressant puisque la surface d'échange avec les réactifs est augmentée. D'autre part nous pouvons penser que les bicouches lipidiques vont protéger les particules d'or de l'aggrégation. Nous pouvons donc envisager d'utiliser ce type de préparation en vue d'applications dans le domaine de la catalyse (chapitre 4).

Références

- ¹ La Mer V.K. ; Dinegar R.H. *J. Am. Chem. Soc.* **1950**, 72, 4847
- ² Jolivet J-P, *De la solution à l'oxyde*, **1994**, p48-p67, Inter Editions et CNRS Editions, Paris
- ³ Nielsen A.E. ; *Kinetics of precipitation*, **1964**, Pergamon Press Oxford
- ⁴ Balluffi R.W.; Allen S.M.; Carter W.C.; *Kinetics of materials*, **2005**, Wiley
- ⁵ Abecassis B., *Suivi in-situ de la nucléation de nanoparticules d'or*, thèse à l'Ecole Polytechnique-CEA, **2006**
- ⁶ Reiss H. ; *J. Chem. Phys.* **1951**, 19, 482
- ⁷ Yin Y.; Alivisatos A.P.; *Nature* **2005**, 437, 664
- ⁸ Lifshitz I. M.; Slyozov V., *J. Phys. Chem. Solids* **1961**, 19, 3
- ⁹ Wagner C. Z., *Elektrochem.* **1961**, 65, 581
- ¹⁰ Cushing B.L., Kolesnichenko V.L., O'Connor J., *Chem. Rev.*, **2004**, 104, 3893
- ¹¹ Burda C., Chen X., Narayanan R., El-Sayed M., *Chem. Rev.*, **2005**, 105, 1025
- ¹² Daniel M-C., Astruc D., *Chem. Rev.*, **2004**, 104, 293
- ¹³ Pileni M-P., *J. Phys. Chem. C*, **2007**, 111, 9019
- ¹⁴ Murray C.B., Norris D.J., Bawendi M.G., *J. Am. Chem. Soc.*, **1993**, 115, 8706
- ¹⁵ Turkevitch J., Stevenson P.C., Hillier J., *Discuss. Faraday Soc.*, **1951**, 11, 55
- ¹⁶ a) Frens G., *Nature: Phys. Sci.*, **1973**, 241, 20; b) Watson K.J., Zhu J., Nguyen S.B.T., Mirkin C.A., *J. Am. Chem. Soc.*, **1999**, 121, 462

- ¹⁷ Brust M., Walker M., Bethell D., Schiffrin D.J., Whyman R.J., *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1994**, 801
- ¹⁸ a) Verelst M., Ely T.O., Amiens C., Snoeck E., Lecante P., Mosset A., Respaud M., Broto J.M., Chaudret B., *Chem. Mater.*, **1999**, 11, 2702; b) Ely T.O., Pan C., Amiens C., Chaudret B., Dassenoy F., Lecante P., Casanove M-J., Mosset A., Respaud M., Broto J-M., *J. Phys. Chem. B*, **2000**, 104, 695; c) Teranishi T., Miyake M., *Chem. Mater.*, **1999**, 11, 3414; d) Pastoriza-Santos I., Liz-Marzan L., *Langmuir*, **2002**, 18, 2888
- ¹⁹ Teranishi T., Miyake M., *Chem. Mater.*, **1998**, 10, 594
- ²⁰ Longenberger L., Mills G., *J. Phys. Chem.*, **1995**, 99(2), 475
- ²¹ Pileni M-P, *Nature Materials*, **2003**, 2, 145
- ²² Yu W.W., Wang Y.A., Peng X., *Chem. Mater.*, **2003**, 15, 4300
- ²³ a) Wiley B.J., Xiong Y., Li Z-Y., Yin Y., Xia Y., *Nano Letters*, **2006**, 6(4), 765; b) Nehl C.L., Liao H., Hafner J.H., *Nano Letters*, **2006**, 6(4), 683; c) Yong K-T., Sahoo Y., Choudhury K.R., Swihart M.T., Minter J.R., Prasad P.N., *Nano Letters*, **2006**, 6(4), 709
- ²⁴ a) Murphy C.J., Jana N.R., *Adv. Mater.*, **2002**, 14, 80; b) Jana N.R., Gearheart L., Murphy C.J., *J. Phys. Chem. B*, **2001**, 105, 4065; c) Jiang X.C., Brioude A., Pileni M-P., *Colloids Surf. Sci.*, **2006**, 277, 201; d) Jiang X.C., Pileni M-P., *Colloids Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects*, **2007**, 295, 228
- ²⁵ a) Chan Y.N., Schrock R.R., Cohen R.E., *Chem. Mater.*, **1992**, 4, 24; b) Antonietti M., Wenz E., Bronstein L.M., Seregina M.V., *Adv. Mater.*, **1995**, 7, 1000; c) Spatz J.P., Roescher A., Moller M., *Adv. Mater.*, **1996**, 8, 337; d) Moffit M., Eisenberg A., *Chem. Mater.*, **1995**, 7, 1178
- ²⁶ Bronstein L., Kramer E., Berton B., Burger C., Forster S., Antonietti M., *Chem. Mater.*, **1999**, 11, 1402
- ²⁷ Carrot G., Valmalette J.C, Plummer C.J.G., Scolz S.M., Dutta J., Hofmann H., Hilborn J.G., *Colloid Polym. Sci.*, **1998**, 276, 853
- ²⁸ Bosman A.W., Janssen H.M., Meijer E.W., *Chem. Rev.*, **1999**, 99, 1665
- ²⁹ a) Zhao M., Sun L., Crooks R.M., *J. Am. Chem. Soc.*, **1998**, 120, 4877; b) Balogh L., Tomalia D.A., *J. Am. Chem. Soc.*, **1998**, 120, 7355
- ³⁰ Keki S., Torok J., Deak G., Daroczi L., Zsuga M., *J. Colloid Interface Sci.*, **2000**, 229, 550

- ³¹ Amis E.J, Grohn F., Bauer B.J., Akpalu Y.A., Jackson C.L., *Macromolecules*, **2000**, 33, 6042
- ³² Strable E., Bulte J.W.M., Moskowitz B., Vivekanandan K., Allen M., Douglas T., *Chem. Mater.*, **2001**, 13, 2201
- ³³ Crooks R.M., Zhao M., Sun L., Chechik V., Yeung L.K., *Accounts of Chemical Research*, **2001**, 34(3), 181
- ³⁴ a) Hanus L.H., Sooklal K., Murphy C.J., Ploehn H.J., *Langmuir*, **2000**, 16, 2621; b) Manna A., Imae T., Aoi K., Okada M., Yogo T., *Chem. Mater.*, **2001**, 13, 1674
- ³⁵ Pileni M-P, *J. Phys. Chem.*, **1993**, 97, 6961
- ³⁶ Lopez-Quintela M.A., *Curr. Opinion in Colloid and Interface Science*, **2003**, 8, 137
- ³⁷ a) Pileni M-P, *Reverse Micelles*, Elsevier, Amsterdam, **1989** ; b) Pileni M-P., Zemb T., Petit C., *Chem. Phys. Lett.*, **1985**, 118, 414 ; c) Brochette P., Petit C., Pileni M-P., *J. Phys. Chem.*, **1988**, 92, 3505
- ³⁸ a) Robinson B.H., Toprakcioglu C., Dore J.C., Chieux P.J., *J. Chem. Soc., Faraday Trans.*, **1984**, 80, 13 ; b) Fletcher P.D., Howe A.M., Robinson B.H., *J. Chem. Soc., Faraday Trans.*, **1987**, 83, 985
- ³⁹ Chen D.H., Wu S.H., *Chem. Mater.*, **2000**, 12, 1354
- ⁴⁰ Lisiecki I., Pileni M-P., *J. Phys. Chem.*, **1995**, 99, 5077
- ⁴¹ Foos E.E., Stroud R.M., Berry A.D., Snow A.W., Armistead J.P., *J. Am. Chem. Soc.*, **2000**, 122, 7114
- ⁴² Hoefelmeyer J.D., Liu H., Somorjai G.A., Don Tilley T., *J. Colloid Interface Sci.*, **2007**, 309, 86
- ⁴³ a) Bagwe R.P., Khilar K.C., *Langmuir*, 2000, 16, 905 ; b) Setua P., Chakraborty A., Seth D., Bhatta M.U., Satyam P.V., Sarkar N., *J. Phys. Chem C*, 2007, 111, 3901
- ⁴⁴ a) Boutonnet M., Kizling J., Stenius P., Maire G., *Colloids Surf.*, **1982**, 5, 209; b) Yadav O.P., Palmquist A., Cruise N., Holmberg K., *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects*, **2003**, 221, 131
- ⁴⁵ Pileni M-P., *Catal. Today*, **2000**, 58, 151

- ⁴⁶ O'Connor C.J., Seip C.T., Carpenter E.E., Li S., John V.T., *Nanostruct. Mater.*, **1999**, 12, 65
- ⁴⁷ Courty A., Lisiecki I., Pileni M-P, *J. Chem. Phys.*, **2002**, 116, 8074
- ⁴⁸ Pileni M-P, *Langmuir*, **1997**, 13, 3266
- ⁴⁹ Lisiecki I. et coll., *Phys. Rev. B*, **2000**, 61, 4968
- ⁵⁰ Scartazzini R, Luisi P., *J. Phys. Chem.*, **1988**, 92, 829
- ⁵¹ Patakfalvi R., Dekany I., *Colloid and Polymer Science*, **2002**, 280, 461
- ⁵² Adair J.H., Li T., Kido T., Havey K., Moon J., Mecholsky J., Morrone A., Talham D.R., Ludwig M.H., Wang L., *Materials Science and Engineering*, **1998**, R23, 139
- ⁵³ Mann S., Williams R.J.P., *J. Chem. Soc. Dalton Trans.*, **1983**, 311
- ⁵⁴ Li T., Deng Y., Song X., Jin Z., Zhang Y., *Bull. Korean Chem. Soc.*, **2003**, 24(7), 957
- ⁵⁵ Sangregorio C., Wiemann J.K., O'Connor C.J., Rosenzweig Z., *J. Appl. Phys.*, **1999**, 85(8), 5699
- ⁵⁶ a) Tricot Y-M., Fendler J.H., *J. Phys. Chem.*, **1986**, 90, 3369; b) Heywood, Fendler, Mann, *J. Colloid Interface Sci.*, **1990**, 138(1), 295
- ⁵⁷ Bégu S., Durand R., Lerner D.A., Charnay C., Tourné-Péteilh C., Devoisselle J.M., *Chem. Commun.*, **2003**, 640
- ⁵⁸ Bhandarkar S., Bose A., *J. Colloid Interface Sci.*, **1990**, 139(2), 541
- ⁵⁹ Mann S., Hannington J.P., *J. Colloid Interface Sci.*, **1988**, 122(2), 326
- ⁶⁰ Mann S., Hannington J.P., Williams R.J.P., *Nature*, **1986**, 324(11), 565
- ⁶¹ Gauffre F., Roux D., *Langmuir*, **1999**, 15, 3738
- ⁶² Faure C., Guillot S., Weissbecker P., Saadaoui H., *Adv. Mater.*, **2006**, 18, 1141
- ⁶³ Faure C., Derré A., Neri W., *J. Phys. Chem. B*, **2003**, 107, 4738

- ⁶⁴ Regev O., Backov R., Faure C., *Chem. Mater.*, **2004**, 16(25) 5280
- ⁶⁵ Kim D-W, Oh S.G., Yi S.C., Bae S.Y., Moon S.K., *Chem. Mater.*, **2000**, 12, 996
- ⁶⁶ Kreibig U., Vollmer M., *Optical Properties of Metal Clusters*, **1995**, 25, Springer, Berlin
- ⁶⁷ Bohren C.F., Huffman D.R., *Absorption and Scattering of Light by Small Particles*, **1983**, Wiley, New York
- ⁶⁸ Liz-Marzan L., *Materials Today*, **2004**, 7(2), 26
- ⁶⁹ a) N.T.K. Thanh, Z. Rosenzweig, *Anal. Chem.*, **2002**, 74, 1624 ; b) C. Zhang, Z. Zhang, B. Yu, X. Zhang, *Anal. Chem.*, **2002**, 74, 96 ; c) B.H. Schneider, E.L. Dickinson, M.D. Vach, J.V. Hoijer, L.V. Howard, *Biosens. Bioelectron.*, **2000**, 15, 13
- ⁷⁰ a) R. Elghanian, J.J. Storhoff, R.C. Mucic, R.L. Letsinger, C.A. Mirkin, *Science*, **1997**, 277, 1078 ; b) J.J. Storhoff, R. Elghanian, R.C. Mucic, R.L. Letsinger, C.A. Mirkin, *J. Am. Chem. Soc.*, **1998**, 120, 1959 ; c) R.C. Mucic, J.J. Storhoff, C.A. Mirkin, R.L. Letsinger, *J. Am. Chem. Soc.*, **1998**, 120, 12674
- ⁷¹ Hardeveld R., Harbong F., *Surf. Sci.*, **1969**, 15, 189
- ⁷² Connor E. E., et coll., *Small*, **2005**, 1, 325
- ⁷³ Jain P.K., El-Sayed I.H., El-Sayed M., *Nanotoday*, **2007**, 2(1), 18
- ⁷⁴ a) El-Sayed I.H., et coll., *Nano Letters*, **2005**, 5, 829; b) Wang Y. et coll., *Nano Letters*, **2004**, 4, 1689; c) Yelin D., et coll., *Opt. Exp.*, **2003**, 11, 1385
- ⁷⁵ Sokolov K., et coll., *Cancer Res.*, **2003**, 63, 1999
- ⁷⁶ Maruo T., et coll., *Cancer*, **1992**, 69, 1182
- ⁷⁷ a) Lapotko D.O., Lukianova E., Oraesky A., *Lasers in Surgery and Medicine*, **2006**, 38, 631 ; b) Zharov V., Galitovskaya E., Johnson C., Kelly T., *Lasers in Surgery and Medicine*, **2005**, 37, 219
- ⁷⁸ a) El-Sayed M.A., *Acc. Chem. Res.*, **2001**, 34, 257; b) Link S., El-Sayed M.A., *J. Phys. Chem. B*, **1999**, 103, 8410; c) Link S., El-Sayed M.A., *Annu. Rev. Phys. Chem.*, **2003**, 54, 331
- ⁷⁹ a) Chen W.R. et coll., *Cancer Lett.*, **1997**, 115, 25 ; b) Chen W.R. et coll., *Cancer Lett.*, **1996**, 98, 169

- ⁸⁰ Weissleder R., *Nat. Biotechnol.*, **2001**, 19, 316
- ⁸¹ Huang X., El-Sayed I.H., Qian W., El-Sayed M.A., *J. Am. Chem. Soc.*, **2006**, 128, 2115
- ⁸² a) Hirsch *et coll.*, *Proc. Nad. Acad. Sci., USA*, **2003**, 100, 13549 ; b) Oldenburg S.J., *et coll.*, *Chem. Phys. Lett.*, **1998**, 288, 243 ; c) Loo C., Lin A., Hirsch L., Lee M.H., Barton J., Halas N., West J., Drezek R., *Technol. Cancer Res. Treatment*, **2004**, 3, 33 ; d) Alejandro-Arellano M., Ung T., Blanco A., Mulvaney P., Liz-Marzan L., *Pure Appl. Chem.*, **2000**, 72(1-2), 257
- ⁸³ a) Lee K-S., El-Sayed M.A., *J.Phys. Chem. B*, **2005**, 109, 20331; b) Brioude A., *et coll.*, *J. Phys. Chem. B*, **2005**, 109, 13138
- ⁸⁴ Chen J., *et coll.*, *Adv. Mater.*, **2005**, 17, 2255
- ⁸⁵ Haruta M., *et coll.*, *Chem. Record*, **2003**, 3, 75
- ⁸⁶ Zanella R., Olergio S., Henry C.R., Louis C., *J. Phys. Chem. B*, **2002**, 106
- ⁸⁷ a) Bertinchamps F., Attianese A., Mestdagh M.M., Gaigneaux E.M., *Catalysis Today*, **2006**, 112, 165 ; b) Bertinchamps F., Cimpeanu V., Gaigneaux E.M., Parvulescu V.I., *Applied Catalysis A : General*, **2007**, 325, 283 ; c) Debecker D.P., Bertinchamps F., Blangenois N., Eloy P., Gaigneaux E.M., *Applied Catalysis B : Environmental*, **2007**, 74, 223 ; d) Cellier C., Lambert S., Gaigneaux E.M., Poleunis C., Ruaux V., Eloy P., Lahousse C., Bertrand P., Pirard J-P., Grange P., *Applied Catalysis B : Environmental*, **2007**, 70, 406
- ⁸⁸ Louis C., *Nano-objets aux interfaces*, **2007**, 30 Mai, conférence en ligne : <http://www.icmcb-bordeaux.cnrs.fr/NOIS/programme.html>
- ⁸⁹ M-E. Meyre, O. Lambert, B. Desbat, C. Faure, *Nanotechnology*, **2006**, 17, 1193
- ⁹⁰ Esumi K., Hosoya T., Suzuki A., Torigoe K., *Langmuir*, **2000**, 16, 2978
- ⁹¹ Markowitz M.A., Dunn D.N., Chow G.M., Zhang J., *J. Colloid Interface Sci.*, **1999**, 210, 73
- ⁹² Qi L., Gao Y., Ma J., *Colloids and Surface A: Physicochemical and Eng. Aspects*, **1999**, 157, 285
- ⁹³ a) Mukherjee P., Patra C.R., Ghosh A., Kumar R., Sastry M., *Chem. Mater.*, **2002**, 14(4), 1678 ; b) Mukherjee P., Patra C.R., Kumar R., Sastry M., *Phys. Chem. Commun.*, **2001**, 5, 1 ;

c) Mukherjee P., Ahmad A., Mandal D., Senapati S., Sainkar S., Sastry M., Kumar R., *Angew. Chem.*, **2001**, 40, 3585

⁹⁴ Katon J.K., Bentley F.F., *Spectrochim. Acta*, **1963**, 19, 639

⁹⁵ Keller R.J., *The Sigma Library of FT-IR Spectra*: 1401C

⁹⁶ Beebe T.P., Yates J.T., *J. Phys. Chem.*, **1987**, 91, 254

⁹⁷ a) S. Schauermaun, J. Hoffmann, V. Johanek, J. Hartmann, J. Libuda, H-J. Freund, *Catal. Lett.*, **2002**, 84, 209 ; b) R. Narayanan, M.A. El Sayed, *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**, 125, 8340

⁹⁸ K. Nakamoto, *Infrared and Raman Spectra of Inorganic and Coordination Compounds* 5^{ème} édition, **1997**, New York: Wiley

⁹⁹ E. Gachard, H. Remita, J. Khatouri, B. Keita, L. Nadj, J. Belloni, *New J. Chem.*, **1998**, 22, 1257

¹⁰⁰ Faure C., Backov R., *Nanoparticules d'or générées dans les structures multilamellaires de type "oignons"*, **2002**, brevet FR 0215153

¹⁰¹ M-E. Meyre, O. Lambert, C. Faure, *J. Mater. Chem.*, **2006**, 16, 3552

¹⁰² a) D.V. Leff, L. Brandt, J.C. Heath, *Langmuir*, **1996**, 12, 4723 ; b) M. Sastry, A. Kumar, P. Mukherjee, *Colloids Surf. A*, **2001**, 181, 255

¹⁰³ T. Vicsek, *Fractal Growth Phenomena*, **1992**, 2^{ème} édition, Singapour: World Scientific

¹⁰⁴ M.Y. Lin, H.M. Lindsay, D.A. Weitz, R.C. Ball, R. Klein, P. Meakin, *Nature*, **1989**, 339, 360

¹⁰⁵ D.A. Weitz, J.S. Huang, M.Y. Lin, J. Sung, *Phys. Rev. Lett.*, **1985**, 54, 1416

¹⁰⁶ Belleville P., Thèse de l'Université Pierre et Marie Curie, **1991**

¹⁰⁷ A. Swami, A. Kumar, P.R. Selvakannan, S. Mandal, R. Pasricha, M. Sastry, *Chem. Mater.*, **2003**, 15, 17

¹⁰⁸ S. Mandal, S. Datare, P.R. Selvakannan, R. Pasricha, M. Sastry, *Nanotechnology*, **2003**, 14, 878

¹⁰⁹ S. Mandal, S.R. Sainkar, M. Sastry, *Nanotechnology*, **2001**, 12, 358

- ¹¹⁰ M. Sastry, A. Swami, S. Mandal, P.R. Selvakannan, *J. Mater. Chem.*, **2005**, 15, 3161
- ¹¹¹ A. Swami, M. Kasture, R. Pasricha, M. Sastry, *J. Mater. Chem.*, **2004**, 14, 709
- ¹¹² S. Ravaine, G.E. Fanucci, C.T. Seip, J.H. Adair, D.R. Talham, *Langmuir*, **1998**, 14, 708
- ¹¹³ Guinier A., *X-ray diffraction in crystals, imperfect crystals and amorphous bodies*, **1963**, Freeman and Co, San Francisco
- ¹¹⁴ a) Blaurock A.E., *Biochim. Biophys. Acta*, **1982**, 650, 167 ; b) Nallet F., Laversanne R., Roux D., *J. Phys. II*, **1993**, 3, 487
- ¹¹⁵ A. Henglein, *J. Phys. Chem.*, **1993**, 97, 5457
- ¹¹⁶ A. Pal, *Talanta*, **1998**, 46, 583
- ¹¹⁷ K. Mallik, M. Mandal, N. Pradhan, T. Pal, *Nano Letters*, **2001**, 1(6), 319
- ¹¹⁸ a) A. Pal, K. Esumi, T. Pal, *J. Colloid Interface Sci.*, **2005**, 288, 396 ; b) S. Mossmer, J.P. Spatz, M. Moller, T. Aberle, J. Schmidt, W. Burchard, *Macromolecules*, 33, 4791-4798
- ¹¹⁹ a) M. Mandal, S.K. Ghosh, S. Kundu, K. Esumi, T. Pal, *Langmuir*, **2002**, 18, 7792 ; b) M. Mandal, S. Kundu, S.K. Ghosh, T. Pal, *J. Photochem. Photobiol A*, **2004**, 167, 17
- ¹²⁰ Wang, W.; Efrima, S.; Regev, O. *The Journal of Physical Chemistry, B., Materials, surfaces, interfaces and biophysical* **1999**, 103, 5613-5621
- ¹²¹ a) J. Belloni, M.O. Delcourt, C. Leclere, *Nouv. J. Chim.*, **1982**, 6, 507 ; b) J. Belloni, *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.*, **1996**, 1, 184 ; c) A. Henglein, D. Meisel, *Langmuir*, **1998**, 14, 7392
- ¹²² a) M. Treguer, C. de Cointet, H. Remita, J. Khatouri, M. Mostafavi, J. Amblard, J. Belloni, *J. Phys. Chem. B*, **1998**, 102, 4310 ; b) S. Remita, M. Mostafavi, M.O. Delcourt, *Radiat. Phys. Chem.*, **1996**, 47, 275

Chapitre 3

Elaboration d'oignons
magnétiques

L'incorporation de nanoparticules magnétiques au sein de l'oignon va nous permettre d'apporter des fonctionnalités supplémentaires au « vecteur oignon ». En effet, les nanoparticules magnétiques étant connues pour être de bons agents de contraste T_2 pour l'imagerie par résonance magnétique, la possibilité de visualiser le tissu au sein duquel l'oignon se situe est alors envisageable. De plus, les propriétés de ces particules en hyperthermie ont déjà été démontrées et sont en essais cliniques de phase III, c'est-à-dire testées sur l'Homme. Les nanoparticules magnétiques au sein des oignons pourraient donc avoir une triple fonction :

- rendre les oignons injectés visualisables par IRM,
- élever la température localement afin d'augmenter l'efficacité du principe actif et/ou d'endommager les cellules malades,
- faciliter la diffusion du principe actif au sein du tissu, l'augmentation de la température favorisant une plus grande fluidité des bicouches lipidiques constituant l'oignon.

Les applications des oignons magnétiques étant axées vers le biomédical, nous introduirons le concept de vectorisation et nous décrirons brièvement les colloïdes magnétiques déjà étudiés (partie 1). La partie 2 présentera les résultats concernant les deux voies envisagées pour l'incorporation des nanoparticules magnétiques : une synthèse intravésiculaire et l'encapsulation d'un ferrofluide.

PARTIE 1 : INTRODUCTION

I- Contexte général : la vectorisation

A- Problématique

Lors de leur administration, par voie orale ou par injection, la plupart des molécules médicamenteuses sont distribuées dans tout le corps. Pour obtenir une concentration suffisante dans la zone à traiter, il est nécessaire d'administrer des doses de médicaments importantes. Leur accumulation dans les organes ou tissus sains peut entraîner une toxicité chronique du traitement, provoquant des effets secondaires mal supportés par le patient. La chimiothérapie anti-cancéreuse par exemple utilise des molécules cytotoxiques dont l'administration nécessite une évaluation sérieuse de la balance risque/bénéfice. De plus, selon leurs propriétés physico-chimiques, les principes actifs vont franchir plus ou moins facilement les différentes barrières physiologiques. La faible perméabilité de la barrière hémato-encéphalique diminue notamment l'efficacité des traitements contre les tumeurs cancéreuses du cerveau ou contre les maladies neurodégénératives (Alzheimer, Parkinson)¹.

L'optimisation de la sélectivité des molécules actives afin de renforcer leur efficacité thérapeutique, mais aussi d'améliorer la qualité de vie du patient, est l'une des principales motivations de la médecine actuelle. C'est tout l'enjeu de la vectorisation, c'est-à-dire **le transport contrôlé de principes actifs du site d'administration vers le site d'action**. La vectorisation constitue un ensemble multidisciplinaire d'activités visant à mettre au point des vecteurs, et à comprendre et maîtriser les nombreux paramètres physiologiques et cellulaires permettant d'acheminer les molécules biologiquement actives jusqu'à leur cible.

Plusieurs stratégies de vectorisation peuvent être utilisées : le choix dépend des caractéristiques de la maladie et des tissus affectés, des propriétés chimiques et biologiques du médicament, de la durée du traitement, etc. Les modes de vectorisation impliquent soit la **modification chimique directe** de la molécule médicamenteuse par un agent de ciblage, soit l'utilisation d'un « **porteur** » ou « cargo » pour transporter et protéger la molécule active

jusqu'au site d'action. Les voies d'entrée des vecteurs au sein du tissu-cible peuvent être divisées en deux catégories :

- le **ciblage passif**, utilisant la plus grande perméabilité des tissus malades dans le cas de vecteurs de taille moléculaire², ou le système réticulo-endothélial (SRE) dans le cas de vecteurs particuliers³,

- le **ciblage actif**, nécessitant un adressage spécifique du médicament vers un certain type de cellules par un agent de ciblage.

Afin de réaliser un ciblage actif, il est possible d'exploiter deux systèmes de « clés » : ligand/récepteur membranaire et antigène/anticorps.

Par exemple, modifier la molécule médicamenteuse ou le « porteur » par des ligands visant spécifiquement les récepteurs de l'acide folique (ou de son conjugué, le tétrahydrofolate, vitamine B9) peut être intéressant pour la délivrance de médicaments dans le cas de cancers, de maladies infectieuses et auto-immunes⁴. En effet, la prolifération des cellules dépend de leur capacité à acquérir cette vitamine. Ces récepteurs sont donc surexprimés à la surface de nombreux types de cellules cancéreuses (ovaire, sein, colon, lymphes, prostate, nez, gorge, cerveau)⁵, de certaines cellules épithéliales et de macrophages⁶. La conjugaison de l'acide folique au poly(éthylène glycol) (PEG) a permis de délivrer avec succès des agents chimiothérapeutiques⁷, photosensibles⁸ ou des oligonucléotides⁹.

Les anticorps (ou leurs fragments) fournissent de bons ligands pour le ciblage. Ils sont souvent beaucoup plus tissu-spécifiques que les petits ligands comme l'acide folique. Les immunotoxines sont composées d'un ou plusieurs principes actifs conjugués à un anticorps monoclonal (liaison covalente)¹⁰. Après injection dans l'organisme, l'anticorps permet la fixation du vecteur sur les récepteurs antigènes exprimés spécifiquement par les cellules cibles. L'efficacité de ce type de vecteur a été démontrée *in vivo*. Par exemple, Embelton *et coll.* ont observé l'arrêt de la croissance d'un mélanome humain greffé chez la souris par traitement avec ce type de produit¹¹.

Les stratégies employant des molécules actives greffées directement à un agent de ciblage présentent certaines limitations :

- la quantité de médicament administré est limitée par le nombre de molécules fixées à un ligand.

-le principe actif est fixé de manière réversible de façon à permettre sa libération. Il peut donc être libéré au cours de sa diffusion dans l'organisme avant même d'avoir atteint sa cible.

-il n'est pas protégé des interactions avec les biomolécules du plasma.

Ces limitations ont conduit les chercheurs à s'orienter vers des vecteurs favorisant à la fois la protection de la molécule d'intérêt, sa concentration et sa libération dans le tissu ciblé.

B- Les vecteurs particuliers

Il existe différents types de vecteurs particuliers, chacun étant adapté à une stratégie thérapeutique. Le principal critère déterminant l'usage d'un vecteur particulier est sa **taille**. Les microparticules de plus de 1 μ m, trop grosses et provoquant des occlusions artérielles, sont par exemple utilisées dans le cas de traitements du cancer du foie, qui consistent à ralentir la prolifération des cellules cancéreuses en provoquant une embolisation artérielle¹². Les particules d'un diamètre inférieur à 1 μ m quant à elles peuvent circuler dans les vaisseaux capillaires, et, si elles sont de taille inférieure à 100nm, elles peuvent diffuser au travers des parois des capillaires sanguins. La vectorisation est donc possible avec des particules submicroniques, qui peuvent être adressées vers la zone d'intérêt soit par ciblage actif (brièvement décrit dans la partie I-A), soit par ciblage passif.

Le système immunitaire est à l'origine du recrutement « spontané » des vecteurs particuliers dans les tissus comportant des macrophages en grand nombre comme le foie et le système lymphatique (rate et ganglions)¹³. Il est donc possible de cibler ces organes : c'est le ciblage passif via le système réticulo-endothélial (SRE). Lors de la phagocytose, le macrophage adhère à la surface du corps étranger, puis l'enveloppe pour former un phagosome¹⁴. L'adhésion du macrophage à la surface du vecteur particulier peut être due soit à des interactions attractives de type Van der Waals, soit à la formation de liaisons entre les récepteurs membranaires et des protéines circulantes, les opsonines, préalablement adsorbées à la surface des corps étrangers. Ce dernier phénomène, appelé **opsonisation**, est un processus qui permet aux macrophages de reconnaître sélectivement les surfaces recouvertes de ces protéines circulantes¹⁵.

La phagocytose dépend entre autres de la **charge portée en surface** par le vecteur particulaire¹⁶. Afin d'augmenter la rémanence vasculaire des vecteurs (mesurée par le temps de demi-vie plasmique, temps nécessaire à l'élimination de la moitié de la dose administrée), **l'adsorption de polymères neutres et hydrophiles** à leur surface a été développée dans les années 80¹⁷. Elle permet de masquer les charges portées en surface¹⁸ et de provoquer une gêne stérique vis-à-vis de l'adsorption des opsonines¹⁹. Les polymères les plus utilisés sont le poly(oxyde d'éthylène) (PEO) et le poly(éthylène glycol) (PEG), reconnus comme étant non toxiques. D'autres polymères hydrophiles comme le dextrane ou la carboxyméthylcellulose permettent de retarder la phagocytose²⁰. On dit que ce type de greffage permet de rendre le vecteur « **furtif** ».

Les avancées en matière de synthèse de nanoparticules permettent de contrôler leur taille et leur chimie de surface. Plusieurs types de nanoparticules constituent de bons candidats pour la vectorisation.

Les nanoparticules de polymères (nanosphères ou nanocapsules) sont constituées de macromolécules enchevêtrées, réticulées ou non, formant un réseau poreux de grande surface spécifique au sein duquel la molécule d'intérêt peut être piégée²¹.

Les nanoparticules métalliques ou d'oxydes métalliques non cytotoxiques et biocompatibles, comme les particules magnétiques d'oxyde de fer ou les nanoparticules d'or, ont également été largement testées comme vecteurs de principes actifs. Grâce à leur chimie de surface, ces nanoparticules peuvent être considérées comme des plateformes pour la mise au point d'un vecteur « multifonctions », en même temps outil de détection, de diagnostique et thérapeutique^{22, 23}.

Les liposomes sont les systèmes les plus abondamment étudiés car ce sont des objets biomimétiques de la membrane cellulaire. Ce sont des vésicules constituées d'une ou plusieurs bicouches organisées en feuillet bimoléculaire de molécules amphiphiles, généralement des phospholipides, renfermant un compartiment aqueux. Les principes actifs liposolubles ou hydrosolubles peuvent respectivement se loger dans la bicouche lipidique ou dans le compartiment aqueux. Leur instabilité *in vivo* du fait des interactions avec les lipoprotéines circulantes, constitue cependant un inconvénient majeur pour leur utilisation comme vecteurs de médicaments²⁴, de même que leur faible taux d'encapsulation.

C- Le vecteur oignon

1. Propriétés

Les oignons constituent de bons candidats pour la vectorisation de principes actifs. Tout d'abord, **leur taille est modulable** en fonction de la formulation et du taux de cisaillement employés : de 100nm à quelques micromètres. Les colloïdes de taille comprise entre 100nm et 1µm peuvent facilement circuler dans les vaisseaux sanguins ; l'injection d'oignons par intraveineuse est donc possible. Ensuite, leur structure « multicouches » leur procure une **grande stabilité** et la capacité de protéger la molécule médicamenteuse. Elle permet par ailleurs de limiter la fuite de la molécule encapsulée comme cela a été montré par exemple pour le glucose²⁵ et la glucose oxydase²⁶. De plus, une grande variété de molécules amphiphiles peut être utilisée pour former les oignons, et notamment des phospholipides : cationiques, anioniques²⁷, neutres²⁸. Suivant la formulation utilisée, il est donc possible de rendre les oignons **biocompatibles**. Enfin, leur fonctionnalisation de surface par des polymères neutres et hydrophiles, comme le poly(éthylène glycol) (PEG), a déjà été réalisée (oignons **furtifs**)²⁹.

2. Encapsulation

L'alternance de bicouches lipidiques et de couches d'eau permet d'encapsuler aussi bien des molécules hydrosolubles qu'hydrophobes. L'avantage du système, par rapport aux liposomes par exemple, est que **la quantité de molécules encapsulées est importante**, que celles-ci soient hydrophobes (le système est riche en lipides de part la succession de bicouches) ou hydrophiles (la majeure partie de la phase aqueuse utilisée pour former la phase lamellaire reste enfermée à l'intérieur des oignons après dispersion).

Des mesures de taux d'encapsulation ont montré que la proportion de molécules encapsulées est élevée. Dans le cas de la glucose oxydase par exemple, le taux d'encapsulation au sein des oignons est de 80%, alors qu'il n'est que de quelques pourcents au sein de liposomes (SUV)²⁶.

Pour une molécule fluorescente hydrophile, la calcéïne, Pascale Chenevier a réalisé au cours de sa thèse³⁰ des mesures de taux d'encapsulation en fonction du taux d'hydratation de la phase lamellaire pour la formulation PC-monooléine 90%-10% molaires (celle qui a été

utilisée ici). Elle a montré qu'il faut trouver un compromis entre une formulation présentant un bon taux d'encapsulation et favorisant la conservation de la structure interne des oignons : c'est le cas pour un taux d'hydratation de la phase lamellaire de 45% en masse présentant un taux d'encapsulation pour la calcéine de 70%.

Dans le cas de molécules plus petites ou d'ions, capables de diffuser au travers des bicouches, il est aussi possible d'obtenir de forts taux d'encapsulation si les oignons sont composés de tensioactifs ayant une forte affinité (électrostatique ou chimique) pour les molécules à encapsuler. Par exemple, l'utilisation d'un tensioactif capable de chélater les ions métalliques divalents via un groupement *N,N*-di(hydroxyéthyl)amine permet d'obtenir un taux d'encapsulation des ions cuivriques de 80%^{31, 32}.

Une large gamme de molécules a déjà été encapsulée au sein des oignons. L'incorporation d'ADN dans les phases lamellaires a été étudiée par Tanja Pott. Elle montre que de fortes concentrations d'ADN plasmidique peuvent être incorporées dans des phases lamellaires de lipides neutres³³. Ces phases lamellaires peuvent être cisailées et il est possible, après dispersion dans un milieu salin hyperosmotique, d'obtenir des suspensions colloïdales contenant de l'ADN³⁴. Des oligonucléotides ont également pu être encapsulés et délivrés avec succès pour des essais de transfections (gène rapporteur luciférase) sur des cellules lymphocytaires et des cellules d'hépatocarcinomes de rat³⁵. Par ailleurs, dans une approche vaccinale, Gaubert *et coll.* ont montré que l'encapsulation d'un antigène au sein de ces édifices augmente fortement son pouvoir immunogène³⁶. Plus récemment, Brigitte Delord a réalisé au laboratoire des essais d'encapsulation et de vectorisation d'une molécule cytotoxique (anticancéreux). Les tests réalisés *in vitro* se sont révélés prometteurs (résultats confidentiels).

3. Ciblage

Afin d'envisager une vectorisation « active », il est nécessaire de rendre les oignons **ciblants**, c'est-à-dire de greffer en surface des ligands spécifiques de certains récepteurs membranaires des cellules visées. Lors de son travail de thèse sur l'étude de l'adhésion spécifique oignons/cellules, Cécile Poirier a mis au point des oignons ciblant, fonctionnalisés en surface par la sous unité B de la toxine de Shiga²⁹. La toxine de Shiga est une toxine bactérienne qui provoque des pathologies graves générant des infections systémiques (colites hémorragiques, syndrome urémique hémolytique ou HUS). Seule la sous unité A est responsable du pouvoir

pathogène. La sous unité B permet la fixation et l'entrée de la toxine dans la cellule cible. Elle reconnaît spécifiquement un récepteur de la surface membranaire, le globotriaosylcéramide Gb3. Ce glycolipide neutre constitue un marqueur tumoral dans les lymphomes des lymphocytes B. Il est aussi fortement exprimé à la surface de certaines cellules cancéreuses comme dans les cancers des ovaires ou du colon. La sous unité B de la toxine de Shiga utilisée comporte une cystéine libre permettant d'envisager de nombreux couplages. Ainsi le greffage de ce ligand à la surface des oignons est réalisé via la réaction entre la fonction thiol de la cystéine libre et la fonction maléimide portée par un lipide constituant les membranes. Des oignons capables de cibler certains types de cellules cancéreuses peuvent donc être mis au point au sein du laboratoire.

Les oignons constituent donc une plateforme prometteuse pour la vectorisation, de part leurs avantages remarquables en terme de modulation de formulation et de taille, d'encapsulation et de stabilité. Toutes ces propriétés découlent de leur structure particulière et de leur mode de préparation. De nombreuses molécules ont déjà été encapsulées au sein de ces édifices et il est possible de les rendre ciblant.

Dans ce contexte, nous avons souhaité améliorer cette plateforme en montrant qu'il est possible d'y incorporer des nanoparticules magnétiques dans le but de faire de l'imagerie médicale et de l'hyperthermie. Dans la partie suivante, nous allons décrire certains colloïdes magnétiques utilisés pour les applications biomédicales citées précédemment, notamment les ferrofluides et un système colloïdal magnétique proche de notre système d'étude, les vésicules unilamellaires lipidiques.

II- Les colloïdes magnétiques

A- Intérêt pour le biomédical

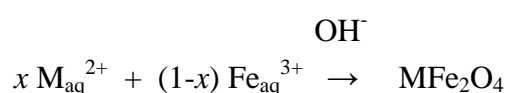
L'intérêt de la recherche biomédicale pour les nanoparticules magnétiques est grandissant car elles présentent de multiples propriétés et applications. Elles constituent en effet un outil à la fois de diagnostic et thérapeutique³⁷. La combinaison nanoparticules magnétiques/principe actif peut permettre de visualiser l'organe au sein duquel le principe actif est délivré (imagerie

par résonance magnétique nucléaire et ciblage par guidage magnétique³⁸). L'encapsulation des nanoparticules magnétiques au sein d'un colloïde peut permettre de les concentrer dans le tissu malade en vue d'un traitement par hyperthermie³⁹. La co-encapsulation nanoparticules magnétiques/principe actif au sein du colloïde permet d'envisager une double action thérapeutique : chimique et thermique. De plus, l'utilisation d'un colloïde thermosensible favorise et contrôle la délivrance du principe actif co-encapsulé⁴⁰. En bref, les combinaisons diagnostic/thérapie sont multiples du fait de la variété de vecteurs qu'il est possible d'élaborer à partir de particules magnétiques.

B- Description des systèmes colloïdaux magnétiques

1. Les ferrofluides

Un ferrofluide est une dispersion colloïdale stable de nanoparticules magnétiques dans un fluide porteur⁴¹. La difficulté associée à la synthèse de nanoparticules magnétiques est liée d'une part à la nécessité pour les particules de diminuer leur énergie de surface, et d'autre part aux interactions magnétiques dipolaires entre particules : celles-ci ont donc une forte tendance à s'agréger. Pourtant, la synthèse de nanoparticules de ferrite MFe_2O_4 de taille contrôlée a pu être réalisée par Massart *et coll.*⁴². La réaction mise en jeu est une coprécipitation en milieu alcalin aqueux d'un sel ferrique et de sels d'un métal divalent M (M = Fe(II), Co(II), Mn(II)) :



Les conditions expérimentales comme la température, le rapport molaire x d'ion métallique divalent, le pH du milieu, la force ionique et la nature des cations^{43, 44} permettent de contrôler le rendement de la réaction et la distribution en taille des particules. La taille moyenne des particules varie de 3 à 20 nm.

Pour des particules de magnétite Fe_3O_4 (alors M = Fe(II)), une oxydation supplémentaire peut conduire à la formation de la maghémite $\gamma\text{-Fe}_2O_3$. La surface des particules présente des charges négatives ou positives en fonction du pH grâce à l'adsorption de groupes hydroxyles amphotères. Les particules sont donc **peptisables** dans l'eau, c'est-à-dire que l'état dispersé

des colloïdes est rendu possible par l'existence de charges en surface. Ceci est seulement possible avec des contre-ions peu polarisants^{42,43}. Le point de charge nulle du ferrofluide ainsi synthétisé est à pH=7 : le domaine de floculation des particules se situe entre pH=6 et pH=10. Il est possible de déplacer le point de charge nulle en fonctionnalisant les particules par différentes molécules par adsorption de ligands (citrate⁴⁵, acide dimercaptosuccinique⁴⁶, acide tartrique⁴⁷, acide oléique⁴⁸, sodium dodécylsulfate⁴⁹).

L'adsorption de macromolécules biocompatibles de nature diverse a été réalisée⁵⁰. Le dextrane est le polymère le plus employé en vue d'applications biomédicales car il permet de prolonger le temps de demi-vie plasmatique des nanoparticules *in vivo* par rapport à d'autres polysaccharides comme le mannose ou le galactose⁵¹. Les interactions entre le dextrane et la surface des nanoparticules sont faibles, et réduisent de ce fait l'efficacité d'un greffage éventuel d'une autre molécule (comme un principe actif) sur le dextrane qui a tendance à se désorber. Un couplage covalent peut néanmoins être réalisé entre la surface de la nanoparticule et le dextrane via des aminosilanes. Il permet de greffer ensuite des PEG sur le dextrane⁵² et des ligands folate sur le PEG⁵³.

2. Les vésicules unilamellaires lipidiques magnétiques

Plusieurs approches ont été abordées afin de former une vésicule unilamellaire lipidique contenant une ou plusieurs particules :

- l'adsorption d'une bicouche lipidique à la surface d'une ou plusieurs nanoparticules magnétiques : ces systèmes ont été appelés « magnétoliposomes »
- l'encapsulation d'un ferrofluide au sein de liposomes.

Bulte *et coll.* ont mis au point les **magnétoliposomes** dans les années 90. Ils ont développé une méthode utilisant les nanoparticules magnétiques comme empreinte pour la formation des vésicules lipidiques⁵⁴. Elle consiste à utiliser des nanoparticules de magnétite recouvertes d'une couche de tensioactif en surface (acide laurique) puis de les soniquer en présence de vésicules lipidiques. Un transfert spontané des lipides a lieu des vésicules vers les particules. Les lipides s'adsorbent à la surface des particules : la bicouche lipidique, sous l'effet de la sonication, se « construit » autour des particules. Ce transfert dépend de multiples facteurs, notamment des propriétés physico-chimiques des phospholipides composants les vésicules. Les magnétoliposomes ainsi obtenus font environ 50nm de diamètre.

De la même manière, des magnétoliposomes furtifs peuvent être mis au point en mélangeant et soniquant les nanoparticules magnétite-acide laurique avec des vésicules dont la membrane est formée de phospholipides modifiés par du PEG⁵⁵. Un taux d'encapsulation de 95 ± 3 % des nanoparticules est trouvé (dosage spectrophotométrique) : chaque liposome contient 1 à 6 particules. Le temps de demi-vie plasmatique de ces magnétoliposomes recouverts de PEG est de 53 min alors que leurs homologues non recouverts sont phagocytés de suite après l'injection. Une autre façon de procéder à la fonctionnalisation par le PEG consiste à mélanger et soniquer des magnétoliposomes avec des SUV fonctionnalisées par PEG⁵⁶. De la même manière, des magnétoliposomes furtifs et fonctionnalisés par une biotine ont été synthétisés^{54,56}.

Avec cette méthode de préparation, il est donc possible de rendre le magnétoliposome furtif et ciblant. L'inconvénient majeur de ce système pour la délivrance de médicaments est le faible volume interne aqueux caractérisant ces vésicules unilamellaires magnétiques.

Le procédé élaboré par Bogdanov *et coll.* donne lieu à ce qu'ils ont appelé des **ferrosomes**⁵⁷. Les nanoparticules de magnétite-dextrane sont partiellement oxydées afin que le dextrane présente des groupements aldéhydes. Ces groupements vont former, en milieu légèrement alcalin, une liaison covalente avec les groupements amines du dioléoylphosphatidyléthylamine DOPE, lipide présent dans le film lipidique avec lequel les particules sont mélangées. Des liposomes (260nm de diamètre) sont ensuite formés par évaporation en phase inverse. Une telle fonctionnalisation des particules permet d'augmenter leur taux d'encapsulation au sein des liposomes de 15 à 49 %.

Martina *et coll.* ont réalisé la préparation de **liposomes magnétiques**⁵⁸. Un film lipidique (phospholipides) est formé puis hydraté par un ferrofluide aqueux (particules de maghémite de 17nm de diamètre en moyenne). Les dispersions ainsi formées sont extrudées sous pression sur des filtres de polycarbonate. Les liposomes obtenus font entre 200 et 300nm de diamètre suivant les formulations (lipides couplés ou non à un PEG). Le taux d'encapsulation du ferrofluide est faible (moins de 10%), par contre la charge en particules au sein d'un liposome, exprimée en nombre de mole de Fe(III) par mole de lipides est relativement élevée (1,8 mole de Fe(III) par mole de lipides).

Conclusion :

Les vésicules unilamellaires lipidiques magnétiques constituent ainsi un système particulière biocompatible dont la taille est contrôlée et dont la fonctionnalisation pour une plus grande furtivité et pour un ciblage actif est connue. Dans le cas des magnétoliposomes, malgré un taux d'encapsulation des particules magnétiques relativement important, le faible volume du compartiment aqueux interne rend l'encapsulation de molécule médicamenteuse hydrosoluble difficile. Dans le cas des liposomes magnétiques par contre, le volume du cœur aqueux est relativement important. L'inconvénient majeur est le taux d'encapsulation caractérisant ces vésicules : que ce soit pour les particules magnétiques ou pour une molécule médicamenteuse (hydro- ou liposoluble), il est très faible (moins de 10%).

Précisons que d'autres systèmes colloïdaux magnétiques sont à l'étude. Citons notamment les micelles de copolymères diblocs (blocs de charges opposées ou blocs hydrophile/hydrophobe) au sein desquels ont déjà été encapsulées des protéines⁵⁹ et des particules magnétiques^{60, 61}. Des dendrimères magnétiques ont également été mis au point par synthèse de nanoparticules d'oxyde de fer en leur sein et leurs propriétés comme agent de contraste ont été étudiées⁶².

PARTIE 2 : RESULTATS

Dans le contexte de la vectorisation, nous avons souhaité apporter de nouvelles fonctionnalités à la « plateforme oignon », notamment en terme d'imagerie médicale et de traitement par l'hyperthermie. Les avancées prometteuses concernant l'utilisation de nanoparticules magnétiques, dues à l'implication de plusieurs domaines de la recherche à l'interface entre chimie, physique et biologie, nous ont conduit à imaginer l'élaboration d'oignons magnétiques. Pour ce faire, deux approches ont été envisagées. L'une utilise le savoir-faire existant déjà dans le groupe concernant la synthèse *in situ* de nanoparticules inorganiques dans l'oignon ; l'autre repose sur l'encapsulation de suspensions de nanoparticules magnétiques en solution aqueuse, constituant un ferrofluide. Les résultats concernant ces deux voies vont maintenant être détaillés.

I- Synthèse intravésiculaire de nanoparticules d'oxyde de fer

A- Formation des précurseurs de charge nulle (ou *monomères*)

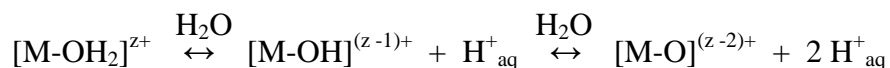
Dans notre système, les ions précurseurs utilisés sont des ions ferreux Fe^{2+} et ferriques Fe^{3+} , issus de sels de chlorure de fer. Ils sont présents au sein de la phase lamellaire, les oignons étant ensuite dilués dans un milieu dispersant basique (nous détaillerons la préparation des hybrides oignons/nanoparticules d'oxyde de fer dans la partie I-B). Le passage des ions en solution à une phase solide est complexe : il se fait via une condensation inorganique sur laquelle nous allons revenir. Nous verrons ensuite les structures cristallines susceptibles de se former dans nos conditions de synthèse.

1. La condensation inorganique⁶³

a)- Propriétés acido-basiques des cations en solution aqueuse

Les cations en solution aqueuse sont solvatés par les molécules d'eau. Le recouvrement des orbitales atomiques (OA) du cation, et moléculaires (OM) de l'eau permet un transfert

électronique entre l'OM $3a_1$ de la molécule d'eau et les OA vides ou partiellement occupées du cation métallique. Il en résulte un affaiblissement de la liaison OH au sein de la molécule d'eau et donc une déprotonation selon les équilibres :



Ces équilibres sont les équilibres d'hydrolyse du cation. Ils peuvent être déplacés en changeant l'acidité du milieu. Le cation métallique peut donc être coordonné à trois types de ligands : aquo (H_2O), hydroxo (HO^-) et oxo (O^{2-}). L'obtention d'espèces aquo, hydroxo, ou oxo dépend de la charge formelle, de la taille, de la nature de l'élément, et aussi des conditions acido-basiques.

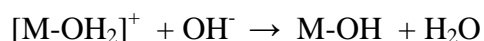
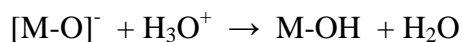
b)- Mécanisme de la réaction de condensation

La condensation des cations en solution mène à la formation de polycations : les cations métalliques sont liés entre eux par des ponts oxygénés HO^- ou O^{2-} . Elle dépend fortement des propriétés acido-basiques des cations mis en jeu. Nous allons voir que c'est une réaction qui peut s'apparenter à une polymérisation organique avec des étapes d'initiation, de propagation et de terminaison. Elle peut se prolonger jusqu'à sa « forme extrême » qu'est la précipitation et aboutir ainsi à un solide.

Détaillons maintenant le mécanisme d'une réaction de condensation.

Initiation :

Lors de cette première étape les cations subissent une **hydroxylation** : l'ajout d'un acide sur un complexe oxo ou d'une base sur un complexe aquo permet de former, à température ambiante, un complexe hydroxylé :



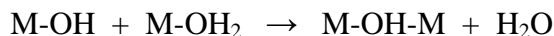
L'hydroxylation constitue donc la réaction d'initiation de la condensation. Elle se fait ici par neutralisation des complexes d'ions métalliques. Elle peut également se faire par thermohydrolyse (chauffage d'une solution aqueuse des ions métalliques précurseurs à 80-100°C) qui favorise une plus grande homogénéité de taille des particules par rapport à la neutralisation. Dans notre cas, nous avons dû choisir la voie de synthèse par neutralisation car

les lipides ne peuvent supporter de température de l'ordre de 100°C sans subir de transformation structurale.

Propagation :

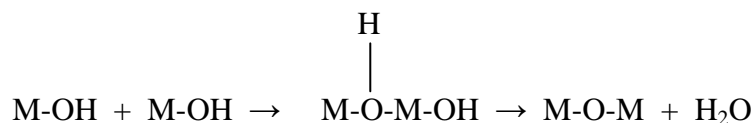
Par l'intermédiaire de l'espèce hydroxylée (M-OH), des ponts oxygénés peuvent se former entre les cations, par addition nucléophile si la coordinence (ou nombre de coordination) du cation métallique n'est pas saturée, ou par substitution nucléophile si la coordinence est saturée. Dans ce dernier cas, le cation métallique (accepteur d'électrons) va être attaqué par un groupe nucléophile (donneur d'électrons), éliminant ainsi le groupe partant coordonné au cation.

La présence d'un ligand hydroxo (HO⁻) dans la sphère de coordination du cation est indispensable pour que la condensation par substitution nucléophile ait lieu. En effet, celui-ci peut jouer le rôle de nucléophile dans le cas où le ligand aquo présent dans la sphère de coordination du cation métallique constitue le groupe partant. Des ponts hydroxo sont alors formés entre les cations, encore appelés groupes « ol » : la réaction est une **olation**.



L'olation est une substitution nucléophile d'ordre 1. Elle concerne les complexe-monomères aquo-hydroxo $[\text{M}(\text{OH})_h(\text{OH}_2)_{N-h}]^{(z-h)+}$ cationiques ($h < z$) ou neutre ($h = z$), formés par des éléments de degré d'oxydation en général inférieur ou égal à 4. La réaction aboutit à des polycations solubles si $h < z$, à des solides si $h = z$. Le solide est un hydroxyde ou un oxyhydroxyde à mesure que la charge formelle du cation croît. La formation d'oxydes nécessite une étape supplémentaire d'oxolation.

Dans le cas de complexe-monomères oxo-hydroxo $[\text{MO}_{N-h}(\text{OH})_h]^{(2N-h-z)-}$ où aucun ligand aquo n'est présent pour constituer le groupe partant, le ligand hydroxo peut jouer ce rôle. En effet, pour un mécanisme de type SN2, le proton du pont ol de l'état de transition, plus acide que le proton du groupe OH terminal, peut attaquer ce groupe OH et ainsi libérer un ligand aquo H₂O. Des ponts oxo sont ainsi formés entre les cations métalliques par une réaction d'**oxolation** :



La réaction d'oxolation concerne essentiellement les éléments de charge formelle élevée ($z \geq 4$). Elle permet de former des oxydes.

Terminaison :

La condensation de complexe-monomères électriquement chargés est arrêtée par une modification de la réactivité des groupes fonctionnels. L'élimination de molécules d'eau lors de la condensation provoque un changement dans l'électronégativité moyenne du produit de réaction et entraîne ainsi une redistribution de la charge au sein du complexe. Dans les polycations (complexe-monomère cationique), la charge formelle des ligands hydroxo OH devient positive et par conséquent leur propriété nucléophile disparaît. Dans les polyanions (complexe-monomère anionique), la charge formelle du cation devient trop faible pour qu'il conserve un caractère électrophile. Dans le cas de complexe-monomères électriquement chargés, la condensation aboutit donc à la formation de polycations ou de polyanions.

Dans le cas de complexe-monomères électriquement neutres, la condensation se poursuit jusqu'à la précipitation et formation d'un solide : hydroxyde, oxyhydroxyde ou oxyde plus ou moins hydraté. Un hydroxyde $M(OH)_z$ est formé à partir d'un complexe-monomère aquo-hydroxo par olation. Il peut ne pas être stable, et sa déshydratation par oxolation peut alors former un oxyhydroxyde ou un oxyde hydraté. La stabilité de l'hydroxyde est liée à la charge formelle de l'eau dans celui-ci. En général, les éléments de charge +2 forment par précipitation des hydroxydes, ceux de charge +3 des oxyhydroxydes (qui évoluent vers des oxydes), ceux de charge supérieure des oxydes plus ou moins hydratés.

2. Condensation des ions ferreux Fe^{2+} et ferriques Fe^{3+} ^{63, 64}

Rappelons que dans notre cas, l'étape d'hydroxylation nécessaire à l'initiation de la réaction de condensation ne peut se faire qu'à température ambiante, donc par neutralisation des complexes du fer par ajout d'une base. Dans cette partie, nous concluons donc sur les phases cristallines qu'il est possible d'obtenir dans ces conditions de synthèse (milieu basique, température ambiante).

La neutralisation des complexes du fer par une base conduit à des gradients locaux de pH (surtout avec NaOH) lorsqu'elle est réalisée dans le « bulk » (en solution) : nous pouvons penser que cet effet va être d'autant plus accentué dans notre système où les ions OH^-

diffusent à travers des bicouches. Ces gradients locaux de pH induisent des variations dans les espèces hydrolysées formées : plusieurs phases cristallines peuvent donc être obtenues.

a)- Condensation d'éléments trivalents : Fe^{3+}

Les ions Fe^{3+} sont solubles en milieu aqueux dans un domaine de pH étroit (pH acide). La neutralisation des complexes du fer Fe(III) forme donc rapidement l'**hydroxyde ferrique** $Fe(OH)_3 \cdot nH_2O$. Cet hydroxyde n'est pas stable et se déshydrate par oxolation pour conduire à des oxyhydroxydes, plus ou moins hydratés : **ferrihydrites**, **goethite** α - $FeOOH$ ou **lépidocrocite** γ - $FeO(OH)$. Notons que les ferrihydrites sont des phases amorphes (pas d'ordre cristallin).

b)- Condensation d'éléments divalents : Fe^{2+}

A température ambiante, la neutralisation des complexes du fer Fe(II) aboutit à la formation de l'**hydroxyde ferreux** stable $Fe(OH)_2$. Notons ici que les ions Fe^{2+} s'oxydent très facilement à l'air ou par l'oxygène dissous dans l'eau. Toutes les phases solides formées via Fe^{3+} sont alors possibles.

c)- Systèmes à valence mixte : Fe^{2+}/Fe^{3+}

La précipitation des ions ferreux Fe^{2+} et ferriques Fe^{3+} dans un rapport $Fe^{2+}/Fe^{3+} = 0.5$ à $pH > 9$ donne lieu à un oxyde de structure spinelle inverse, la **magnétite** stoechiométrique Fe_3O_4 . La réaction est la suivante :



La formation du réseau spinelle inverse de la magnétite peut être représentée par l'assemblage de motifs tétramères $[Fe_4(OH)_{10}(OH_2)_6]^0$, motifs mixtes ferriques-ferreux qui peuvent constituer un modèle des germes du solide. La condensation de ces espèces par oxolation forme des chaînes, puis des plans. L'ion ferrique octaédrique $Fe(OH)_3(OH_2)_3$ en excès permet de former des ponts Fe-O-Fe entre les plans, par oxolation.

Lorsque le rapport des ions Fe^{2+}/Fe^{3+} est inférieur à 0.5, c'est-à-dire lorsque la quantité d'ions ferreux est trop faible, la structure spinelle est conservée mais elle comporte des lacunes. Ce phénomène peut facilement se produire car la magnétite a tendance à s'oxyder par

chimisorption de l'oxygène de l'air. La magnétite est alors sous-stoechiométrique en Fe(II) : le domaine de non-stoechiométrie est assez large, sa forme la plus « lacunaire » étant la **maghémite** $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$.

d)- Conclusion concernant les structures cristallines attendues

Dans les conditions de synthèse que nous avons choisies (milieu basique, température ambiante), il est donc possible de former six phases cristallines : goethite $\alpha\text{-FeOOH}$, lépidocrocite $\beta\text{-FeO(OH)}$, magnétite Fe_3O_4 , maghémite $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$, hydroxyde ferrique Fe(OH)_3 et hydroxyde ferreux Fe(OH)_2 . Notons que Fe(OH)_3 est très peu stable. Des ferrihydrites amorphes peuvent également se former.

B- Principe de fabrication des hybrides oignon/oxyde de fer

Nous avons vu dans le paragraphe précédent qu'il est nécessaire d'ajouter une base aux cations Fe^{2+} et Fe^{3+} afin d'obtenir les complexe-monomères qui vont s'associer pour former les premiers nuclei.

Le mélange lipide-tensioactif PC-monooléine (90-10% molaire) est hydraté par une solution aqueuse d'ions ferreux Fe^{2+} et ferriques Fe^{3+} (le rapport entre le nombre de moles de Fe^{2+} et le nombre de moles de Fe^{3+} varie suivant les échantillons), dans les proportions habituelles c'est-à-dire 55% en masse de lipides/ 45% en masse de solution aqueuse. Après homogénéisation par 3 cycles mélange à la spatule/centrifugation (à 5000 tours/minute, 25°C, pendant 3min), la phase lamellaire ainsi obtenue est laissée reposée pendant 3 jours (**figure 3.1-a**). Elle est ensuite cisailée en cellule de Couette (à une vitesse de 250 tours/minute soit un taux de cisaillement de $5,2 \cdot 10^3 \text{ s}^{-1}$) et on obtient alors des oignons au contact les uns des autres, sous forme de pâte (**figure 3.1-b**). La base (NaOH ou NH_4OH) est introduite dans le milieu dispersant et les ions OH^- vont diffuser du milieu dispersant vers l'intérieur des oignons par gradient de pH (**figure 3.1-c**).

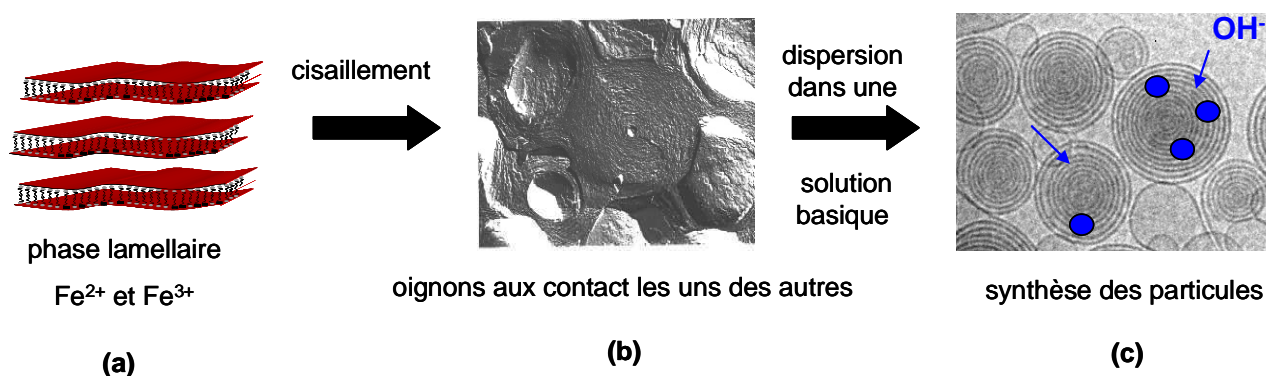


Figure 3.1 : Principe de préparation d'hybrides oignon/nanoparticules d'oxyde de fer par diffusion des ions OH^- : (a) phase lamellaire hydratée par la solution de chlorures de fer FeCl_2 et FeCl_3 ; (b) image de MEB d'oignons après cryo-fracture ; (c) image de cryo-MET d'une dispersion d'oignons. Les nanoparticules sont symbolisées par les cercles bleus.

Les réactifs mis en présence doivent « **théoriquement** » donner lieu à la réaction suivante :



c'est-à-dire à la formation de magnétite. D'après cette réaction, le rapport molaire entre les ions Fe^{2+} et Fe^{3+} doit être de 0,5 pour obtenir la magnétite stoechiométrique. Mais les ions Fe^{2+} s'oxydant facilement à l'air de même que la magnétite, et les solutions n'étant pas dégazées, nous avons choisi de travailler dans un rapport $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+} = 0,66$ ⁵⁴ et $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+} = 1$.

Le pH de la solution aqueuse $\text{FeCl}_2/\text{FeCl}_3$ est de 1,5. Les observations de microscopie optique montre une déstructuration des oignons à ce pH. Il est donc nécessaire de travailler dans un milieu tamponné : nous avons choisi le tampon acétate de $\text{pK}_a = 4,85$. Notons que pour ce pH nous n'avons pas observé de précipitation des ions Fe^{3+} aux concentrations utilisées.

D'autre part, les oignons peuvent subir un choc osmotique se produisant lorsqu'une trop grande différence de force ionique existe entre la solution encapsulée et le milieu dispersant. Si la force ionique de la solution encapsulée est supérieure à celle de la solution dispersante, alors les molécules d'eau vont diffuser vers l'intérieur des oignons afin de la diminuer : les oignons « gonflent » et finissent par se déstructurer. Dans le cas inverse, les oignons « se rétractent ». Dans notre cas, c'est le premier phénomène qui a lieu comme le montre la figure 3.2.

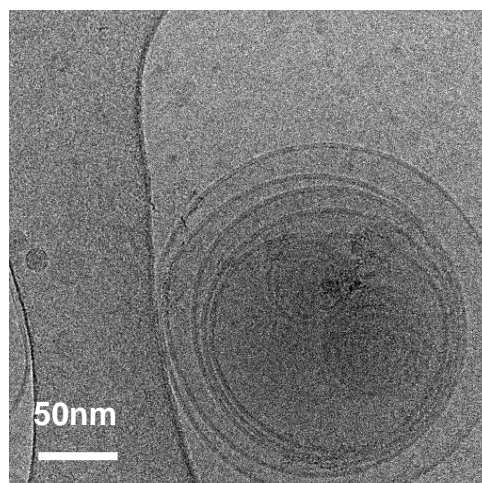


Figure 3.2 : Images de cryoMET d'oignons préparés sans tenir compte de la différence de pression osmotique interne / externe

Afin de limiter ce phénomène, il est donc nécessaire de contrôler la force ionique de chacun des milieux. Pour cela, nous avons mesuré la force ionique des solutions encapsulée et dispersante grâce à un osmomètre.

La figure 3.3 présente la droite d'étalonnage nous permettant de relier la force ionique à la quantité de NaCl nécessaire pour équilibrer les forces ioniques.

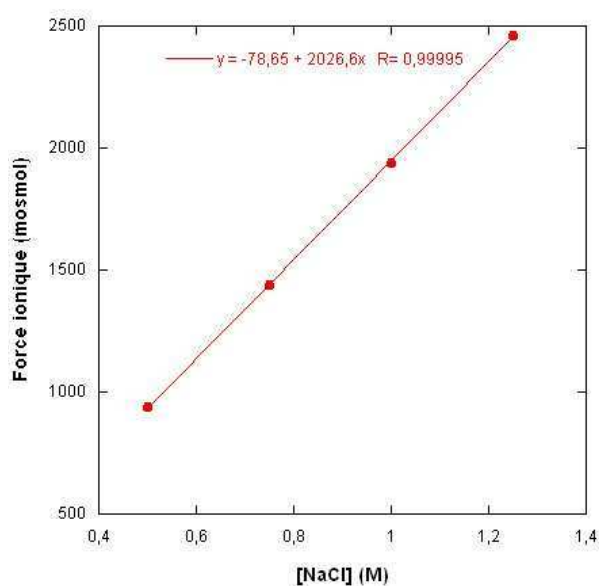


Figure 3.3 : Droite d'étalonnage de la force ionique en fonction de [NaCl]

Le tableau 3.1 récapitule les mesures des forces ioniques des différentes solutions utilisées.

Solutions encapsulées				Solutions dispersantes		
Rapport $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$	$[\text{Fe}]_{\text{totale}}$ (mol.L ⁻¹)	$[\text{CH}_3\text{COOH}]$ = $[\text{CH}_3\text{COO}^-]$ (mol.L ⁻¹)	Osmolarité (mOsmol)	Base	$[\text{NaCl}]$ (mol.L ⁻¹)	Osmolarité (mOsmol)
1	0.1	0.5	1950	$[\text{NaOH}] = 10^{-3}\text{M}$	1,05	1950
				ou $[\text{NH}_4\text{OH}] = 2\text{M}$	0.4	2000
0.66	0.1	0.5	1700	$[\text{NaOH}] = 10^{-3}\text{M}$	0.9	1740
0.66	0.2	0.5	1920	$[\text{NaOH}] = 10^{-3}\text{M}$	1,05	1950
				ou $[\text{NH}_4\text{OH}] = 2\text{M}$	0.4	2000

Tableau 3.1: Mesure des forces ioniques des différentes solutions utilisées pour la préparation des échantillons

La détermination des concentrations en chlorure de sodium à ajouter s'est faite grâce à la droite d'étalonnage de la figure 3.3. Nous utiliserons donc des solutions encapsulées et dispersantes de même force ionique.

C- Encapsulation des ions ferreux Fe^{2+} et ferriques Fe^{3+}

La première étape avant de synthétiser les particules d'oxyde de fer est de vérifier l'encapsulation des ions ferreux Fe^{2+} et ferriques Fe^{3+} . Plus le taux d'encapsulation des ions précurseurs sera élevé, plus le risque d'une synthèse extra-vésiculaire sera faible. Pour cela nous avons réalisé un dosage des ions Fe^{3+} par spectrométrie d'absorption UV-visible et un dosage des ions Fe^{2+} par oxydo-réduction.

1. Dosage des ions ferriques Fe^{3+}

Le spectre UV-visible d'une solution de chlorure de fer FeCl_3 à 10^{-2}M montre une bande d'absorption à 330 nm (**figure 3.4**) : il est donc possible de réaliser un dosage en mesurant l'absorbance à cette longueur d'onde. En effet, d'après la loi de Beer-Lambert, l'absorbance du soluté est proportionnelle à la concentration en soluté dans le milieu :

$$DO = \varepsilon_{ion} \times l \times [\text{soluté}]$$

avec ε_{ion} le coefficient d'extinction molaire de l'ion Fe^{3+} à 330 nm ($\varepsilon_{ion} = 1332 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1} = 133.2 \text{ m}^2.\text{mol}^{-1}$) et l la longueur du trajet optique ($l=1 \text{ cm}$, longueur de la cuve).

a)- Mise en oeuvre

Les oignons que nous avons utilisés pour mettre en œuvre ce dosage contiennent uniquement des ions Fe^{3+} et sont en solution dans de l'eau distillée. La phase lamellaire a été fabriquée en hydratant les lipides par la solution de chlorure de fer FeCl_3 à 0.2M (55% de lipides, 45% de FeCl_3 en masse). La pâte obtenue a été dispersée dans l'eau distillée à 100mg/mL. Le dosage se fait sur 1mL de dispersion.

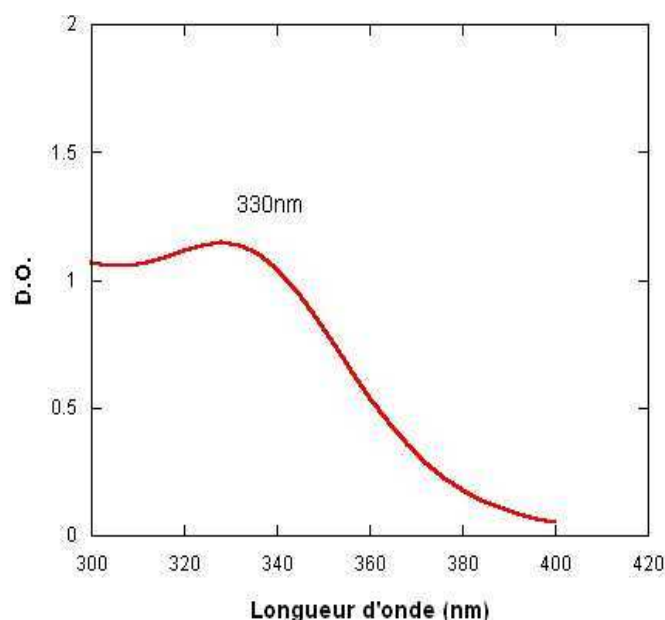


Figure 3.4 : Spectre UV-visible d'une solution de chlorure de fer FeCl_3 à 10^{-2}M

La dispersion d'oignons au sein desquels sont encapsulés les ions Fe^{3+} (oignon/ Fe^{3+}), à 100mg/mL, a été centrifugée à 4°C, pendant 20min, à 7000tours/minute afin de séparer les oignon/ Fe^{3+} (qui forme le culot – **figure 3.5**) des ions Fe^{3+} non encapsulés situés dans le milieu dispersant (qui constitue le surnageant).

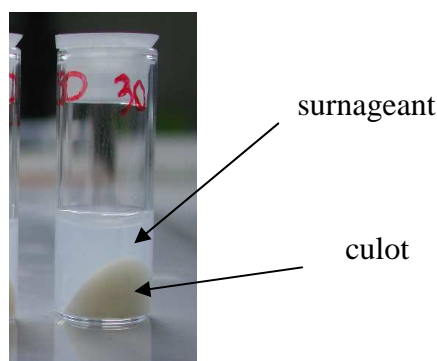


Figure 3.5 : Dispersion d'oignons centrifugés : culot et surnageant

Le surnageant est prélevé : surnageant et culot vont être dosés séparément. Afin de libérer les ions Fe^{3+} encapsulés au sein des oignons et d'éliminer les problèmes de diffusion liée à la turbidité de la dispersion, les oignons sont détruits par ajout d'un détergeant, le Triton X-100 (TX100), les lipides pouvant former avec le tensioactif des micelles mixtes. La présence de TX100 est requise non seulement pour le dosage du culot, mais aussi, dans des proportions moindres, pour le dosage du surnageant. En effet, nous constatons sur la figure 3.5 que des oignons (de petite taille) sont encore présents dans le surnageant, apportant une certaine turbidité à la solution qu'il est nécessaire d'éliminer.

Des essais préliminaires ont montré que la présence de micelles de tensioactifs ou de micelles mixtes lipides/tensioactifs modifie légèrement la valeur du coefficient d'extinction molaire de l'ion Fe^{3+} à 330nm. L'établissement des droites d'étalonnage a donc été fait dans les conditions de destruction des oignons, c'est-à-dire en présence des mêmes quantités d'oignons et de TX100 nécessaire à leur destruction. La figure 3.6 présente ainsi les deux droites d'étalonnage réalisées, l'une spécifique au dosage du culot, l'autre au dosage du surnageant. Les « points de dosage » sont également signalés sur cette figure.

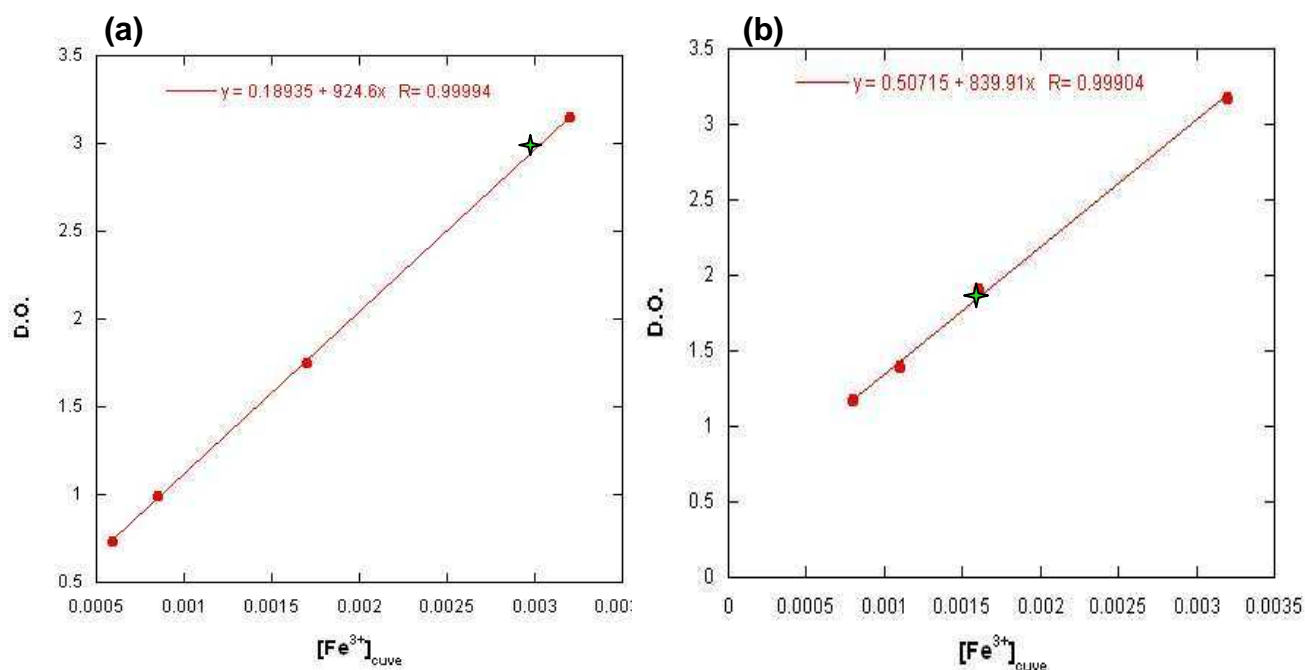


Figure 3.6 : Droite d'étalonnage (a) pour le culot, (b) pour le surnageant

Les points verts représentent les points de dosage.

b)- Résultats

La dispersion d'oignon/ Fe^{3+} dosée est exactement à 106mg/mL. Les oignons ont été préparés en hydratant dans le rapport lipides/ $FeCl_3$ 55/45 % en masse (solution de chlorure de fer $FeCl_3$ à 0.2M). Considérant que la masse volumique de la solution de $FeCl_3$ est celle de l'eau, le nombre de moles de Fe^{3+} total introduit est de : $n_{total} = 9,5 \cdot 10^{-6}$ mol.

Dosage du culot :

Après centrifugation, le culot est dilué à 37mg/mL dans une solution de TX100 (10% volumique). La solution obtenue est limpide après agitation, et l'absorbance à 330nm est mesurée grâce au spectromètre UV-visible. Sur la figure 3.6a, le point vert correspond au point de dosage : $DO = 2.89$, $[Fe^{3+}]_{cuve} = 3 \cdot 10^{-3}$ M. Le volume total de l'échantillon étant de 2.4mL, on peut calculer le nombre de moles contenus dans le culot : $n_{culot} = 7,2 \cdot 10^{-6}$ mol.

$$n_{culot} / n_{total} * 100 = 7.2 / 9.5 * 100 = 76\%$$

Le taux d'encapsulation des ions Fe^{3+} dans les oignons déduit du dosage du culot est donc de 76%.

Afin de valider ce résultat, nous avons réalisé le dosage des ions ferriques du surnageant.

Dosage du surnageant :

Le volume de surnageant prélevé est de 750 μ L et 500 μ L de TX100 à 10% volumique sont ajoutés. La solution est limpide après agitation et la mesure de l'absorbance est faite. Le point vert sur la figure 3.6b correspond au point de dosage : DO = 1.87, $[\text{Fe}^{3+}]_{\text{cuve}} = 1,6 \cdot 10^{-3} \text{M}$. On peut ainsi calculer le nombre de moles contenus dans le surnageant :

$$n_{\text{surnageant}} = 2 \cdot 10^{-6} \text{mol.}$$

Un taux d'encapsulation de 79% en découle.

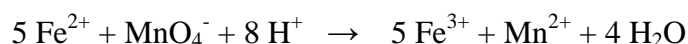
Evaluation de l'erreur expérimentale :

$$n_{\text{culot}} + n_{\text{surnageant}} = n_{\text{total expérimental}} = 9,2 \cdot 10^{-6} \text{mol, soit une erreur de 3\% par rapport à } n_{\text{total théorique}} = 9,5 \cdot 10^{-6} \text{mol.}$$

Nous pouvons donc conclure que le taux d'encapsulation des ions Fe^{3+} dans les oignons est de $77 \pm 5\%$.

2. Dosage des ions ferreux Fe^{2+}

Le dosage des ions Fe^{2+} peut être suivi par potentiométrie en utilisant la réaction d'oxydo-réduction entre les ions Fe^{2+} et MnO_4^- suivante⁶⁵ :



a)- Mise en oeuvre

Montage :

Une électrode de platine (électrode de mesure) et une électrode au calomel saturée (électrode de référence), reliées par un millivoltmètre, sont plongées dans la solution à titrer. Le potentiel du milieu titré est mesuré en fonction du volume de permanganate de potassium KMnO_4 (solution titrante à 65 μ M) ajouté.

Principe :

Le permanganate de potassium étant un oxydant puissant, il va oxyder Fe^{2+} en Fe^{3+} . D'après la formule de Nernst, le potentiel pris par l'électrode de mesure est égal à :

$$E = E^\circ + \frac{0.059}{n} \log \frac{[\text{ox}]}{[\text{red}]}$$

avec n nombre d'électrons transférés dans la demi-réaction.

D'après ceci et les potentiels standards des couples $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ et $\text{MnO}_4^-/\text{Mn}^{2+}$, le potentiel de l'électrode de platine va augmenter.

Les courbes intensité-potentiel de la figure 3.7 nous permettent de trouver le potentiel pris par l'électrode de platine car il s'agit du potentiel pour $i = 0$. En effet, aucun courant ne traverse le système {électrode de platine + millivoltmètre + électrode au calomel saturée} du fait de la résistance infinie du millivoltmètre.

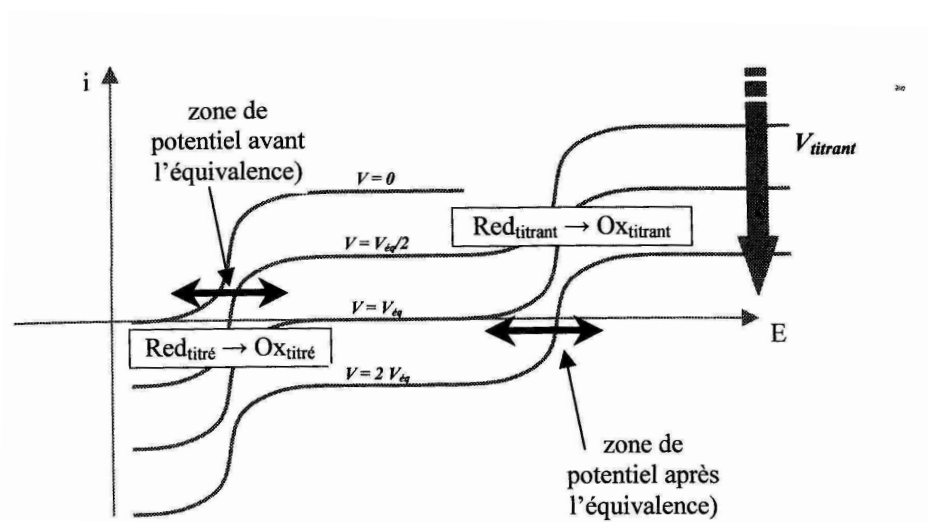


Figure 3.7 : Courbes intensité-potentiel des couples redox

Nous constatons qu'il y a un **saut de potentiel** au moment de l'équivalence.

b)- Résultats

La dispersion d'oignons/ Fe^{2+} à 100mg/mL (préparée avec une solution de chlorure de fer FeCl_2 à 0.2M, soit $n_{\text{total}} = 9,1 \cdot 10^{-6}$ mol dans 1mL) est centrifugée à 4°C, pendant 20min à 7000tours/minute afin de séparer les oignon/ Fe^{2+} des ions Fe^{2+} non encapsulés situés dans le milieu dispersant. Les 100mg du culot équivalant à 100 μL (masse volumique de l'oignon proche de 1 g/cm³), le surnageant fait 900 μL . Mais afin de ne pas prélever d'oignons du culot,

nous n'avons prélevé et dosé que 700 μ L sur ces 900 μ L. La figure 3.8 présente la courbe obtenue pour le titrage du surnageant.

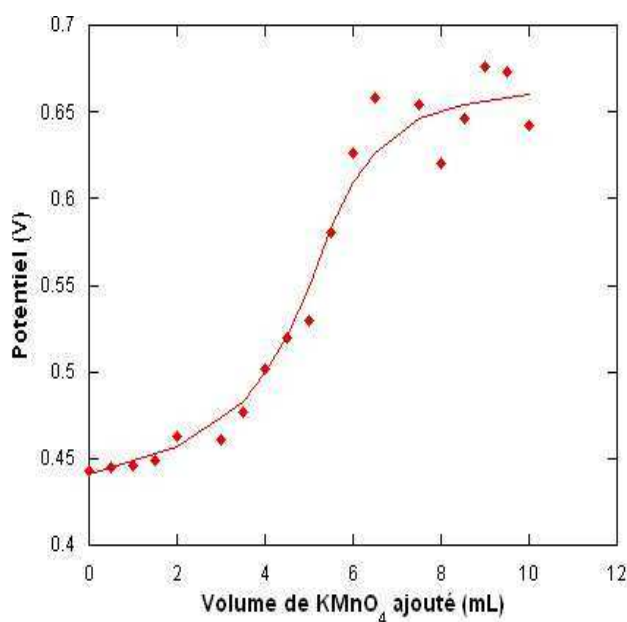


Figure 3.8 : Evolution du potentiel de la solution titrée en fonction du volume de KMnO₄ ajouté : détermination du volume à l'équivalence
(La courbe tracée est un guide pour les yeux.)

Le volume à l'équivalence est déterminé par la méthode des tangentes : $V_{eq} = 5.5\text{mL}$, ce qui correspond à $n_{\text{Fe}^{2+}} = 1,8 \cdot 10^{-6}\text{mol}$ dans 700 μ L, soit $n_{\text{Fe}^{2+}} = 2,3 \cdot 10^{-6}\text{mol}$ dans 900 μ L.

Le taux d'encapsulation est par conséquent d'au moins 75%, car là aussi le surnageant contient de petits oignons dont les ions Fe^{2+} sont comptés comme des ions non encapsulés.

3. Conclusion et discussion

Le taux d'encapsulation des ions Fe^{3+} a pu être déterminé par spectrométrie d'absorption UV-visible : il est de **77 \pm 5%**. Le taux d'encapsulation des ions Fe^{2+} a été mesuré par suivi potentiométrique d'une réaction d'oxydo-réduction impliquant les ions ferreux : il est **d'au moins 75%**. Ici, l'erreur n'a pas pu être évaluée car le dosage par potentiométrie des ions ferreux contenus dans le culot s'est avéré difficile. Il semble que la présence d'une trop

grande quantité de tensioactif perturbe fortement le potentiel de la solution au cours de la réaction de dosage. Ce phénomène est peut-être dû à une adsorption des tensioactifs sur l'électrode de mesure.

De plus, lors de la préparation des échantillons à doser, nous n'avons pas tenu compte des problèmes de pression osmotique. La force ionique interne/externe des oignons n'est pas contrôlée. Les oignon/ Fe^{3+} et oignon/ Fe^{2+} n'ont pas été observés par cryoMET, mais nous pouvons supposer que leur structure interne ressemble à celle de l'oignon présenté dans la figure 3.2. Par conséquent, les conditions optimales ne sont pas réunies, et pourtant les taux d'encapsulation sont élevés.

Les cations métalliques sont connus pour développer des interactions fortes avec les membranes lipidiques cellulaires. Plusieurs publications mettent en avant leur influence sur la fluidité de la membrane. Dans le cas de liposomes modèles, formés de phosphatidylcholine (PC) et de phosphatidylsérine (PS), il a par exemple été montré que les cations métalliques trivalents induisent la formation de « clusters » de PS⁶⁶. Au sein de ces clusters, les chaînes acyles sont moins mobiles, ce qui entraîne une rigidification de la membrane des liposomes. Plus particulièrement, l'effet des ions ferreux et ferriques a été investi sur des membranes modèles⁶⁷. Les lipides utilisés sont les suivants : la dimyristoylphosphatidylcholine (DMPC) et la dimyristoylphosphatidyléthanolamine (DMPE), représentant les classes de phospholipides localisées dans les feuillettes externe et interne de la membrane cellulaire, respectivement. Suwalsky *et coll.* montrent par diffraction des rayons X qu'en présence d'ions Fe^{3+} et Fe^{2+} , les intensités des pics de diffraction liés à la structure lamellaire diminuent lorsque la concentration en ions ferreux ou ferriques augmente⁶⁷. L'effet est moindre pour Fe^{2+} . La présence de ces ions a donc une influence sur l'arrangement lamellaire des lipides. Ils montrent par ailleurs, par analyse thermique différentielle, qu'il existe des interactions fortes entre les têtes polaires des molécules lipidiques et les ions ferreux/ferriques. Là aussi, ces interactions modifient l'assemblage des chaînes acyles, formant des domaines membranaires et augmentant la rigidité de la membrane. L'effet moindre de Fe^{2+} par rapport à Fe^{3+} est lié aux charges.

L'interaction des ions ferreux/ferriques avec les phospholipides se fait via les groupements phosphates des têtes polaires. En effet, l'acide phosphorique est considéré comme un bon agent complexant des ions ferreux/ferriques⁶⁸. De plus, plusieurs lipides, le premier contenant un groupement phosphate « libre », le deuxième un groupement phosphate protégé par deux

phénols et le troisième ne comportant pas de groupement phosphate, ont été testés. Ils ont été mis en présence d'ions ferreux ou ferriques, puis les échantillons ont été soumis à une chromatographie par HPLC⁶⁹. Il en résulte un pic d'élution supplémentaire dans le cas du lipide comportant un groupement phosphate libre, attribué au complexe lipide-ion ferreux ou lipide-ion ferrique. Ceci met en avant la nécessité de la présence de groupement phosphate libre sur la molécule lipidique pour complexer les ions ferreux/ferriques.

La littérature fait donc état de l'existence d'interactions entre les ions ferreux/ferriques et les lipides via une complexation forte par les groupements phosphates. Au sein des oignons, les groupements phosphates sont largement en excès par rapport aux ions Fe^{2+} ou Fe^{3+} , puisque le rapport nombre de moles de phosphatidylcholine sur nombre de mole d'ions ferreux/ferriques est : $n_{\text{PC}}/n_{\text{Fe}} = 7,5$ dans le cas d'une solution de chlorure de fer à 0,2M. Cette dernière remarque nous permet d'expliquer les forts taux d'encapsulation trouvés.

D- Caractérisation des nanoparticules formées

Nous verrons dans un premier temps dans quelle mesure les différents paramètres de synthèse influence la taille des particules formées, ainsi que l'effet du temps. Ensuite nous caractériserons la structure cristalline et les propriétés magnétiques des nanoparticules, pour finalement nous intéresser à la conservation de la structure oignon en présence des particules.

Notons que dans tout ce qui suit les conditions osmotiques sont contrôlées. Précisons de plus que, dans la présentation des résultats, un échantillon ayant subi un temps d'incubation de 9 jours, sera noté « J=9 ».

Dans tous les cas, les dispersions d'oignons changent de couleur après synthèse des particules (elles passent du jaune au orange-marron). Un cliché de microscopie électronique en transmission typique est montré sur la figure 3.9.

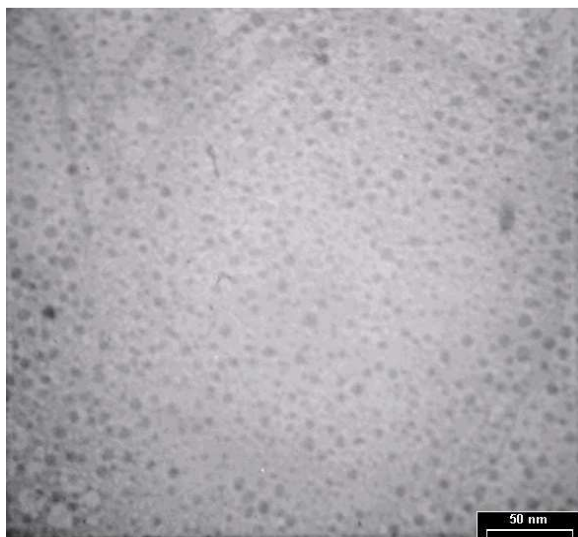


Figure 3.9 : Cliché de microscopie électronique en transmission typique des particules synthétisées *in situ*

1. Taille des nanoparticules formées

Nous avons testé plusieurs conditions de synthèse des nanoparticules d'oxyde de fer dans les oignons. Nous avons fait varier la concentration totale en ions précurseurs Fe^{2+} et Fe^{3+} , le pH du milieu dispersant, la température, et le rapport entre les ions Fe^{2+} et Fe^{3+} . Le tableau 3.2 récapitule les différents échantillons préparés.

a)- Influence des conditions de synthèse

Effet de la concentration en ions précurseurs introduite [Fe] :

Les échantillons R3 et R2, puis O5 et O4 sont comparables. Pour R3/R2, le diamètre moyen passe de 4 nm à 5 nm quand la concentration en fer total augmente, alors que pour O5/O4, il passe de 6 nm à 4 nm. Il est donc difficile de conclure sur l'influence de la concentration en fer introduite car les résultats sur les deux séries observées sont contradictoires.

Nom de l'échantillon	Rapport $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$	[Fe] (M)	[NaOH] = 10^{-3}M pH=10	[NH ₄ OH] = 2M pH=12	Température	Temps d'incubation (jours)	Diamètre (nm)
B1	0.66	0.1	pH = 10	–	25°C	1	3 ± 1 nm
Q4	0.66	0.1	pH = 10	–	25°C	9	6 ± 2 nm
R3	0.66	0.1	pH = 10	–	4°C	9	4 ± 1 nm
O3	0.66	0.2	pH = 10	–	25°C	3	4 ± 1 nm
R2	0.66	0.2	pH = 10	–	4°C	9	5 ± 2 nm
O5	0.66	0.1	–	pH = 12	25°C	7	6 ± 1 nm
Q1	0.66	0.1	–	pH = 12	25°C	9	6 ± 2 nm
Q2	0.66	0.2	–	pH = 12	25°C	5	4 ± 1 nm
O4	0.66	0.2	–	pH = 12	25°C	7	4 ± 1 nm
B2	1	0.1	pH = 10	–	4°C	6	3 ± 1 nm
B4	1	0.1	pH = 10	–	4°C	9	4 ± 1 nm

Tableau 3.2 : Récapitulatif des différents échantillons préparésEffet du pH du milieu dispersant :

Il n'y a pas d'effet du pH du milieu dispersant sur la distribution en taille des particules (comparaison de Q4 et Q1).

Effet de la température :

Durant l'incubation, les dispersions d'oignons ont été conservées soit au réfrigérateur (4°C), soit sur la paillasse (on considérera que la température ambiante est en moyenne de 25°C). La figure 3.10 montre une influence sensible de la température sur la taille moyenne et la polydispersité des particules observées en MET.

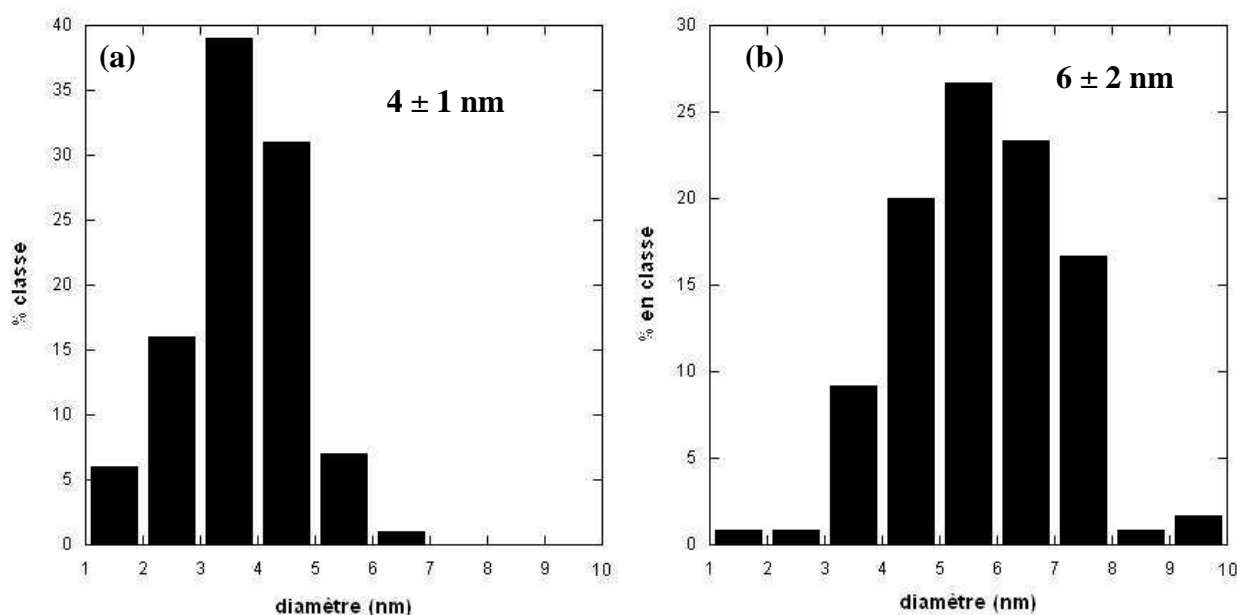


Figure 3.10 : Influence de la température sur la distribution en taille des particules :
(a) à 4°C (R3), (b) à 25°C (Q4)

La taille moyenne des particules passe donc de 4 nm à 4°C (*figure 3.10a*) à 6 nm à 25°C (*figure 3.10b*).

Effet du rapport $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$:

La comparaison des échantillons R3 et B4 montre que la valeur du rapport $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ n'a pas d'influence sur la taille des particules formées.

b)- Effet du temps d'incubation : vieillissement

Le tableau 3.3 permet une comparaison directe des tailles moyennes et des écart-types des particules issues d'échantillons synthétisés dans les mêmes conditions, d'âges différents.

La taille moyenne des particules évolue relativement peu pour les échantillons des lignes 1 (entre J=5 et J=7) et 4 (entre J=7 et J=9) du tableau 3.3. Nous pouvons dire que les particules atteignent le stade final de leur croissance au bout de 7 jours.

Par contre pour les échantillons des lignes 2 et 3 du tableau 3.3, la distribution en taille se déplace vers les grosses particules comme le montre la figure 3.11.

Echantillons	Plus jeune	Plus âgé
$\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}=0.66$; [Fe] = 0.2M, pH=12, 25°C	4 ± 1 nm (Q2) J=5	4 ± 1 nm (O4) J=7
$\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}=1$; [Fe] = 0.1M, pH=10, 4°C	3 ± 1 nm (B2) J=6	4 ± 1 nm (B4) J=9
$\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}=0.66$; [Fe] = 0.1M, pH=10, 25°C	3 ± 1 nm (B1) J=1	6 ± 2 nm (Q4) J=9
$\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}=0.66$; [Fe] = 0.1M, pH=12, 25°C	6 ± 1 nm (O5) J=7	6 ± 2 nm (Q1) J=9

Tableau 3.3 : Taille moyenne et écart-type de particules issues d'échantillons comparables, d'âge différent

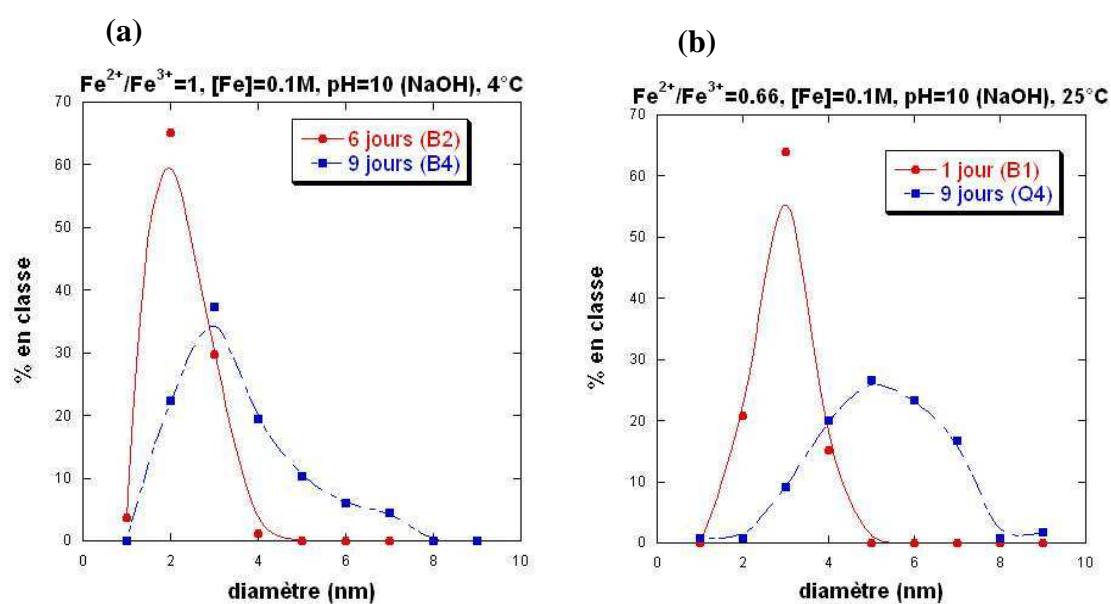
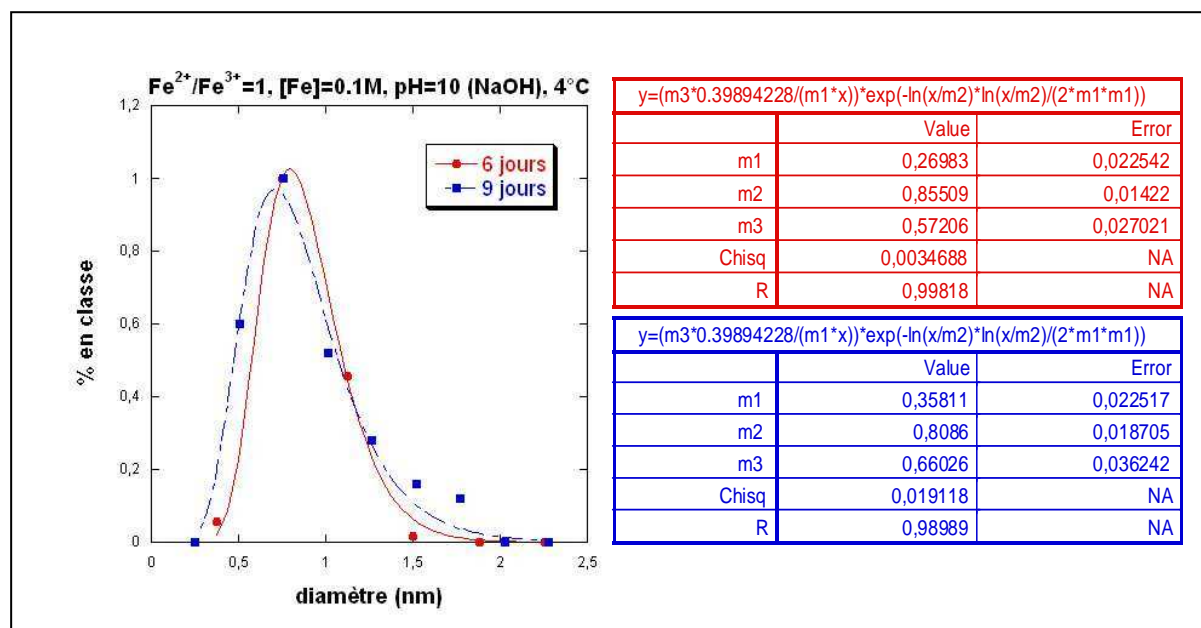


Figure 3.11 : Evolution des distributions en taille des particules en fonction du temps
(Les courbes tracées sont des guides, ce ne sont pas des ajustements.)

Afin de mettre en évidence un éventuel phénomène de mûrissement d'Ostwald, nous avons tracé les distributions en tailles normalisées (*figure 3.12*).

(a)



(b)

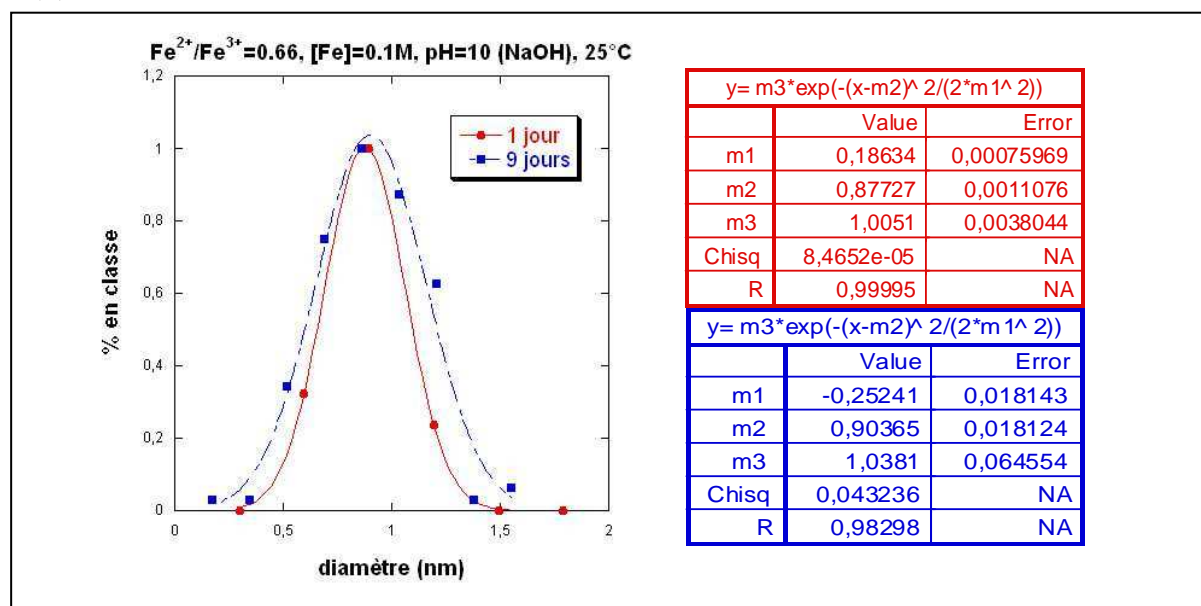


Figure 3.12 : Evolution de la distribution en taille normalisée des particules en fonction du temps. Ajustements : m_2 est la moyenne des D/D_{moyen} et m_1 est l'écart-type sur cette moyenne

Le tableau 3.4 résume les positions des extrema (m_2) des courbes pour chaque échantillon.

Formulation	Position extremum Echantillon le plus jeune	Position extremum Echantillon le plus âgé
$\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}=1$; [Fe]=0.1M, pH=10, 4°C	0.85 ± 0.01 à J=6	0.81 ± 0.02 à J=9
$\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}=0.66$; [Fe]=0.1M, pH=10, 25°C	0.877 ± 0.001 à J=1	0.90 ± 0.02 à J=9

Tableau 3.4 : Position des extrema des courbes

Nous constatons qu'à l'erreur près, les distributions en taille normalisées sont stationnaires : ces échantillons subissent donc un mûrissement d'Ostwald.

c)- Conclusion et discussion

Les deux paramètres qui influencent de manière sensible la distribution en taille des particules sont la température et le temps d'incubation. Le pH quant à lui n'a pas d'effet sur la taille des particules formées.

L'influence de la température a également été mise en évidence lors de la synthèse de nanoparticules de ferrite (magnétite/maghémite) au sein de micelles inverses⁷⁰ : le diamètre moyen passe de 3.7, 5.6 à 7nm lorsque la température varie de 25, 50 à 80°C. De même, la synthèse de particules de magnétite en milieu non confiné montre aussi un effet de la température⁷¹. Le diamètre moyen passe de 35nm à 60°C, à 39nm à 90°C⁷². Les auteurs pensent que, la température accélérant les collisions entre nuclei et monomères (précurseurs de charge nulle), la vitesse d'addition des monomères sur les nuclei augmente, permettant ainsi une croissance plus rapide des particules. Ce raisonnement peut s'appliquer à notre cas.

Concernant l'effet du pH, Jolivet *et coll.* ont mis en évidence son influence, ainsi que celle de la force ionique, dans le cas de la synthèse en solution (bulk) de nanoparticules de magnétite par coprécipitation d'ions Fe^{2+} et Fe^{3+} à température ambiante⁶³. Pour un pH supérieur au point de charge nulle (pH=8 dans ce cas), plus le pH et la force ionique sont élevés, plus les particules sont petites. A force ionique constante, le diamètre moyen des particules passe ainsi de 9nm à pH=10 à 4nm à pH=12. Dans notre cas, il n'y a pas d'effet du pH. La succession des bicouches lipidiques constituant l'oignon peut permettre d'expliquer ceci. En effet, il a été

montré dans le cas de liposomes que le pH interne est inférieur au pH externe, la bicouche phospholipidique assurant un contrôle cinétique de la diffusion des ions OH^- vers le coeur aqueux interne⁷³. La vitesse de diffusion dépend des échanges entre d'éventuels petits anions (peu chargés, comme Cl^- , NO_3^-) présents dans le milieu interne et les ions OH^- du milieu externe. Ces anions favorisent donc la diffusion des ions OH^- : le pH interne augmente très sensiblement lorsque le pH externe augmente, mais pas de façon linéaire⁷⁴. Dans notre cas, des ions peu chargés sont présents dans le milieu comme Cl^- . Ils sont susceptibles de favoriser la diffusion des ions OH^- , et donc une augmentation de $\text{pH}_{\text{interne}}$ avec $\text{pH}_{\text{externe}}$. Seulement, nous pouvons penser que la succession de bicouches lipidiques limite ce phénomène : que le pH externe soit de 10 ou de 12, le pH interne diffère peu.

Concernant l'influence de la concentration en fer sur la taille des nanoparticules, aucun effet n'a été mis en évidence. Dans le cas des synthèses en solution, il est connu que plus le rapport stabilisant/précurseurs est élevé, plus les particules sont petites⁷⁵. Ici, nous pouvons penser que les phospholipides, adsorbés à la surface des particules via les phosphates, jouent le rôle d'agent stabilisant. Ils pourraient donc permettre le contrôle de la taille des particules. Le rapport entre le nombre de moles de phosphatidylcholine et le nombre de moles d'atomes de fer augmente de $n_{\text{PC}}/n_{\text{Fe}} = 7,5$ pour $[\text{Fe}] = 0,2\text{M}$ à $n_{\text{PC}}/n_{\text{Fe}} = 15$ pour $[\text{Fe}] = 0,1\text{M}$. Mais la synthèse se faisant ici en milieu confiné, la mobilité des phospholipides et des nanoparticules est limitée. Ceci peut expliquer l'influence peu importante de l'augmentation du rapport $n_{\text{PC}}/n_{\text{Fe}}$ sur la taille dans notre cas.

L'effet de confinement dû à la structure oignon semble être un facteur déterminant pour la taille des nanoparticules synthétisées : leur diamètre ne dépasse pas la valeur de la distance de répétition entre bicouches lipidiques, qui est de l'ordre de 6nm. Afin de le confirmer, une synthèse des particules en solution aurait été nécessaire, dans les mêmes conditions que celles utilisées pour la synthèse *in situ*.

2. Structure cristalline

Les expériences de diffraction des rayons X aux grands angles ont été réalisées en collaboration avec Eric Lebraud (ICMCB, Bordeaux).

Les conditions de synthèse des particules gouvernent la structure cristalline des espèces formées. Ainsi la concentration en ions précurseurs, le pH, la température mais aussi la présence d'additifs organiques influencent de manière drastique la nature de l'oxyde synthétisé.

Nous avons vu dans la partie I-A-2 que la neutralisation de complexes aquo issus d'ions ferreux et ferriques pouvaient mener à la formation d'hydroxydes $\text{Fe}(\text{OH})_3$ et $\text{Fe}(\text{OH})_2$, d'oxyhydroxydes, la goethite et la lépidocrocite, et d'oxydes, la magnétite et la maghémite.

Pour tous les échantillons testés (B1, Q4, B2 et B4), nous obtenons le même spectre par diffraction des rayons X aux grands angles, celui présenté dans la figure 3.13.

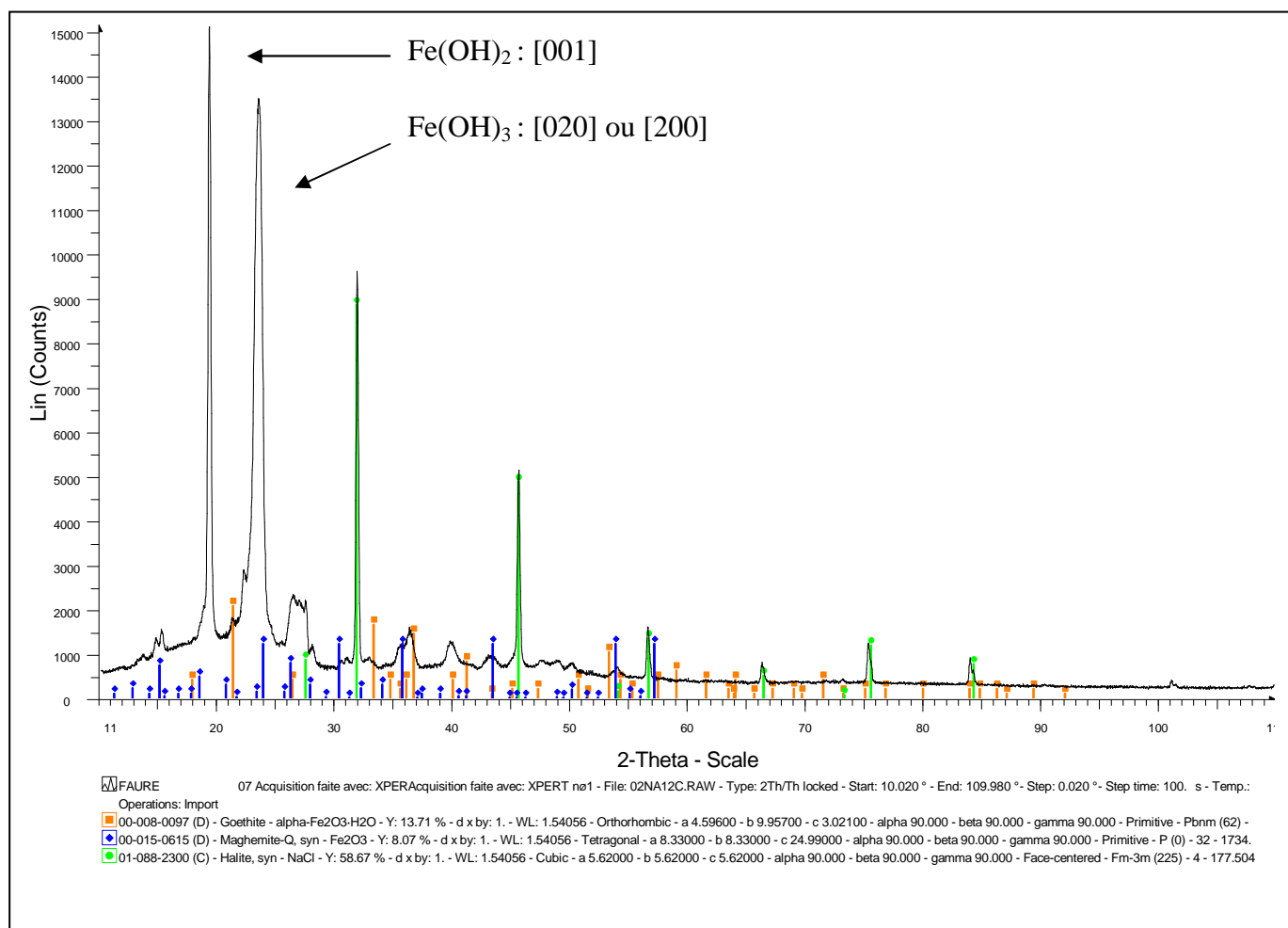


Figure 3.13 : Spectre de diffraction des rayons X aux grands angles pour des oignons

« $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}=0.66$, $[\text{Fe}]=0.1\text{M}$, $\text{pH}=10$, 25°C , $J=1$ »

Le diffractogramme a été dépouillé avec l'aide d'une base de données de fiches cristallographiques (logiciel EVA Diffrac AT de Philips).

- Les pics de diffraction à $2\theta = 31.7^\circ$, 45.5° , 56.6° , 75.3° et 84.0° correspondent respectivement aux plans d'indices de Miller [200], [220], [222], [420] et [422] du **chlorure de sodium NaCl**. Nous rappelons que ce sel a été introduit dans le milieu afin de rétablir l'équilibre osmotique entre le milieu interne et externe de l'oignon.

- Les pics de diffraction à $2\theta = 21.2^\circ$, 33.2° , 35.5° , 36.1° et 36.6° correspondent respectivement aux plans d'indices de Miller [110], [130], [101], [040] et [111] de la **goethite $\alpha\text{-FeOOH}$** . Nous avons vu dans la partie I-A que la goethite est issue de la précipitation directe des ions Fe^{3+} .

La goethite possède la même structure que $\alpha\text{-AlOOH}$ (diaspore) avec une maille orthorhombique. Les anions O^{2-} et OH^- forment un réseau hexagonal compact empilé selon la direction [010] et les ions Fe^{3+} occupent la moitié des sites octaédriques (**figure 3.14**).

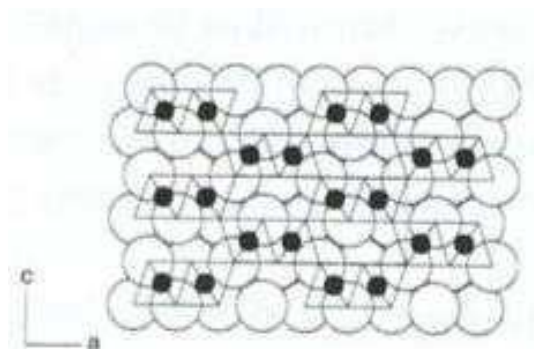


Figure 3.14 : Représentation de la structure cristalline de la goethite : les cercles blancs représentent les atomes d'oxygène organisés en réseau hexagonal compact et les cercles noirs représentent les atomes de fer occupant les sites octaédriques⁶⁴

Les raies de diffraction attribuées à la goethite sont larges : la cristallinité des particules est faible.

- Les pics de diffraction à $2\theta = 15.0^\circ$, 35.7° , 43.3° , 53.8° et le léger épaulement existant à $2\theta = 24^\circ$ ont été attribués respectivement aux plans d'indices de Miller [110], [311], [400], [422] et [210] de la **maghémite $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$** . Il faut préciser ici que les diffractogrammes de la

maghémite et de la magnétite sont quasiment identiques. En effet, toutes deux possèdent une maille cubique et la différence entre les paramètres de maille est très faible (8.33 Å et 8.38 Å respectivement). La raie la plus intense de la magnétite se situe à $2\theta = 20^\circ$ alors que la raie la plus intense de la maghémite se situe à $2\theta = 35.7^\circ$ ce qui est le cas ici : c'est ce qui a orienté notre attribution.

Nous avons vu dans la partie I-A que lorsque le rapport $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ est inférieur au rapport stoechiométrique nécessaire à la formation de la magnétite (0.5), l'oxyde formé conserve la structure spinelle inverse de celle-ci mais comporte alors des lacunes. Dans la magnétite, les anions O^{2-} forment un réseau cubique à faces centrées au sein duquel les ions ferreux et la moitié des ions ferriques occupent la moitié des sites octaédriques (sites B). L'autre moitié des ions ferriques occupe le huitième des sites tétraédriques (sites A). Le contenu de la maille peut s'écrire : $[\text{Fe}^{\text{III}}]_{\text{A}}[\text{Fe}^{\text{III}}\text{Fe}^{\text{II}}]_{\text{B}}\text{O}_4$ (*figure 3.15*).

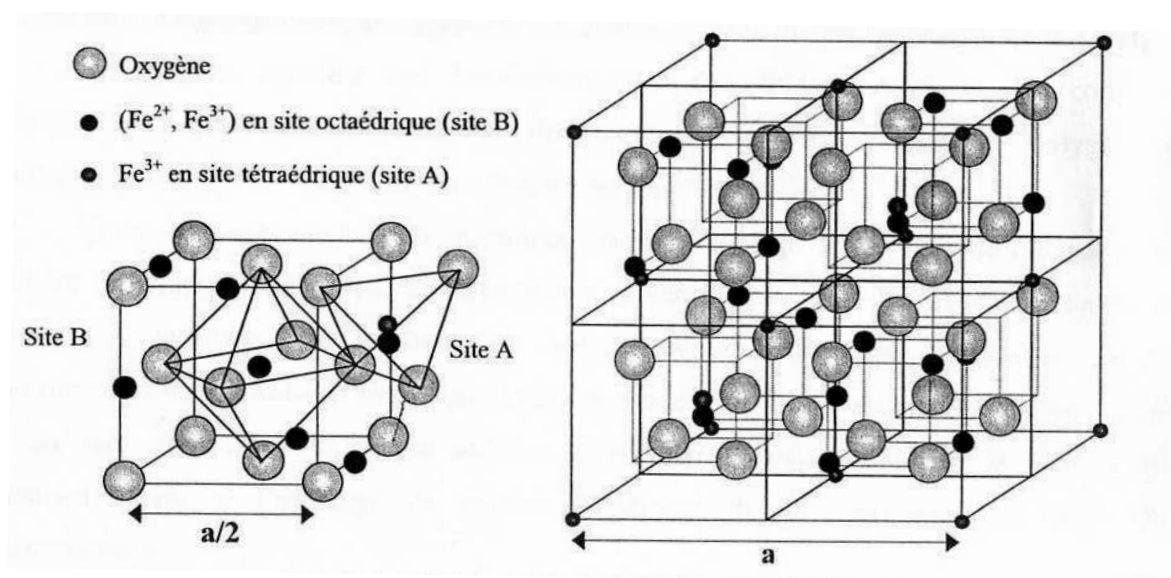


Figure 3.15 : Représentation de la structure cristalline de la magnétite⁷⁶

La maghémite est en fait une magnétite sous-stoechiométrique, elle présente des lacunes en Fe^{2+} : le contenu de la maille peut s'écrire : $[\text{Fe}^{\text{III}}]_{\text{A}}[\text{Fe}_{5/3}^{\text{III}}\text{L}_{1/3}]_{\text{B}}\text{O}_4$ (le symbole L représentant les lacunes cationiques du sous-réseau octaédrique).

Notons que les raies de diffraction attribuées à la maghémite étant larges, la phase cristalline est peu ordonnée.

- Le pic de diffraction à $2\theta = 19.2^\circ$ peut être attribué au plan d'indices de Miller [001] de l'**hydroxyde ferreux $\text{Fe}(\text{OH})_2$** . Les autres raies caractérisant cette phase ne sont pas présentes sur le spectre : $\text{Fe}(\text{OH})_2$ possédant une maille hexagonale, une orientation préférentielle selon l'axe c peut expliquer une exaltation de l'intensité de la raie [001]. Nous avons vu dans la partie I-A que $\text{Fe}(\text{OH})_2$ provient de la précipitation des ions Fe^{2+} .
- Le pic de diffraction à $2\theta = 23.5^\circ$ peut être attribué au plan d'indice de Miller [020] ou [200] de l'**hydroxyde ferrique $\text{Fe}(\text{OH})_3$ (bernalite)**. $\text{Fe}(\text{OH})_3$ possède une maille orthorhombique de paramètre de maille a et b quasi-identiques. Par conséquent, les raies correspondant aux réflexions des plans [020] et [200] sortent donc au même endroit : il est impossible d'attribuer clairement la raie à l'un ou l'autre des deux plans. Les autres raies caractérisant cette phase ne sont pas présentes sur le spectre et la raie à $2\theta = 23.5^\circ$ présente une intensité exaltée. Une orientation préférentielle des cristallites a pu se faire au cours de la préparation de l'échantillon. En effet, celui-ci constituant une pâte, il a fallu l'étaler sur le porte-échantillon, engendrant peut-être ainsi une orientation préférentielle.

Conclusion :

Nous obtenons donc un mélange de quatre phases cristallines : la goethite, la maghémite et les hydroxydes ferreux et ferrique. La présence de la goethite, qui se forme par précipitation à partir des ions Fe^{3+} ou par vieillissement de $\text{Fe}(\text{OH})_3$, et celle de la maghémite qui se forme lorsque le rapport $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ est inférieur à 0.5 (rapport stoechiométrique permettant d'obtenir la magnétite), nous font dire qu'il existe dans le milieu réactionnel un excès d'ions Fe^{3+} . Ceci peut provenir du fait que nous n'avons pas pris de précautions en ce qui concerne l'oxydation des ions Fe^{2+} en Fe^{3+} par l'oxygène dissous dans l'eau (dégazage de la solution par N_2).

La présence de ces quatre phases cristallines suggère dans tous les cas qu'il existe une forte inhomogénéité dans les concentrations des ions Fe^{2+} et Fe^{3+} au sein des oignons. Du fait d'une complexation des ions ferreux et ferriques par les groupements phosphates des lipides, ceux-ci constituent des sites de nucléation privilégiés pour les particules. Une publication⁶⁷ a montré que l'affinité est moindre dans le cas de Fe^{2+} . Des variations locales du rapport molaire $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ sont donc susceptibles de conduire à ces différentes structures cristallines.

Par ailleurs, lors de la synthèse de nanoparticules de ferrite (magnétite/maghémite) au sein de micelles inverses à différentes températures⁷⁰, Pileni *et coll.* ont montré que la cristallinité des particules devient plus faible lorsque la température à laquelle se fait la synthèse diminue. Les particules de ferrite formées à température ambiante (25°C) sont très faiblement cristallisées. Dans notre cas, la synthèse se fait aussi à température ambiante et en milieu confiné, ce qui peut expliquer la faible cristallinité des particules obtenues.

3. Propriétés magnétiques des nanoparticules formées

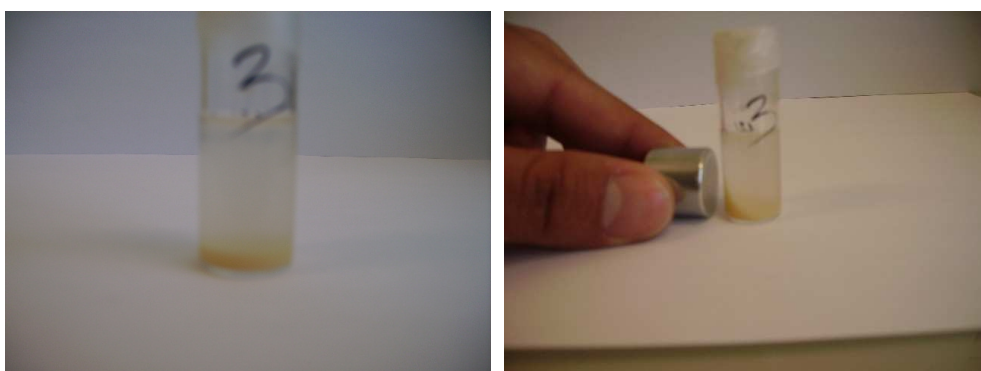


Figure 3.16 : Oignons contenant des nanoparticules synthétisées *in situ* attirés par un aimant

Un test simple permet de montrer que les oignons contenant des nanoparticules synthétisées *in situ* sont magnétiques : ils sont en effet attirés par un aimant (0.2T) (*figure 3.16*).

Les mesures magnétiques ont été réalisées sur un magnétomètre à détection SQUID (MPMS XL, Quantum Design).

Afin de connaître le comportement magnétique des nanoparticules synthétisées *in situ*, l'aimantation M a été mesurée en fonction du champ magnétique appliqué H pour les échantillons suivants : oignons « $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}=0.66$, $[\text{Fe}]=0.1\text{M}$, $\text{pH}=10$, 25°C » pour un temps d'incubation $J=0$ et $J=1$. A $J=0$, aucune particule n'a été synthétisée. A $J=1$, nous avons vu dans la partie I-D-1 que des particules de diamètre moyen 3 ± 1 nm sont observées par MET (*tableau 3.2*). La figure 3.17 présente les courbes d'aimantation en fonction du champ magnétique appliqué pour ces deux échantillons.

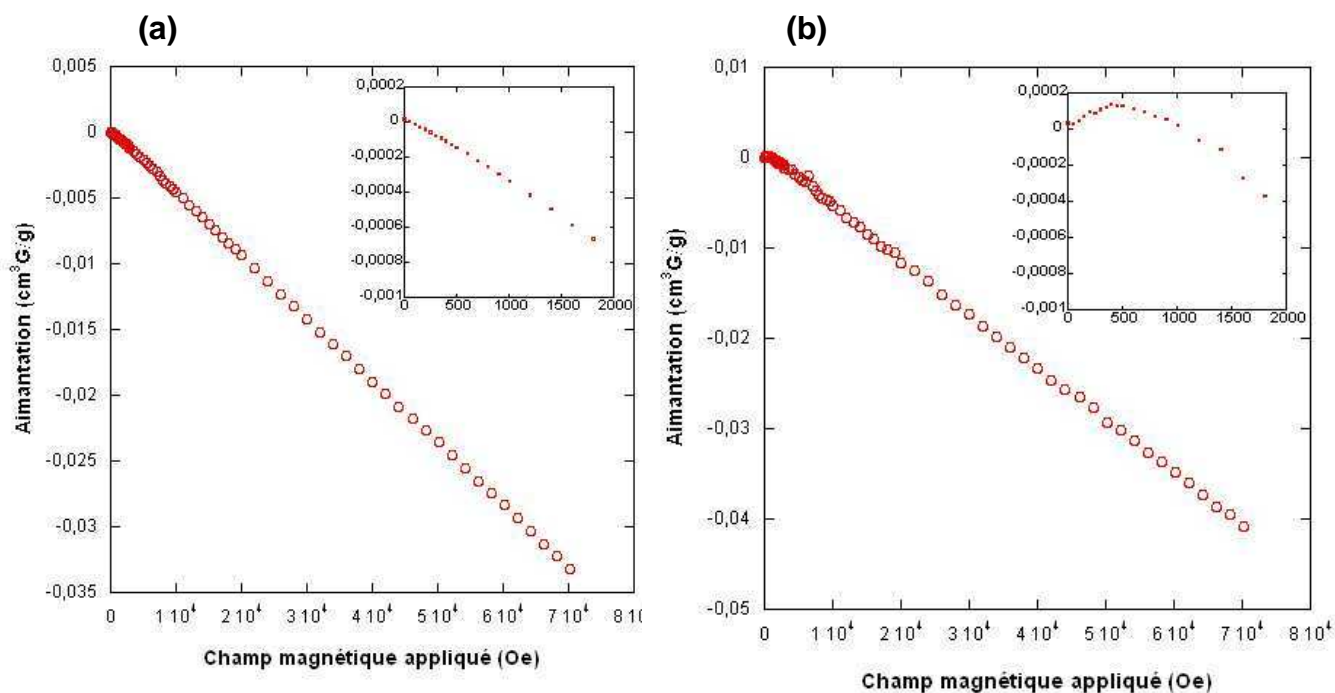


Figure 3.17 : Courbes d'aimantation en fonction du champ magnétique appliqué, à 295K, pour l'échantillon « $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}=0.66$, $[\text{Fe}]=0.1\text{M}$, $\text{pH}=10$, 25°C » : (a) à $J=0$ et (b) à $J=1$

Il faut d'abord préciser que les échantillons contiennent à la fois des lipides (principaux constituants des oignons), des ions précurseurs Fe^{2+} et Fe^{3+} , du chlorure de sodium et, dans un cas, des particules de structures cristallines variées.

En l'absence de particules (*figure 3.17a*), une contribution paramagnétique ($\chi^{\text{para}} > 0$) est apportée à la susceptibilité globale de l'échantillon par les ions précurseurs Fe^{3+} . Celle-ci est négligeable devant la contribution diamagnétique ($\chi^{\text{dia}} < 0$) fournie par les principaux constituants de l'échantillon : les phospholipides des oignons.

Nous retrouvons cette composante diamagnétique pour l'échantillon contenant des particules de 3 nm de diamètre (*figure 3.17b*). Cependant, un zoom aux champs faibles montre dans ce cas l'existence d'une pente positive à l'origine de la courbe (*insert figure 3.17b*) que l'on ne retrouve pas pour l'échantillon ne contenant pas de particules (*insert figure 3.17a*). La présence de cette susceptibilité positive aux champs faibles est donc attribuée aux particules, et cette contribution va nous permettre de caractériser leur comportement magnétique.

Pour cela, nous avons ajusté la courbe de la figure 3.17b par une droite aux champs forts (**figure 3.18a**). Nous pouvons en déduire la valeur de la susceptibilité diamagnétique qui est $\chi^{\text{dia}} = -5.10^{-7} \text{ cm}^3/\text{g}$ (valeur du paramètre m_2), valeur classique pour cette grandeur⁷⁷. Nous avons ensuite corrigé les valeurs de l'aimantation de la courbe 3.17b de la manière suivante :

$$M' = M - m_2 * H$$

M' est l'aimantation corrigée, M représente l'aimantation mesurée, m_2 est le paramètre déduit de l'ajustement présenté dans la figure 3.18a, et H est la valeur du champ magnétique appliqué. La figure 3.18b présente la courbe de l'aimantation corrigée M' en fonction du champ magnétique appliqué H , aux champs faibles.

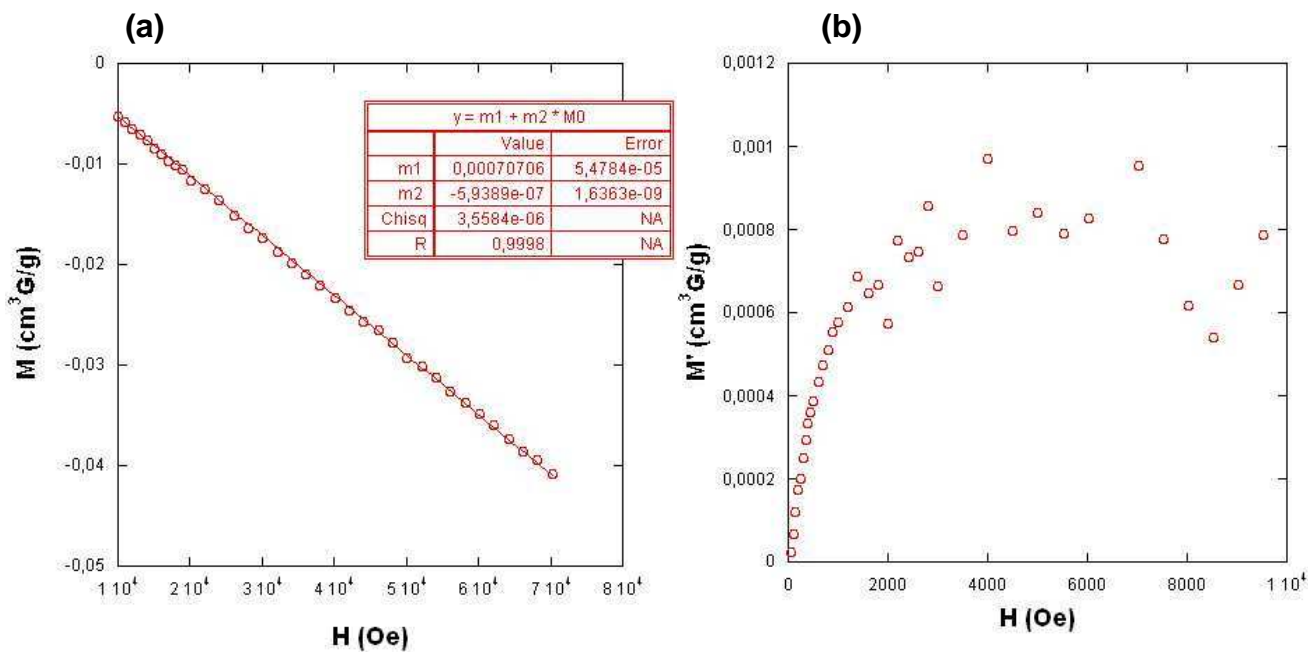


Figure 3.18 : (a) Ajustement par une droite de la courbe de l'aimantation mesurée en fonction du champ magnétique appliqué (aux champs forts) et (b) Courbe présentant l'aimantation corrigée en fonction du champ magnétique (aux champs faibles) pour l'échantillon contenant des particules

La courbe de la figure 3.18b présente l'allure caractéristique d'un comportement **superparamagnétique** avec une pente à l'origine élevée (susceptibilité magnétique importante).

Le superparamagnétisme est un comportement magnétique classique des nanoparticules d'oxyde de fer « monodomaine », c'est-à-dire de diamètre suffisamment petit (inférieur à 15-20nm dans le cas de la magnétite et de la maghémite) pour être composée d'un seul domaine magnétique. Chaque particule se comporte alors comme un seul moment magnétique. Les nanoparticules superparamagnétiques exhibent une susceptibilité magnétique très grande devant celle d'un paramagnétique « normal »⁷⁷.

Concernant l'évolution de l'aimantation en fonction du champ appliqué, il est difficile d'affirmer que l'aimantation atteint la saturation. Il semble tout de même qu'elle arrive à un palier pour $M = 8.10^{-4} \text{ cm}^3\text{G/g}$ (**figure 3.18b**), valeur très éloignée de l'aimantation à saturation de nanoparticules de maghémite qui est de l'ordre de $70\text{-}80 \text{ cm}^3\text{G/g}$ à 300K ^{64, 76}. Pour la goethite par contre, la littérature mentionne une aimantation à saturation comprise entre $0,01$ et $1 \text{ cm}^3\text{G/g}$ à 300K , à l'état massif⁶⁴.

Concernant la susceptibilité magnétique, la courbe de la figure 3.18b présente un comportement linéaire aux champs faibles nous permettant de la déterminer. Ainsi, nous avons ajusté les points de la figure 3.18b aux champs faibles par une droite (**figure 3.19**).

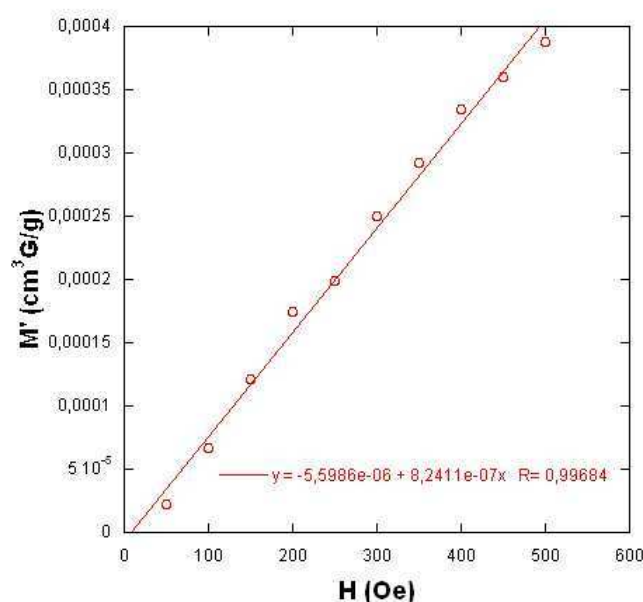


Figure 3.19 : Détermination de la susceptibilité magnétique des particules synthétisées *in situ*

La susceptibilité magnétique des particules est de $8,2.10^{-7} \text{ cm}^3/\text{g}$ (**figure 3.19**). Cette valeur est faible ; elle est par exemple inférieure de quasiment 4 ordres de grandeur à la susceptibilité

magnétique de particules de maghémite de même taille (3,7 nm) synthétisées en solution selon le procédé Massart ($\chi_m = 5.10^{-3} \text{cm}^3/\text{g}$)⁷⁶.

Les analyses par diffraction des rayons X aux grands angles ont montré que les particules synthétisées à l'intérieur des oignons sont peu cristallines. Les propriétés magnétiques des particules étant étroitement liées à leur structure cristalline, nous pouvons supposer que leur faible cristallinité est à l'origine des valeurs de l'aimantation et de la susceptibilité magnétique basses. Dans leur travail sur la synthèse de particules de ferrite dans des micelles inverses à différentes températures⁷⁰, Pileni *et coll.* forment à 25°C des particules de 3.7 nm de diamètre dont la susceptibilité magnétique vaut $4.10^{-5} \text{cm}^3/\text{g}$ et dont l'aimantation n'atteint pas la saturation pour un champ magnétique appliqué maximal de 20 000 G. Ayant montré que les particules synthétisées à cette température sont peu cristallines, ils en déduisent que la cristallinité des particules (et par conséquent leur taille, puisque plus les particules sont petites, plus la proportion de défauts dans le réseau cristallin est grande) est à l'origine de ces faibles propriétés magnétiques. De même, dans le cas de la synthèse de nanoparticules de magnétite stabilisées par du poly(vinyl alcool) (PVA)⁷⁸, l'augmentation de la concentration en PVA diminue la cristallinité des particules. En conséquence, l'aimantation à saturation diminue fortement.

Dans notre cas, la susceptibilité magnétique est encore inférieure d'un ordre de grandeur à celle des particules de ferrite (magnétite/maghémite) synthétisées par Pileni *et coll.* La présence des phases goethite et hydroxydes de fer (phases peu magnétiques) peut permettre d'expliquer ceci.

4. Stabilité de l'hybride oignon/particules

Afin d'étudier l'effet de la croissance des particules sur la stabilité de l'hybride, la structure interne de l'oignon a été observée par cryoMET.

La figure 3.20 présente des images caractéristiques de l'échantillon « $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}=1$, $[\text{Fe}]=0.1\text{M}$, $\text{pH}=10$, 4°C » pour différents temps d'incubation : J=2, 6 et 9. Nous avons choisi d'étudier cet échantillon car il présente de nombreuses particules par MET et les oignons sont plus stables en terme d'agrégation.

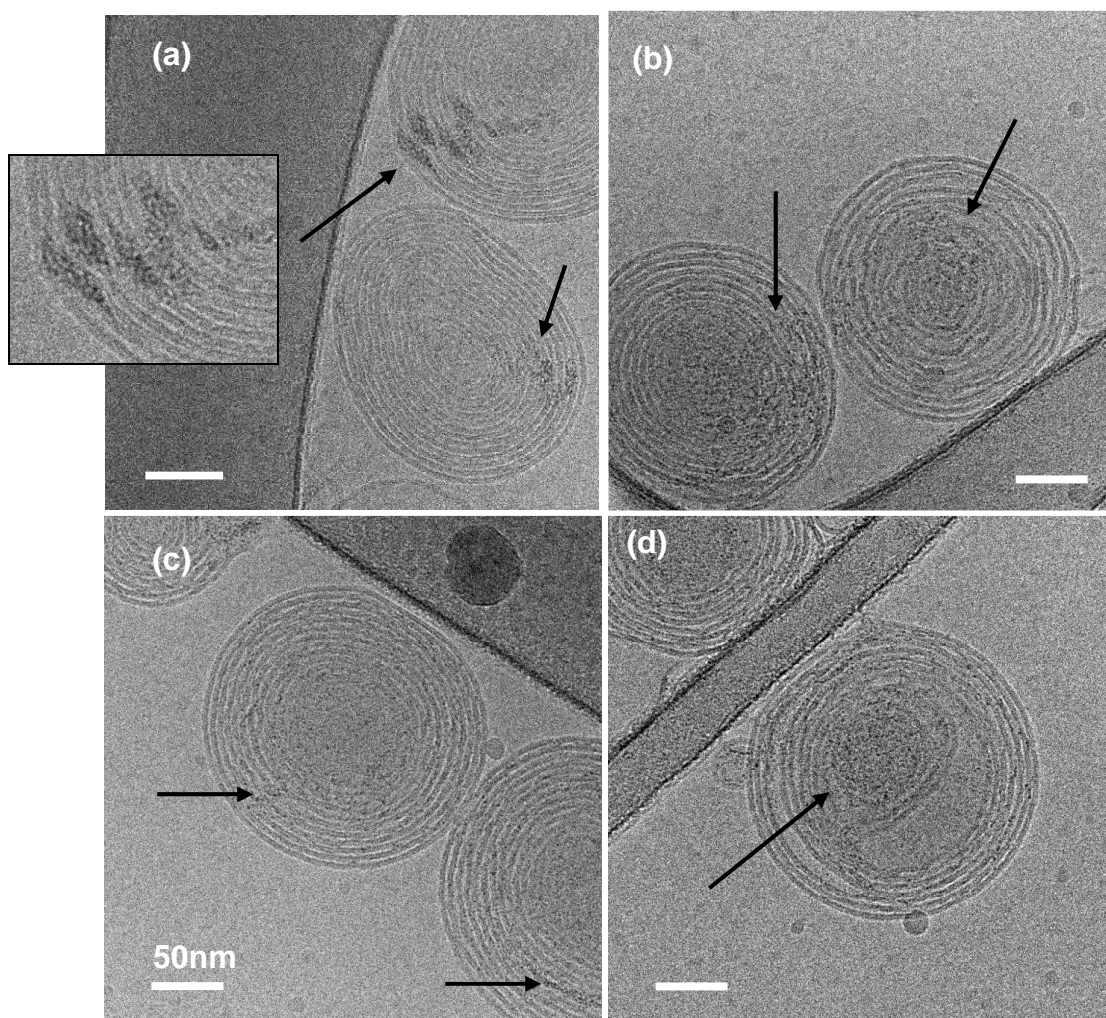


Figure 3.20 : Images de cryoMET pour l'échantillon « $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}=1$, $[\text{Fe}]=0.1\text{M}$, $\text{pH}=10$, 4°C » pour différents temps d'incubation : (a) $J=2$, (b) $J=6$, (c) et (d) $J=9$

Les flèches indiquent les particules les plus visibles.

Afin d'étudier l'influence du temps d'incubation sur la stabilité de l'hybride oignon/particules, nous avons fait une étude statistique en nous basant sur toutes les images de cryoMET réalisées. Nous avons ainsi compté :

- le nombre total de vésicules observées (oignons + MLV + liposomes) : N_{total}
- le nombre d'oignons parmi N_{total} : N_{oignons} ,
- le nombre de vésicules contenant des particules parmi N_{total} : $N_{\text{particules}}$
- le nombre d'oignons contenant des particules (MLV dont la structure interne est intacte), c'est-à-dire le nombre d'hybrides : $N_{\text{oignon/particules}}$

Nous en avons déduit les pourcentages correspondants. Le tableau 3.5 récapitule les résultats concernant l'échantillon « $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}=1$, $[\text{Fe}]=0.1\text{M}$, $\text{pH}=10$, 4°C » pour différents temps d'incubation.

Temps	N_{total}	N_{oignons}	$N_{\text{particules}}$	$N_{\text{oignon/particules}}$	% vésicules contenant des particules	% d'hybrides oignon/particules parmi $N_{\text{particules}}$
J=2	13	8	13	8	100	61
J=6	26	12	26	12	100	46
J=9	41	14	41	14	100	34

Tableau 3.5 : Effet du temps d'incubation sur la stabilité de l'hybride oignon/particules

La première remarque concerne le pourcentage de vésicules contenant des particules : il y a dans tous les cas synthèse de particules.

Ensuite, nous constatons que le pourcentage d'oignons dans l'échantillon diminue au cours du temps. Sur la figure 3.20, nous constatons qu'à J=2 (*figure 3.20a*), les bicouches lipidiques sont présentes jusqu'au cœur de l'oignon et les particules ont poussé principalement sur les couches externes. A J=6 (*figure 3.20b*), l'épaisseur de la couche aqueuse a augmenté puisqu'elle est passée de 4 nm à environ 6 nm (mesurée sur les images). Les bicouches lipidiques situées au cœur de l'oignon sont un peu plus désorganisées et les particules sont situées plus au centre de l'oignon. A J=9, la structure interne de l'oignon est souvent très désorganisée (*figure 3.20d*). Les particules qui poussent au centre de l'oignon semble donc détruire sa structure interne : ce phénomène est peut-être à l'origine de la baisse du pourcentage d'oignons au cours du temps.

Conclusion :

Le pourcentage d'hybrides oignon/particules diminue quand le temps d'incubation augmente. En effet, un temps d'incubation plus long favorise une nucléation des particules jusqu'au centre de l'oignon ce qui finit par désorganiser la structure interne de l'objet.

E- Conclusion

La synthèse *in situ* de nanoparticules par coprécipitation d'ions ferreux et ferriques a été réalisée au sein d'oignons, de même que leur caractérisation physico-chimique.

L'influence de la température et du temps d'incubation sur la taille moyenne des particules a été montrée. L'absence d'effet du pH du milieu dispersant sur la taille moyenne des particules a été imputée à la succession des bicouches lipidiques et ses conséquences sur la diffusion des ions OH^- vers l'intérieur de l'oignon.

Concernant la structure cristalline des particules, le mélange de plusieurs phases n'est pas étonnant. Les synthèses en milieu confiné donnent souvent lieu à plusieurs structures cristallines, qui diffèrent de celles obtenues par une synthèse en solution (bulk). Par exemple, lors d'une coprécipitation d'ions Fe^{2+} et Fe^{3+} réalisée au sein de vésicules unilamellaires lipidiques dispersées dans un milieu basique (pH=12), Mann *et coll.* obtiennent un mélange de ferrihydrites et de lépidocrocite (oxy-hydroxyde), alors qu'une synthèse en solution aboutit à la formation de magnétite⁷⁹. Les auteurs attribuent cette différence au contrôle cinétique exercé par la membrane sur la diffusion (lente) des ions OH^- . Ils suggèrent que les phases cristallines des particules ainsi générées sont des produits thermodynamiques de la réaction, les particules générées en solution par une coprécipitation rapide étant des produits cinétiques.

D'autre part, nous avons vu que la cristallinité des particules est faible. Là aussi, la synthèse en milieu confiné peut être à l'origine de ce résultat. En effet, lors de la synthèse de nanoparticules de CdS au sein d'une phase lamellaire de tensioactifs (sodium dodécylsulfate), Adair *et coll.* ont observé que les particules obtenues sont amorphes, alors qu'une synthèse en solution génère des particules cristallines⁸⁰. Ils l'attribuent à un effet de ralentissement de la diffusion des ions S^{2-} au travers des bicouches de tensioactifs (SDS) de la phase lamellaire.

Les faibles propriétés magnétiques des particules synthétisées (aimantation à saturation et susceptibilité magnétique faibles) sont directement dues au mélange de phases cristallines, certaines peu magnétiques, et à la faible cristallinité.

Enfin, les observations de cryo-microscopie électronique en transmission montrent qu'il est possible de former des oignons stables contenant des nanoparticules magnétiques. Toutefois,

la croissance des particules au cours du temps induit la formation de défauts dans la succession des bicouches lipidiques, affectant la structure interne de l'oignon, et éventuellement sa stabilité.

Les caractérisations de ces particules en terme de relaxivités et de pouvoir chauffant pour des applications de l'hybride oignon/particules comme agent de contraste pour l'IRM et en hyperthermie, seront décrites dans le chapitre 4.

Intéressons-nous maintenant à l'approche consistant à encapsuler un ferrofluide au sein de l'oignon.

II- Encapsulation d'un ferrofluide dans les oignons

A- Stratégie d'encapsulation

1. Le ferrofluide utilisé

Le ferrofluide utilisé nous est fourni par Etienne Duguet. Sa synthèse a été mise au point par Stéphane Mornet durant sa thèse ⁷⁶ sous la direction d'Etienne Duguet (ICMCB, Bordeaux).

Un ferrofluide est une dispersion colloïdale stable de nanoparticules magnétiques dans un fluide porteur. Il existe plusieurs « types » de ferrofluide selon que la stabilité colloïdale est maintenue par des répulsions électrostatiques ou par encombrement stérique, et selon la nature et la fonctionnalisation de surface des nanoparticules.

L'encapsulation de nanoparticules dans les oignons impose des contraintes au niveau des propriétés physico-chimiques du ferrofluide, contraintes principalement liées à la méthode d'encapsulation. En effet, le ferrofluide est introduit au niveau de l'étape de formation de la phase lamellaire. Celle-ci étant gonflée par une solution aqueuse dans notre procédé, il est donc nécessaire que les particules soient dispersées dans une phase aqueuse. Ensuite, de manière intuitive, nous pouvons penser qu'il faut que les nanoparticules d'oxyde de fer soient suffisamment petites pour pouvoir s'insérer entre deux bicouches lipidiques. Nous avons vu

dans le chapitre 2 que des particules de l'ordre de 5nm de diamètre ne perturbaient pas l'organisation de la phase lamellaire. Puis, il serait souhaitable pour la stabilité des oignons de travailler à un pH proche du pH neutre. Enfin, il faut limiter au maximum la floculation des nanoparticules d'oxyde de fer à pH neutre, sans quoi l'encapsulation ne pourra pas être réalisée. **Pour résumer :**

- 1- Les nanoparticules doivent être hydrophiles pour être dispersées en phase aqueuse.**
- 2- Le pH du ferrofluide doit être proche de 7.**
- 3- Les nanoparticules ne doivent pas floculer au pH choisi.**
- 4- Le diamètre des nanoparticules magnétiques ne doit pas dépasser 5nm.**

Nous avons donc choisi un ferrofluide de nanoparticules de maghémite, fonctionnalisées par des aminosilanes, dont le point de charge nulle se situe à pH=10. En ce qui concerne la nature de l'oxyde de fer, notre choix s'est porté sur la maghémite plutôt que la magnétite car la première est plus stable vis-à-vis de l'oxydation que la seconde. La synthèse et la fonctionnalisation des particules sont brièvement décrits dans ce qui suit. Une étude concernant la taille des particules observées par MET et leur état de floculation dans le milieu dispersant sera ensuite exposée.

a)- Etapes générales de la synthèse des nanoparticules de maghémite et de leur fonctionnalisation par les aminosilanes ⁷⁶

Les nanoparticules de maghémite ont été synthétisées selon le procédé Massart en 4 étapes :

-formation de la magnétite : coprécipitation de sels de chlorure ferreux et ferrique en proportion stoechiométrique ($\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+} = 0.5$) par l'ammoniaque à température ambiante, sous forte agitation.

-désorption des contre-ions ammonium, oxydation de surface : après lavage, la surface des particules de magnétite est traitée à l'acide nitrique.

-oxydation du coeur des nanoparticules : une solution de nitrate ferrique est ajoutée à $T=100^{\circ}\text{C}$ puis la solution est agitée pendant 30min.

-peptisation des nanoparticules de maghémite : afin d'obtenir une dispersion stable de nanoparticules de maghémite, celles-ci sont traitées par un acide dont le contre-ion est non floculant (c'est-à-dire peu polarisant afin d'éviter son adsorption en surface et d'écranter les charges), comme l'acide nitrique (HNO_3) ou l'acide perchlorique (HClO_4). Les

nanoparticules sont alors stabilisées par répulsions électrostatiques générées par la présence de charges en surface (charges positives dans ce cas).

Au final, un ferrofluide cationique acide (pH=2.5) est donc obtenu. Le point de charge nulle des nanoparticules de maghémite ainsi synthétisées se situe à pH=7 (déterminé par des mesures du potentiel zêta), ce qui signifie que les particules sont totalement floculées à pH neutre. Leur domaine de floculation a été déterminé par des mesures de turbidité à 800nm par spectrophotométrie : il est compris entre pH=5 et pH=9. Le ferrofluide cationique ainsi synthétisé n'est donc pas adapté pour travailler à pH neutre. C'est pourquoi des nanoparticules de maghémite fonctionnalisées en surface par des aminosilanes R-Si(OCH₃)₃, R comportant un groupement amine primaire, ont été choisies. Ces particules modifiées ont été développées par Stéphane Mornet durant sa thèse, afin de réaliser un greffage covalent de molécules de dextrane⁵².

Le greffage de l'aminosilane, γ -aminopropyltriméthoxysilane (APS), est réalisé sur les nanoparticules de maghémite dont la synthèse a été décrite au paragraphe précédent. Il se fait en 3 étapes dans un mélange eau/méthanol (1/1) :

-hydrolyse en solution aqueuse de l'APS : les mécanismes mis en jeu lors de la réaction d'hydrolyse sont catalysés en milieu acide ou basique. Ils conduisent d'une part à la formation de silanols R-Si(OH)₃, et d'autre part à la formation de méthanol.

-condensation intermoléculaire des silanols, menant à la formation de siloxanols : cette réaction peut se poursuivre si le silane possède plusieurs fonctions hydrolysables. Dans ce cas, des oligosiloxanols de différentes tailles sont obtenus

-condensation des silanols sur les sites hydroxyles de la surface de γ -Fe₂O₃

-peptisation par l'acide nitrique : l'amine de l'APS permet de maintenir la surface des nanoparticules de maghémite hydrophile et elle constitue un site protonable pour la peptisation.

Avant peptisation, un traitement thermique modéré (100°C) sous vide dans le glycérol permet d'augmenter le nombre d'amines libres en surface en rompant les interactions amine-silanol.

Le point de charge nulle de ces nanoparticules silanisées se situe à pH=10 et le domaine de floculation est compris entre pH=7 et pH=11. Nous avons donc choisi de travailler avec ce ferrofluide qui ne devrait pas (ou très peu) être floculé à pH neutre. Afin de le confirmer, nous avons déterminé l'état de floculation des nanoparticules d'oxyde de fer par diffusion dynamique de la lumière, ainsi que leur diamètre par MET.

b)- Taille et floculation des nanoparticules de maghémite

Taille moyenne et écart-type :

La figure 3.21 présente une image caractéristique de nanoparticules d'oxyde de fer observées par MET. Les nanoparticules sont agrégées mais ceci n'est pas forcément représentatif de l'état de dispersion en solution. Le séchage de la goutte de ferrofluide peut favoriser cette agrégation sur la grille.

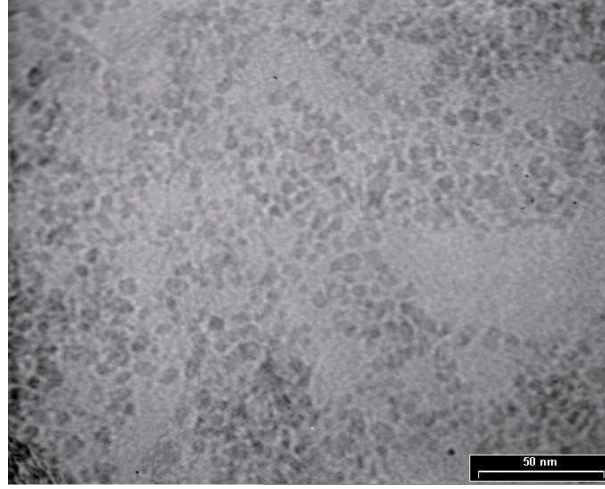


Figure 3.21 : Image de MET caractéristique des nanoparticules de maghémite

La figure 3.22 présente un histogramme de taille réalisé à partir des images de MET. La distribution en taille peut être décrite par une loi log-normale⁸¹ :

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

où d_0 est la moyenne géométrique (m_1) et σ l'écart-type des $\ln(d)$ (m_2). Le diamètre le plus probable est $d_p = d_0 \exp(-\sigma^2)$. L'écart-type σ rend compte de la dispersion des valeurs des diamètres des nanoparticules autour de d_p . Plus l'écart-type est faible, plus les valeurs des diamètres des nanoparticules sont regroupées autour de d_p . La moyenne des diamètres s'écrit alors :

$$d = d_0 \exp \left(\frac{\sigma^2}{2} \right) = 3.58 \times \exp \frac{0.28^2}{2} = 3.7 \text{ nm}$$

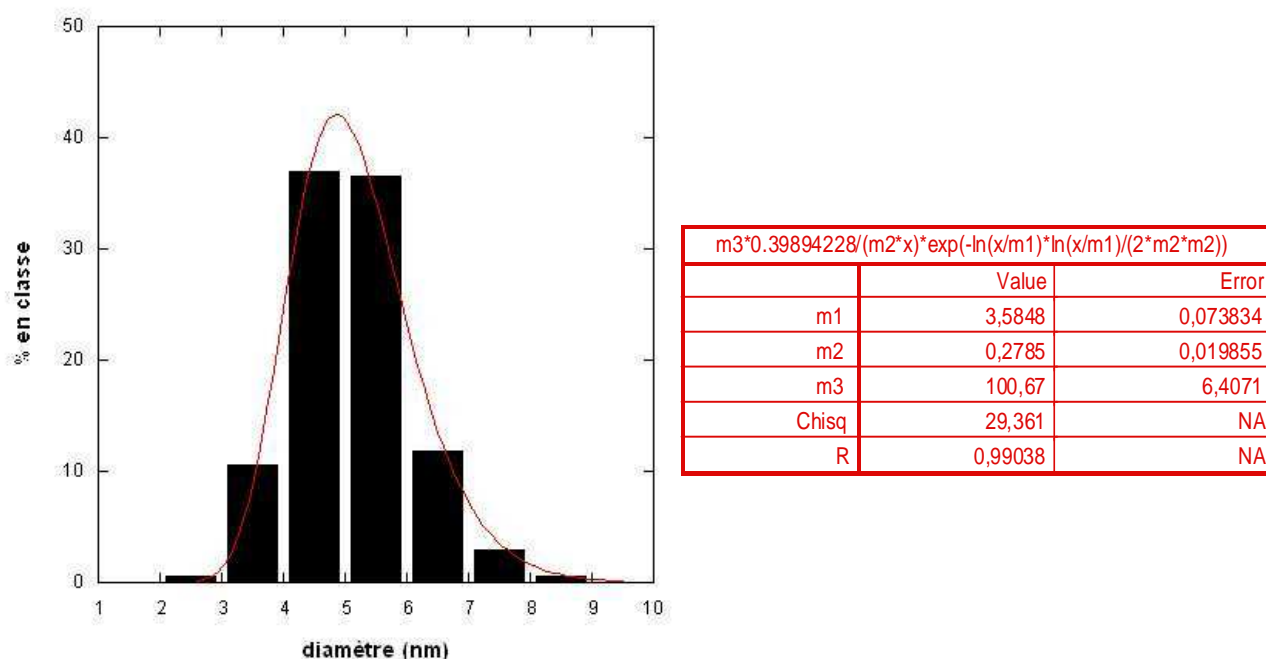


Figure 3.22 : Histogramme de taille des nanoparticules de maghémite (réalisé sur 170 particules) et ajustement de type log-normal

Le ferrofluide utilisé comporte donc des nanoparticules de maghémite de 3,7nm de diamètre en moyenne.

Etat de floculation des nanoparticules dans le milieu dispersant :

Afin de limiter la désorganisation de la phase lamellaire due à un trop grand nombre de particules, il est nécessaire de diluer le ferrofluide. Il faut donc déterminer le milieu le plus favorable pour cette dilution en terme de floculation des nanoparticules. Nous avons vu que le pH est déterminant, mais la force ionique est également à prendre en compte. Nous avons choisi d'étudier deux milieux dispersants :

-l'eau ultra-pure de force ionique quasi nulle ($I = 2\text{mOsmol}$), à $\text{pH} = 7$

-un tampon $\text{CH}_3\text{COOH}/\text{CH}_3\text{COO}^-$ (1M) de force ionique plus élevée ($I = 1000\text{mOsmol}$), mais de pH plus éloigné du domaine de floculation des nanoparticules de maghémite fonctionnalisées ($\text{pH} = \text{pKa} = 4.85$).

Des expériences de diffusion dynamique de la lumière ont été réalisées sur différentes dilutions du ferrofluide, dans les deux milieux, afin de déterminer le diamètre hydrodynamique des particules.

Sur une dilution, nous avons fait des mesures à 5 angles différents (40°, 60°, 80°, 100° et 140°). Nous avons tracé $1/\tau$ en fonction de q^2 : l'obtention d'une droite permet de valider l'hypothèse d'une diffusion isotrope. La pente de cette droite nous donne le coefficient de diffusion D des particules. Il est possible d'en déduire le diamètre hydrodynamique d_h des particules présentes dans l'échantillon, grâce à la formule de Stocke-Einstein :

$$D = \frac{kT}{3\pi \times \eta \times d_h}$$

avec η la viscosité du milieu (ici , viscosité de l'eau).

La figure 3.23 montre une courbe d'auto-corrélation type du signal, obtenue pour les échantillons à 140°.

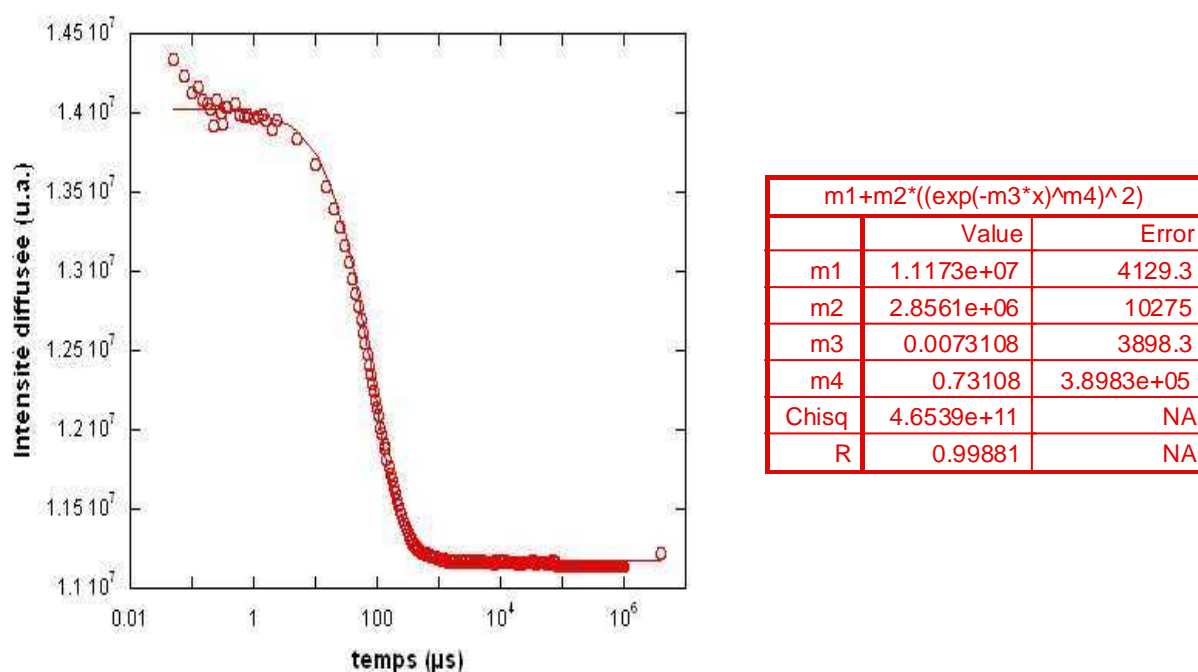


Figure 3.23 : Courbe d'auto-corrélation caractéristique à 140°

La courbe d'auto-corrélation présente un changement de pente dont le « point d'inflexion » correspond à un temps caractéristique d'environ 100μs. Il semble qu'il y ait un deuxième

changement de pente pour un temps caractéristique compris entre 0.01 μ s et 0.1 μ s. Une deuxième population, plus petite, est donc présente mais il est difficile de conclure sur sa taille puisque le « point d'inflexion » ne peut pas être déterminé. En tout cas, la population de particules n'est pas monodisperse, c'est pourquoi nous avons choisi d'ajuster la courbe à l'aide d'une exponentielle étirée :

$$y = m_1 + m_2 \times \left[\exp(-m_3 x)^{m_4} \right]^2$$

où m_1 représente la ligne de base, m_2 représente l'amplitude de la courbe, m_3 correspond à l'inverse du temps caractéristique, et m_4 pondère la population dont la fréquence caractéristique est m_3 . Le diamètre hydrodynamique est déduit de m_3 .

Le tableau 3.6 récapitule les résultats pour tous les échantillons testés.

[Fe]	Eau ultra-pure		Tampon CH ₃ COOH / CH ₃ COO ⁻ (1M)	
	Diamètre hydrodynamique (déduit de m_3)	Part de la population dans la solution (m_4) (% en intensité)	Diamètre hydrodynamique	Part de la population dans la solution (m_4) (% en intensité)
0.4 mM	40 nm	62 %	90 nm	28 %
1.2 mM	34 nm	73 %	50 nm	50 %
2 mM	34 nm	73 %	43 nm	60 %

Tableau 3.6 : Diamètres hydrodynamiques dans l'eau ultra-pure et dans le tampon acétate

Il faut rester prudent quant aux résultats obtenus par diffusion dynamique de la lumière et leur interprétation en terme d'aggrégation des particules. En effet, la mesure prend en compte le diamètre du coeur cristallin et l'épaisseur de la couche ionique diffuse (modèle de Gouy-Chapman) permettant la stabilisation colloïdale. Du reste, le diamètre hydrodynamique de ces particules en suspension dans un milieu très acide (pH=2.5, pH auquel la floculation des particules doit être quasi inexistante) a été mesuré par Stéphane Mornet durant sa thèse⁷⁶ : les valeurs trouvées étaient de l'ordre de 10nm. Les valeurs du tableau 3.6 reflètent donc une aggrégation des particules. Nous pouvons estimer que l'on forme des agrégats d'une dizaine de particules au maximum.

Nous constatons que l'agrégation est plus marquée dans le tampon acétate que dans l'eau ultra-pure. La force ionique plus élevée du tampon acétate et donc la présence de contre-ions susceptibles d'écranter les charges de surface expliquent ce résultat (diminution de l'épaisseur de la couche diffuse).

Le tableau 3.6 fait également figurer les valeurs du paramètre m_4 correspondant à la part de la population « principale » (de diamètre hydrodynamique issu de m_3) au sein de la solution. Nous constatons que la part de la population principale reste à peu près constante dans l'eau ultra-pure en fonction de la concentration en particules ($[Fe]$). Par contre, dans le tampon, la part de la population principale diminue avec la concentration en particules : la polydispersité des agrégats dans la solution augmente quand $[Fe]$ diminue.

Précisons ici que les concentrations en fer du ferrofluide utilisées par la suite sont bien plus importantes que celles-ci ($[Fe]$ varie dans la suite de 2 à 125mM). Pour ces analyses par diffusion dynamique de la lumière, nous avons dû diluer de façon plus importante les échantillons afin d'éviter au maximum les phénomènes d'absorption.

En conclusion, nous avons choisi de diluer le ferrofluide dans l'eau ultra-pure, où l'on forme des agrégats d'une dizaine de particules.

2. Préparation de l'hybride oignon/particules magnétiques

Le mélange lipidique PC-monooléine (90-10 % molaire) est hydraté par le ferrofluide dilué (55% en masse de lipides et 45% de ferrofluide, *figure 3.24a*), puis le mélange est homogénéisé par 3 cycles mélange à la spatule/centrifugation (5minutes, 5000 tours/minute). La phase lamellaire ainsi obtenue est ensuite laissée reposer pendant 3 jours. Puis elle est soumise à un cisaillement en cellule de Couette pendant 1 minute, à 250 tours/minute (*figure 3.24b*). Elle est finalement dispersée dans de l'eau ultra-pure pour obtenir les oignons isolés les uns des autres, contenant les particules de maghémite, en solution aqueuse (*figure 3.24c*).

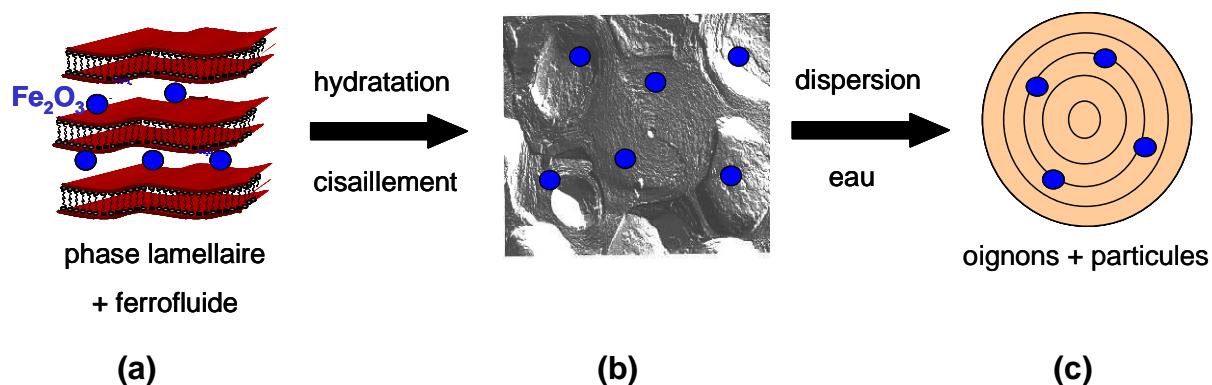


Figure 3.24 : Principe de préparation d'hybrides oignon/nanoparticules de maghémite par encapsulation : (a) formation de la phase lamellaire par hydratation des lipides avec le ferrofluide ; (b) phase lamellaire cisailée contenant les particules de maghémite ; (c) oignons en solution dans l'eau ultra-pure contenant les particules

3. Elimination des particules non encapsulées

Les dispersions ainsi préparées comprennent les oignons contenant les particules, mais aussi les particules de maghémite non encapsulées. Afin de mesurer les taux d'encapsulation (partie II-B), nous avons besoin d'éliminer les particules non encapsulées. Plusieurs méthodes de séparation peuvent être employées : la sédimentation par centrifugation⁸², le triage magnétique⁸³ et la chromatographie d'exclusion sur gel⁸⁴.

a)- Détermination des conditions de séparation

Nous avons testé la méthode par centrifugation et il est apparu qu'elle n'est pas efficace. En effet, afin de sédimenter tous les oignons, il est nécessaire de centrifuger à 4°C pendant 20min à 8000 tours/minutes. Les particules de maghémite étant très denses (densité de la maghémite de 4,87 g/cm³) par rapport aux oignons (densité proche de 1 g/cm³), les particules non encapsulées sédimenteront dans ces conditions de centrifugation. Il est alors impossible de séparer les particules non encapsulées et les oignons.

La chromatographie d'exclusion sur gel apparaît comme la méthode la plus adaptée. Le gel constitue une matrice de billes de polymères (souvent des polysaccharides comme le

dextrane) de quelques micromètres de diamètre. Ces billes comportent des pores de différents diamètres suivant le type du gel. La séparation se fait par **exclusion de taille**. Les oignons, de diamètre plus important, ne vont pas passer dans les pores des billes et vont être élués en premier. Les particules magnétiques, suffisamment petites pour cheminer dans les pores des billes du gel, vont être éluées plus tard. La séparation dépend donc des diamètres relatifs entre objets à séparer, mais aussi des paramètres utilisés sur la colonne de chromatographie : longueur de la colonne, nature et diamètre des pores du gel, et débit de l'éluant.

Montage :

Ici, nous avons utilisé une colonne de 8cm de haut et 1cm de diamètre. Elle est remplie manuellement par un gel Sephacryl® S300, constituant une matrice allyl dextrane/bisacrylamide. Aucun tampon commercial de pH neutre ne peut être utilisé comme éluant car il induit une aggrégation des particules. La séparation se fait donc avec l'eau ultra-pure comme éluant. Le débit est contrôlé par la hauteur comprise entre le niveau d'eau ultra-pure (éluant) dans l'erlenmeyer et le niveau de gel dans la colonne.

Identification des différentes fractions :

Afin de savoir quels volumes d'éluant sont nécessaires pour séparer les oignons et les particules non encapsulées, les chromatogrammes des échantillons suivants ont été réalisés :

- des oignons ne contenant que de l'eau ultra-pure
- le ferrofluide non dilué
- des oignons au sein desquels a été encapsulé le ferrofluide

Pour chacun de ces échantillons, des fractions de 500 μ L ont été récupérées sur un volume total d'élution de 6mL. Ces fractions ont été analysées par diffusion dynamique de la lumière : l'intensité diffusée ainsi que le diamètre hydrodynamique des objets présents dans chaque fraction ont été mesurés. La figure 3.25 présente l'intensité diffusée en fonction du volume d'élution pour chaque échantillon.

Ces courbes nous permettent donc de déterminer dans quelle(s) fraction(s) les oignons et les nanoparticules sont récupérés :

- « oignon/eau » : les oignons sortent pour $0.5\text{mL} < V_{\text{élué}} < 2\text{mL}$
- « ferrofluide » : les particules magnétiques sortent pour $3.5\text{mL} < V_{\text{élué}} < 5\text{mL}$

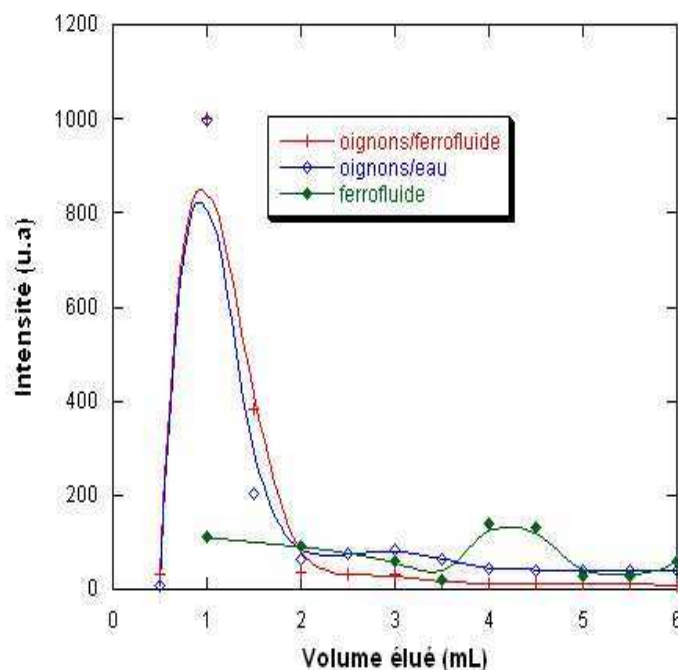


Figure 3.25 : Séparation : courbes présentant l'intensité diffusée en fonction du volume élué pour les oignons + eau, le ferrofluide non dilué et les oignons + particules de maghémite (Les courbes tracées sont des guides, ce ne sont pas des ajustements)

Sur la courbe « oignon/ferrofluide », le pic d'intensité dû aux oignons contenant les particules est visible autour de 1mL, mais celui des particules non encapsulées n'apparaît pas. L'intensité diffusée dépend de la taille des particules (plus elles sont petites moins l'intensité diffusée est élevée, Rayleigh), mais aussi de la concentration en particules. Or la concentration en particules introduite dans une dispersion d'oignons à 40mg/mL est à peu près 100 fois moins importante que dans le ferrofluide non dilué. Nous pouvons raisonnablement penser que le pic d'intensité correspondant aux seules particules non encapsulées ne dépasse pas du « bruit de fond ».

La séparation entre oignons et particules est donc bien résolue. Une détermination plus fine du pic d'élution correspondant aux oignons a été faite en utilisant des fractions plus petites (200µL) en diffusion dynamique de la lumière et en fluorimétrie (les oignons étant marqués par un lipide comportant un groupement fluorophore, l'intensité de fluorescence de chaque fraction est mesurée). Ceci nous a permis de déterminer que **tous** les oignons passent entre $0.8\text{mL} \leq V_{\text{élué}} \leq 1.8\text{mL}$ (*figure 3.26*).

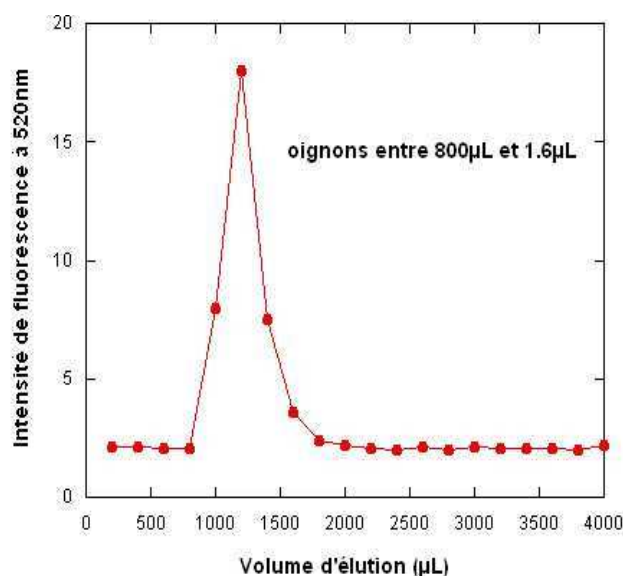


Figure 3.26 : Détermination du pic d'élution des oignons par fluorimétrie

A partir de ces résultats, nous avons choisi de suivre le protocole suivant pour l'ensemble des séparations réalisées par la suite.

b)- Protocole choisi pour la séparation

Avant le dépôt de l'échantillon à purifier, la colonne est saturée en oignons afin de prévenir toute adsorption de l'échantillon sur le gel. Pour cela, nous déposons en haut de colonne 100µL d'une dispersion d'oignon/eau à 20mg/mL et nous laissons passer 10mL d'éluant. Ensuite la séparation est réalisée en déposant en haut de colonne 100µL d'une dispersion d'oignons/ferrofluide dilué à 40mg/mL. Après $V_{\text{élué}} = 0.8\text{mL}$, nous récupérons une fraction de 1mL au total qui contient tous les oignons. On laisse ensuite passer 8mL d'eau ultra-pure pour éluer les particules magnétiques et laver la colonne. Finalement $V_{\text{élué total}} = 10\text{mL}$.

c)- Facteur de dilution de la colonne

Théoriquement, le facteur de dilution de la colonne est de **10** puisque le dépôt initial est de 100µL et que la fraction contenant les oignons est de 1mL. Malgré les précautions prises (saturation du gel par des oignons), il peut y avoir des phénomènes d'adsorption des oignons sur la colonne. Or il est nécessaire de connaître le facteur de dilution afin de mesurer les taux

d'encapsulation par résonance paramagnétique électronique (RPE). Il a été déterminé de manière simple, en lyophilisant 1mL d'une dispersion d'oignons/ferrofluide à 40mg/mL et deux fractions de 1mL de la même dispersion après passages sur colonne. Les échantillons sont lyophilisés en même temps donc même si toute l'eau n'est pas sublimée, des quantités d'eau identiques sont ôtées aux deux échantillons :

$$-m_{\text{avant colonne}} = 32.4 \pm 0.1 \text{ mg de lipides dans 1mL}$$

$$-m_{\text{après colonne}} = 5.2 \pm 0.1 \text{ mg de lipides dans 2mL}$$

Le facteur de dilution de la colonne est de **12,5 ± 0.2**. Il y a donc environ 20 % des oignons déposés qui reste adsorbés à la surface du gel.

B- Encapsulation des nanoparticules magnétiques dans les oignons

1. Effet des nanoparticules sur la stabilité de la phase lamellaire cisailée

La phase **ferrosmectique**, une phase lamellaire « dopée » par des nanoparticules magnétiques, constitue le premier exemple de compatibilité entre un liquide organisé et des colloïdes solides. Elle a été étudiée notamment par Fabre *et coll.*^{85, 86} en 1990.

Le ferrofluide utilisé est constitué de nanoparticules de maghémite fonctionnalisées par un tensioactif, en suspension dans du cyclohexane. La phase lamellaire du système eau-SDS-pentanol-cyclohexane étudié est constituée de bicouches de SDS et de pentanol emprisonnant une épaisseur d'eau, dispersées avec un ordre smectique dans du cyclohexane. La phase lamellaire est plus ou moins gonflée selon le volume de cyclohexane ajouté par rapport au volume de membranes (taux de gonflement). Pour le ferrosmectique, le gonflement de la phase lamellaire se fait par ajout du ferrofluide (nanoparticules magnétiques + cyclohexane). Fabre *et coll.* ont montré que la stabilité de la phase ferrosmectique dépend⁸⁶ :

- du taux de gonflement : l'espace disponible entre les bicouches doit être au moins de l'ordre de la taille des nanoparticules (dans leur cas, au moins 9nm qui correspond au diamètre d'une nanoparticule entourée de sa couche de tensioactifs)

- de la fraction volumique en particules ϕ dans le ferrofluide : pour $\phi > 4\%$, il y a ségrégation entre particules et phase lamellaire non dopée.

En ce qui concerne notre système, le ferrofluide est constitué de particules de maghémite en suspension dans l'eau dont le coeur cristallin fait 3,7 nm (déterminé par MET, partie II-A-1). Nous appliquons le même principe de fabrication que Fabre *et coll.* puisque le gonflement de la phase lamellaire se fait par ajout du ferrofluide. Le pas smectique de notre formulation est de l'ordre de 6 nm et l'épaisseur de couche aqueuse existant entre les bicouches lipidiques est de 2 nm (chapitre 1). L'espace inter-lamellaire est faible pour répondre au premier critère de stabilité énoncé par Fabre *et coll.* La fraction volumique en particules du ferrofluide dilué inséré entre les bicouches s'échelonne de 0.003 % pour $[\text{Fe}]_{\text{introduite}} = 2\text{mM}$ à 0.2 % pour $[\text{Fe}]_{\text{introduite}} = 125\text{mM}$. Le système se situe donc plutôt dans un régime dilué de particules, le deuxième critère de stabilité est rempli.

La figure 3.27 présente le spectre de diffraction des rayons X aux moyens angles pour des phases lamellaires cisailées issues de l'hydratation des lipides par des ferrofluides de dilution différente ($[\text{Fe}]_{\text{introduite}}$ varie).

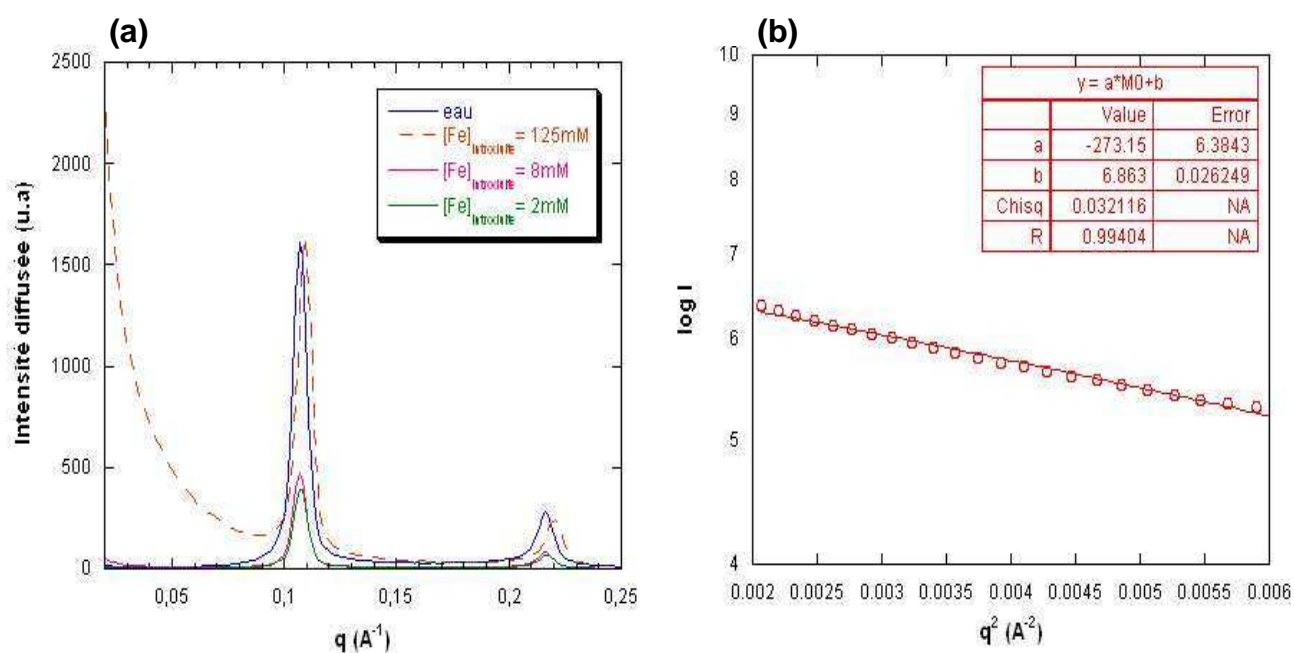


Figure 3.27 : (a) Spectres de diffraction des rayons X aux moyens angles pour des phases lamellaires cisailées (PC-monooléine 90-10% molaire) pour différentes concentrations en particules introduites ; (b) Détermination du rayon de Guinier par le tracé de $\log I$ en fonction de q^2 pour les faibles valeurs du vecteur de diffusion

Pour tous les échantillons testés, les spectres présentent les pics de Bragg caractéristiques de la structure répétitive de la phase lamellaire. Le pas smectique (ou distance de répétition) calculé est de 6,3nm.

Pour la phase lamellaire cisailée gonflée avec un ferrofluide dilué de concentration $[\text{Fe}]_{\text{introduite}} = 125\text{mM}$, le signal obtenu présente une intensité diffusée très élevée aux faibles valeurs du vecteur d'onde. Cette diffusion centrale est due aux nanoparticules magnétiques, comme nous allons le montrer.

Pour des particules colloïdales sphériques sans interactions (facteur de structure égal à 1), le développement limité de l'expression du facteur de forme du signal diffusé dans la limite des faibles valeurs du vecteur de diffusion ($qR \ll 1$) permet d'obtenir la loi de Guinier⁸⁷ :

$$I(q)_{q \rightarrow 0} = \exp\left(-\frac{R_G^2 \times q^2}{5}\right)$$

Ainsi si l'on trace $\log I$ en fonction de q^2 pour les faibles valeurs de q , la pente de la droite nous permet d'accéder au rayon de Guinier. A partir de la figure 3.27b, nous trouvons une valeur de : $R_{G(\text{expérimental})} = 3.7 \text{ nm}$.

Le rayon de Guinier est influencé par la distribution en taille des particules⁸⁵ de telle sorte que :

$$R_G = \frac{d_0}{2} \exp(7\sigma^2)$$

où d_0 est la moyenne géométrique et σ est l'écart-type. Les observations de MET nous ont permis de déterminer $d_0 = 3.6 \text{ nm}$ et $\sigma = 0.3 \text{ nm}$ (partie II-A-1, ajustement de la figure 3.22) d'où une valeur de : $R_{G(\text{théorique})} = 3,4 \text{ nm}$.

Il existe un bon accord entre les valeurs de $R_{G(\text{expérimental})}$ et $R_{G(\text{théorique})}$ ce qui confirme que le signal de diffusion centrale est bien dû à la présence de nanoparticules de maghémite. A $[\text{Fe}]_{\text{introduite}} = 125\text{mM}$, il y a donc ségrégation entre la phase lamellaire (pics de Bragg observés), contenant ou pas des particules, et une phase isotrope de particules magnétiques. L'espace disponible entre les bicouches, plus faible (environ 2 nm) que le diamètre moyen des particules (environ 4 nm), peut expliquer ce phénomène de ségrégation.

Malgré le fait que le système soit en régime dilué, il semble tout de même y avoir un effet de la quantité de particules introduite au sein de la phase lamellaire cisailée. En effet, pour $[\text{Fe}]_{\text{introduite}} = 2\text{mM}$ il n'y a pas de diffusion centrale, contrairement à $[\text{Fe}]_{\text{introduite}} = 8\text{mM}$. Entre $[\text{Fe}]_{\text{introduite}} = 8\text{mM}$ et $[\text{Fe}]_{\text{introduite}} = 125\text{mM}$, l'intensité du signal de diffusion centrale dû aux particules a fortement augmenté. Ce résultat signifie que plus la concentration en particules introduite augmente, plus la quantité de particules ségréguées est importante.

Cette étude aurait méritée d'être plus poussée mais elle laisse supposer que plus la concentration en particules introduite est élevée, plus la quantité de particules non encapsulées augmente. D'autre part, la présence, pour tous les échantillons, de pics de Bragg reflétant la distance de répétition entre bicouches lipidiques montre qu'une phase lamellaire est toujours présente quelque soit la concentration en fer introduite. Il est donc possible de former des oignons même à des concentrations en particules introduites élevées, mais ces oignons ne contiennent pas forcément de particules. Plus la ségrégation particules/phase lamellaire est importante, plus la probabilité de former des hybrides oignon/particules est faible. C'est ce que nous allons montrer dans la suite.

2. Etude qualitative de l'encapsulation par cryoMET

La cryoMET constitue une technique appropriée pour se rendre compte de la stabilité de l'hybride oignon/particules magnétiques. Nous avons fait varier la concentration en fer introduite dans les différents échantillons observés. Des images caractéristiques sont présentées dans la figure 3.28.

Nous avons fait une étude statistique en nous basant sur toutes les images de cryoMET réalisées. Nous avons ainsi compté :

- le nombre total d'objets observés (oignons + MLV + liposomes) : N_{total}
- le nombre d'oignons parmi N_{total} : N_{oignons} ,
- le nombre d'oignons contenant des particules parmi N_{oignons} , c'est-à-dire le nombre d'hybrides oignon/particules : $N_{\text{oignon/particules}}$

Le tableau 3.7 récapitule les résultats.

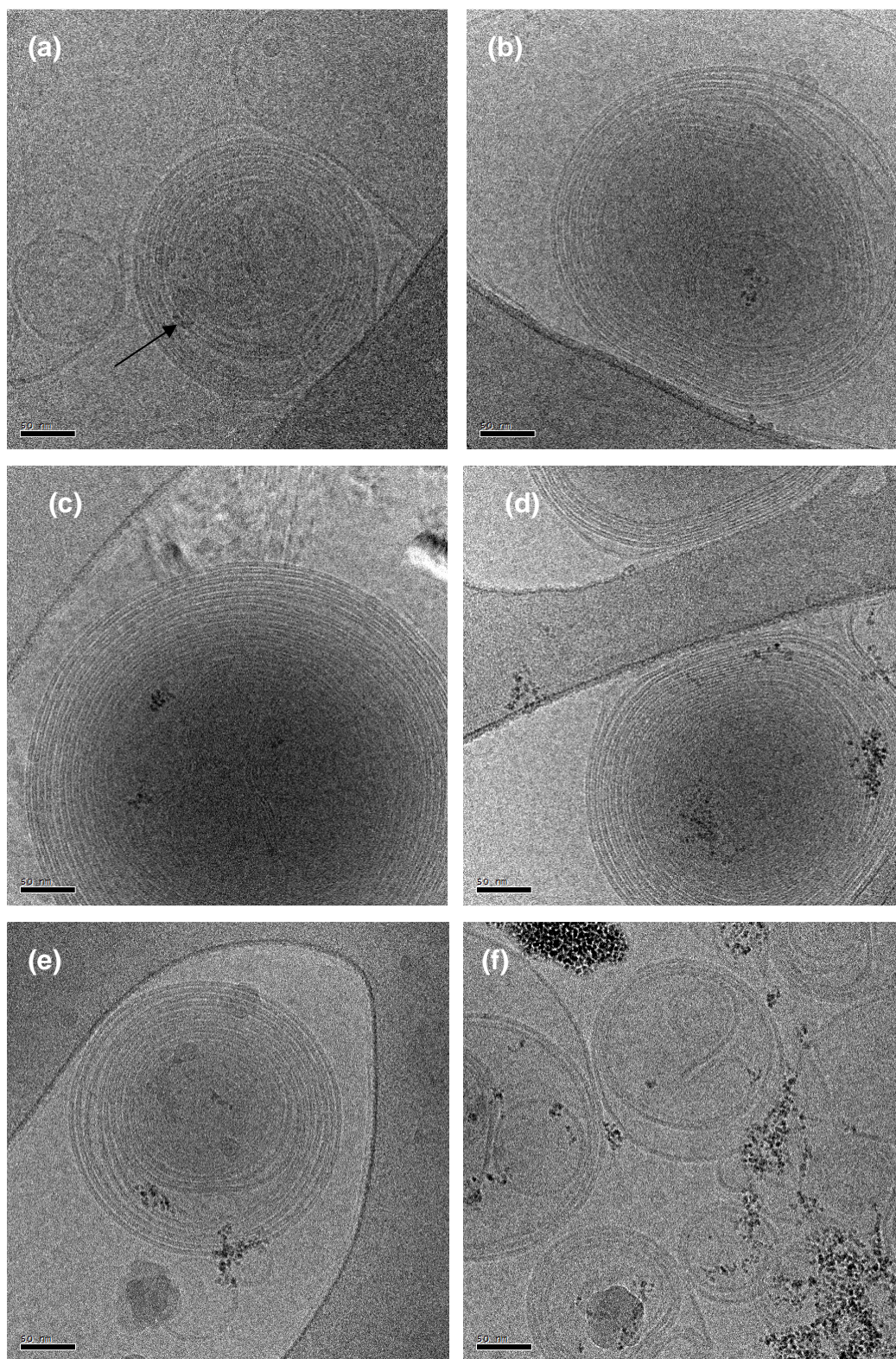


Figure 3.28 : Images de cryoMET caractéristiques pour des oignons contenant des concentrations en fer différentes : (a) $[\text{Fe}]_{\text{introduite}} = 8\text{mM}$; (b) 19.7mM ; (c) 39.4mM ; (d) 58.7mM ; (e) et (f) 125mM : oignons et vésicules unilamellaires + particules à l'extérieur

[Fe] _{introduite} (mM)	N _{total}	N _{oignons}	N _{oignon/particules}	% d'oignons	% d'hybrides oignon/particules parmi N _{oignon}
8	17	7	2	41	28
19.7	30	10	7	33	70
39.4	23	13	10	56	77
58.7	28	15	11	54	73
125	30	12	5	40	42

Tableau 3.7 : Effet de la concentration en fer sur la stabilité de l'hybride oignon/particules

Remarquons tout d'abord que, d'après le tableau 3.7, le pourcentage d'hybrides oignon/particules est faible pour $[\text{Fe}]_{\text{introduite}} = 8\text{mM}$. A cette concentration, très peu d'agrégats de particules sont observés au sein des oignons, et la limite de résolution du microscope ne nous permet pas de distinguer de façon claire les particules isolées. Ce faible pourcentage d'hybrides peut donc être dû à un problème de résolution. Le pourcentage peu élevé d'oignons pour $[\text{Fe}]_{\text{introduite}} = 19.7\text{mM}$ ne s'explique pas (variations expérimentales au cours de la préparation de l'échantillon).

Le pourcentage d'hybrides oignon/particules reste à peu près constant pour $[\text{Fe}]_{\text{introduite}}$ variant de 19.7 à 58.7mM : il est de $73 \pm 4 \%$. Puis il chute à 42% pour $[\text{Fe}]_{\text{introduite}} = 125\text{mM}$. Cette observation confirme les résultats des analyses par diffraction des rayons X : lorsque la concentration en fer introduite est élevée, la ségrégation particules/phase lamellaire est plus importante. La figure 3.28f montre d'ailleurs un grand nombre de particules non encapsulées. De plus, le pourcentage d'oignons passe de $55 \pm 1 \%$ pour $[\text{Fe}]_{\text{introduite}} = 39.4$ et 58.7mM, à 40% pour $[\text{Fe}]_{\text{introduite}} = 125\text{mM}$. Ce phénomène de ségrégation n'est donc pas sans effet sur la structure interne des oignons. L'introduction d'un trop grand nombre de particules induit une déstructuration des oignons, comme le montre la présence de vésicules unilamellaires sur la figure 3.28f.

D'après les figures 3.28c, 3.28d et 3.28e, les particules de maghémite s'insèrent entre les bicouches lipidiques, dans la couche aqueuse, ce qui n'est pas étonnant puisque leur surface est hydrophile. Leur encapsulation crée des défauts dans la succession des bicouches lipidiques : des « poches d'eau » peuvent apparaître comme nous le voyons sur les figures 3.28d et 3.28e. Au passage, ceci est une preuve de l'encapsulation des particules au sein des oignons. En effet, les images obtenues par cryoMET étant une projection en deux dimensions d'un objet en 3D, il est quelquefois difficile de trancher au sujet de la localisation des particules.

D'autre part, une partie des particules magnétiques est encapsulée sous forme d'**agrégats**. Notons qu'il est vraisemblable que des particules isolées soient également présentes : la limite de résolution du microscope rend leur visualisation difficile.

Il faut rester prudent quant à la déduction d'une taille à partir d'images de cryoMET, celles-ci étant une projection 2D d'un objet 3D. Néanmoins, remarquant que la taille des agrégats encapsulés semblait augmenter avec la concentration en particules introduite jusqu'à $[\text{Fe}]_{\text{introduite}} = 58.7\text{mM}$ (**figure 3.28a à 3.28d**), nous avons fait une étude de l'évolution relative de la taille des agrégats en fonction de la concentration en fer introduite.

La figure 3.29 présente l'évolution du diamètre des agrégats « en solution » en fonction de $[\text{Fe}]_{\text{introduite}}$, calculé à partir de l'expression donnée par Berret *et coll.*⁶¹. Ces auteurs ont étudié l'influence de l'agrégation de nanoparticules de maghémite au sein de capsules coeur-écorce formées par des copolymères diblocs polyélectrolyte-neutre, sur les propriétés d'agent de contraste des nanoparticules. Le bloc polyélectrolyte étant chargé positivement, il forme un complexe électrostatique avec les particules de maghémite chargées négativement. Ceci constitue le coeur de la capsule, les blocs neutres s'organisant autour pour former l'écorce. Suivant la longueur du bloc polyélectrolyte, la taille des agrégats de particules magnétiques encapsulés varie. Afin d'étudier l'évolution en taille, ils ont utilisé la diffusion dynamique de la lumière et la cryoMET. En considérant les agrégats observés comme ellipsoïdaux (2D), ils remontent à leur diamètre « en solution » (~ diamètre de giration de l'objet en 3D) grâce à la formule suivante⁸⁸ :

$$D^{\text{cryoMET}} = \frac{a}{G(\rho)} \text{ où } \rho = \frac{b}{a} \text{ avec } G(\rho) = \frac{1}{\sqrt{1-\rho^2}} \times \ln \left(\frac{1+\sqrt{1-\rho^2}}{\rho} \right)$$

où $\rho = b/a$ avec a grand axe de l'ellipse et b petit axe de l'ellipse, mesurés sur les images de cryoMET.

Les agrégats observés dans notre cas étant ellipsoïdaux, cette formule est applicable et nous avons fait ce calcul pour chaque agrégat observé par cryoMET au sein d'un oignon. Le graphe de la figure 3.29 présente la moyenne des diamètres des agrégats « en solution » pour chaque concentration en particules introduite. Pour $[\text{Fe}]_{\text{introduite}} = 8\text{mM}$, le calcul n'a pas été fait car seulement deux agrégats de particules sont observés.

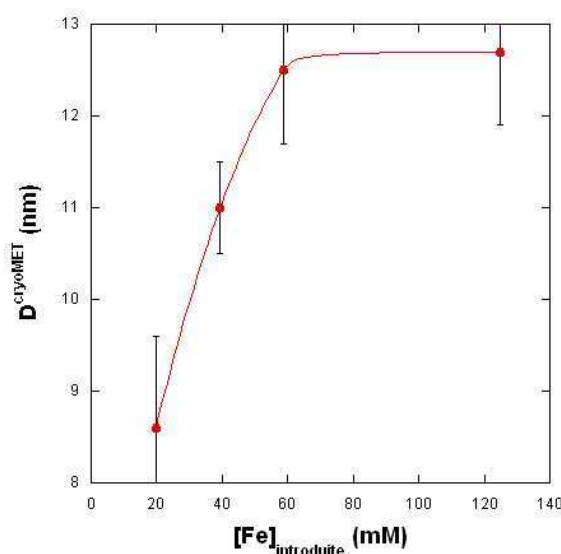


Figure 3.29 : Diamètre des agrégats « en solution » observés par cryoMET en fonction de la concentration en fer introduite (La courbe tracée est un guide, ce n'est pas un ajustement.)

Le diamètre des agrégats encapsulés augmente jusqu'à $[\text{Fe}]_{\text{introduite}} = 58.7\text{mM}$ et il reste constant pour $[\text{Fe}]_{\text{introduite}} = 125\text{mM}$. Il existe donc une **taille maximale des agrégats** encapsulés.

Conclusion :

Les observations de cryoMET nous ont donc permis de dégager l'existence d'une concentration en fer critique, comprise entre 58.7mM et 125mM, au delà de laquelle la stabilité des oignons n'est plus assurée. Des points supplémentaires auraient été nécessaires afin d'affiner la détermination de cette concentration.

Les particules de maghémite étant hydrophiles, elles s'insèrent naturellement entre les bicouches lipidiques. Bien que toute déduction d'une taille à partir d'images de cryoMET (pour un objet non sphérique) soit à prendre avec précaution du fait de la projection 2D d'un objet 3D, la formule de Berret *et coll.*⁶¹ nous permet de remonter à un diamètre des agrégats « en solution ». Il existe ainsi une taille maximale des agrégats encapsulés (environ 12nm), correspondant sans doute à la déformation maximale que peuvent subir les bicouches avant déstructuration de l'oignon (formation des poches d'eau).

Afin d'étayer cette étude qualitative, nous avons mis en oeuvre des techniques permettant de mesurer des taux d'encapsulation des particules en fonction de la concentration en fer introduite.

3. Etude quantitative : mesure d'un taux d'encapsulation

a)- Résonance paramagnétique électronique (RPE)

La RPE permet de sonder les transferts d'électrons célibataires d'un niveau d'énergie à un autre (levée de dégénérescence dans un champ magnétique non nul, effet Zeeman) pour le fer de degré d'oxydation +III de la maghémite. L'intensité du pic de résonance étant directement proportionnel à la quantité de spins non appariés contenus dans l'échantillon, l'expérience de RPE va nous permettre de quantifier les Fe(III) et donc les particules de maghémite.

Nous avons mesuré l'intensité du pic de résonance pour des dispersions d'oignon/particules **avant** et **après** élimination des particules non encapsulées par chromatographie d'exclusion de taille (partie II-A-3). A chaque mesure, le même volume d'échantillon a été introduit dans le tube RPE (200 μ L). Afin d'en déduire des taux d'encapsulation, le facteur de dilution de la colonne de chromatographie doit être pris en compte.

Nous avons fait varier la concentration en particules introduite au sein des oignons. Le tableau 3.8 présente les intensités mesurées ainsi que les taux d'encapsulation pour chaque concentration en fer.

[Fe] _{introduite} (mM)	I _{avant séparation} (u.a.)	I _{après séparation} (u.a.)	I _{après séparation} (u.a.) corrigée par facteur de dilution colonne : 12.5 ± 0.2	Taux d'encapsulation
8	5195 (± 1%)	407 (± 10%)	5087 (± 10%)	98 ± 10 %
19.7	11856 (± 1%)	409 (± 10%)	5105 (± 10%)	43 ± 4 %
39.4	25412 (± 1%)	1603 (± 10%)	20044 (± 10%)	79 ± 8 %
58.7	46479 (± 1%)	1992 (± 10%)	24903 (± 10%)	53 ± 5 %
125	123262 (± 1%)	2741 (± 10%)	34258 (± 10%)	28 ± 3 %

Tableau 3.8 : Taux d'encapsulation des particules de maghémite au sein des oignons mesurés par RPE

Précisons que la détermination de l'intensité du pic de résonance est difficile pour l'échantillon [Fe]_{introduite} = 8 mM après séparation, car le rapport signal/bruit est très faible dans ce cas. L'erreur sur le taux d'encapsulation déduit est donc plus grande que pour les autres valeurs de [Fe]_{introduite} (**tableau 3.8**).

Pour [Fe]_{introduite} = 39.4 mM, 58.7 mM, 125 mM, le taux d'encapsulation diminue à mesure que la concentration en particules introduite augmente. A partir de ces taux d'encapsulation, nous pouvons remonter à la concentration en fer encapsulée au sein des oignons. La figure 3.30 présente son évolution en fonction de la concentration en fer introduite.

Après une forte augmentation entre [Fe]_{introduite} = 19.7 mM et [Fe]_{introduite} = 39.4 mM, nous pouvons considérer que la concentration en fer encapsulée atteint un seuil. Les mesures de taux d'encapsulation par RPE nous ont donc permis de déduire l'existence d'une **concentration « seuil » en particules** qu'il est possible d'insérer dans les oignons : [Fe]_{seuil(RPE)} = 32 mM (à ± 10%). Dans la littérature, la charge en particules au sein des colloïdes (liposomes, particules magnétite-dextran, etc) est exprimée en mole de Fe(III) par mole de tensioactifs : ici c'est **2.10⁻² moles de Fe(III) par mole de lipides**. Au sein de liposomes, une charge maximale de 1.7 moles de Fe(III) par mole de lipides est obtenue⁵⁸.

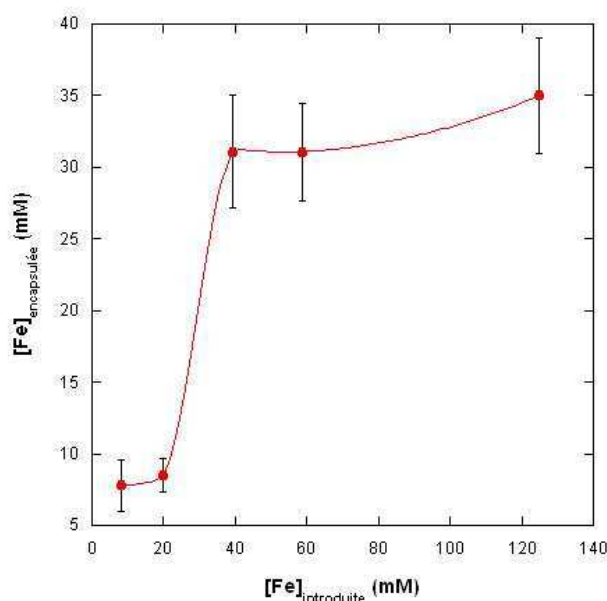


Figure 3.30 : Concentration en fer encapsulée obtenue par RPE en fonction de la concentration en fer introduite (La courbe tracée n'est pas un ajustement, c'est un guide.)

b)- Magnétométrie à détection SQUID

Le magnétomètre à détection SQUID permettant de mesurer des variations du champ magnétique très faibles (de l'ordre de 10^{-15} T), nous avons utilisé cette technique afin de confirmer et d'affiner les taux d'encapsulation mesurés par RPE.

Principe :

La détermination du taux d'encapsulation des particules par magnétométrie à détection SQUID repose sur le fait que l'aimantation est proportionnelle à la quantité de particules magnétiques. Nous avons donc mesuré l'aimantation en fonction du champ magnétique appliqué pour une dispersion oignon/particules **avant** et **après** élimination des particules non encapsulées.

Mise en œuvre :

Tout d'abord, l'aimantation des particules de maghémite, sous forme de poudre après lyophilisation du ferrofluide à encapsuler, est mesurée en fonction du champ magnétique

appliqué. La figure 3.31 présente la courbe de l'aimantation normalisée par gramme d'échantillon en fonction du champ magnétique appliqué.

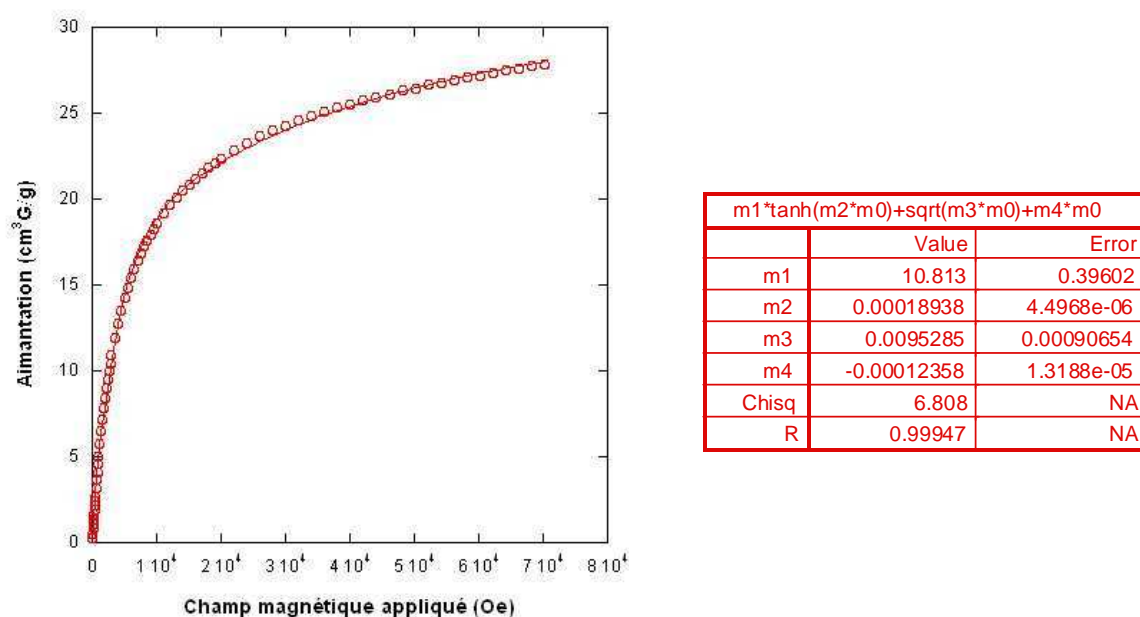


Figure 3.31 : Courbe d'aimantation du ferrofluide en fonction du champ magnétique appliqué à 295 K, et son ajustement

Cette courbe est ajustée par une fonction empirique : les paramètres intervenants n'ont pas de signification physique. Une moyenne des paramètres m_1 , m_2 , m_3 et m_4 est faite sur trois mesures de l'aimantation : $m_1 = 10.88$, $m_2 = 2,47 \cdot 10^{-4}$, $m_3 = 12,28 \cdot 10^{-3}$ et $m_4 = -1,73 \cdot 10^{-4}$. Ces valeurs des paramètres vont être utilisées lors de l'ajustement des courbes d'aimantation des hybrides oignon/particules. L'aimantation (par gramme) des particules en fonction du champ magnétique appliqué est alors définie empiriquement comme :

$$M_{\text{maghémite}} = 10.88 \times \tanh(0.000247 \times H) + \sqrt{0.01228 \times H} - 0.000173 \times H$$

Du fait de la susceptibilité magnétique importante exhibée ($\chi_m = 5 \cdot 10^{-3} \text{ cm}^3/\text{g}$; pour des particules de maghémite de 8 nm de diamètre, la susceptibilité magnétique exhibée est d'environ $6 \cdot 10^{-2} \text{ cm}^3/\text{g}$ ⁷⁶), nous pouvons dire que les nanoparticules de maghémite sont superparamagnétiques à température ambiante. L'aimantation à saturation n'est pas atteinte.

Des défauts dans la structure cristalline des particules, dus à leur très petite taille (3,7 nm), peuvent être à l'origine de ce phénomène.

Ensuite l'aimantation des dispersions lyophilisées d'oignon/particules (avant et après chromatographie par exclusion de taille) est mesurée en fonction du champ magnétique appliqué. Les dispersions ont été lyophilisées en même temps afin que la quantité d'eau sublimée soit identique pour chaque échantillon. L'aimantation mesurée est normalisée par gramme afin que la masse d'échantillon introduite n'intervienne pas dans le calcul du taux d'encapsulation.

La figure 3.32 présente deux courbes caractéristiques de ce qui est obtenu avant et après séparation.

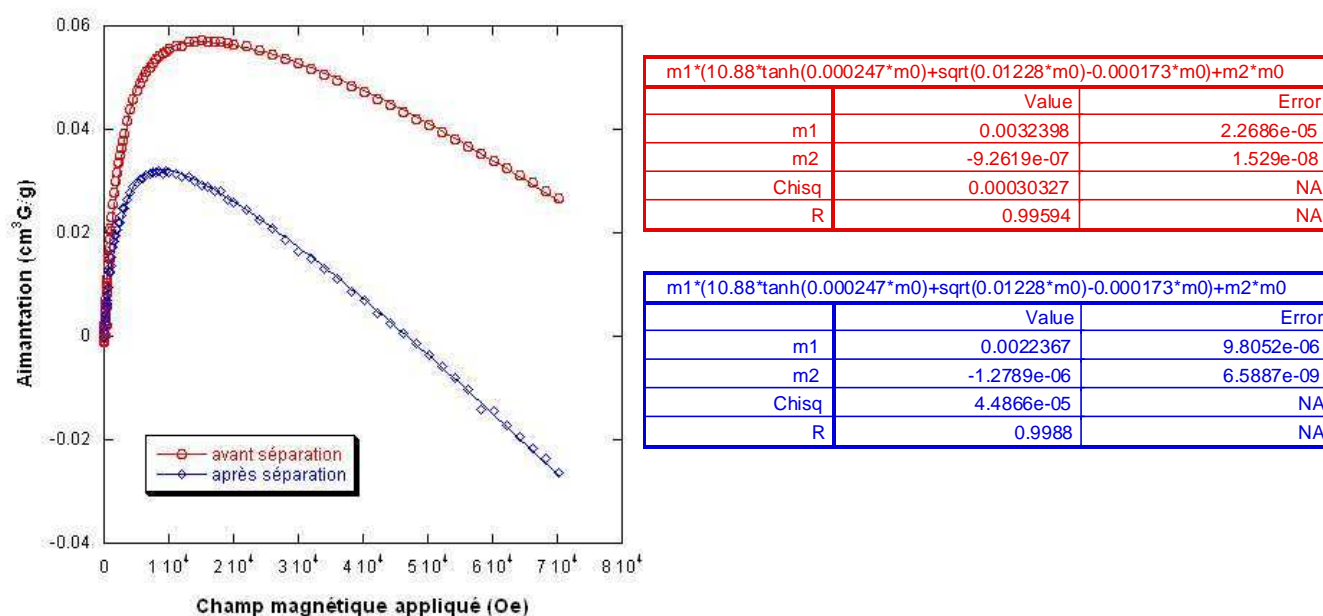


Figure 3.32 : Courbe d'aimantation des hybrides oignon/particules à 295 K pour $[\text{Fe}]_{\text{introduite}}=39.4 \text{ mM}$ en fonction du champ magnétique appliqué, avant et après séparation

L'ajustement des courbes d'aimantation des échantillons oignon/particules est le suivant :

$$M = m_1 \times M_{\text{maghémite}} + m_2 \times H$$

avec $M_{\text{maghémite}}$ définie précédemment.

Le premier terme constitue la composante de l'aimantation due aux nanoparticules superparamagnétiques présentes dans l'échantillon. $M_{\text{maghémite}}$ est l'ajustement empirique déduit de la courbe d'aimantation de la figure 3.31. Le paramètre m_1 est un coefficient pondérant de $M_{\text{maghémite}}$ et qui donne accès au pourcentage de particules en masse dans l'échantillon.

Le deuxième terme est la composante diamagnétique de l'aimantation imputée aux constituants organiques des oignons. Ainsi le paramètre m_2 représente la susceptibilité diamagnétique de ces composés : elle est négative.

Les taux d'encapsulation ont donc été déterminés à partir des valeurs du paramètre m_1 avant/après élimination des particules non encapsulées. Le tableau 3.9 récapitule les résultats pour différentes concentrations en fer introduites dans les oignons.

[Fe] (mM)	Valeur de m_1 avant séparation	Valeur de m_1 après séparation	Taux d'encapsulation
10.8	0.094 ($\pm 4\%$)	0.044 ($\pm 10\%$)	47 \pm 3 %
15	0.116 ($\pm 4\%$)	0.087 ($\pm 4\%$)	75.0 \pm 0.2 %
19.7	0.185 ($\pm 5\%$)	0.098 ($\pm 4\%$)	53.0 \pm 0.4 %
39.4	0.324 ($\pm 6\%$)	0.223 ($\pm 4\%$)	69 \pm 1 %
58.7	0.489 ($\pm 4\%$)	0.227 ($\pm 4\%$)	46.4 \pm 0.1 %
75	0.673 ($\pm 4\%$)	0.215 ($\pm 4\%$)	31.9 \pm 0.1 %

Tableau 3.9 : Taux d'encapsulation des particules de maghémite au sein des oignons mesurés par magnétométrie

Les taux d'encapsulation mesurés par magnétométrie sont du même ordre de grandeur que ceux mesurés par RPE à 10% près (sauf pour $[\text{Fe}]_{\text{introduite}} = 8 \text{ mM}$ où le rapport signal/bruit est très faible en RPE). Ces différences peuvent provenir de la préparation des échantillons, et notamment des passages sur colonne de chromatographie d'exclusion de taille.

La figure 3.33 présente l'évolution de la concentration en fer encapsulée (déduite des taux d'encapsulation) en fonction de la concentration en fer introduite. Le point à $[\text{Fe}]_{\text{introduite}} = 15\text{mM}$, pour lequel la valeur du taux d'encapsulation semble aberrante par rapport à l'évolution de celui-ci en fonction de la concentration en fer introduite, n'est pas pris en compte.

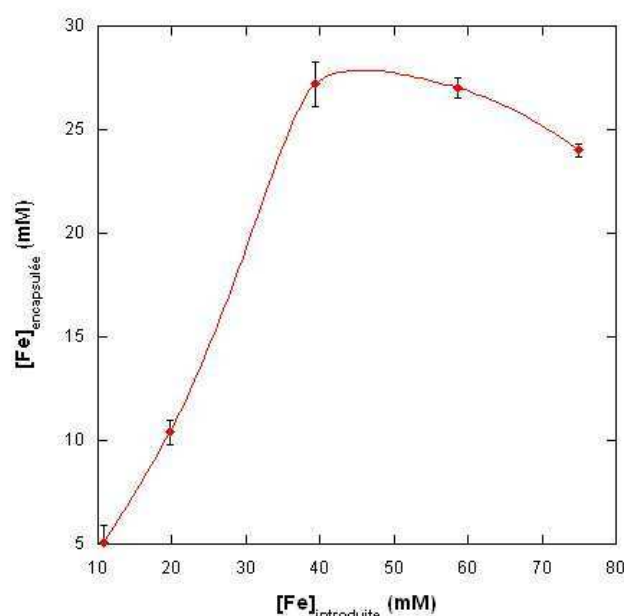


Figure 3.33 : Concentration en fer encapsulée obtenue par magnétométrie en fonction de la concentration en fer introduite (La courbe tracée n'est pas un ajustement, c'est un guide.)

Après une forte augmentation entre $[\text{Fe}]_{\text{introduite}} = 19.7\text{mM}$ et $[\text{Fe}]_{\text{introduite}} = 39.4\text{mM}$, nous pouvons considérer que la concentration en fer encapsulée atteint un seuil. La légère chute de la concentration encapsulée pour $[\text{Fe}]_{\text{introduite}} = 75\text{mM}$ peut éventuellement s'expliquer par une déstructuration des oignons en présence d'un grand nombre de particules. Les mesures des taux d'encapsulation par magnétométrie à détection SQUID ont donc abouti à la détermination d'une **concentration « seuil » en particules** qu'il est possible d'insérer au sein des oignons : $[\text{Fe}]_{\text{seuil(SQUID)}} = 26 \text{ mM}$ (à $\pm 1\%$), ce qui correspond à une charge de $1,5 \cdot 10^{-2}$ mole de Fe(III) par mole de lipides.

4. Conclusion et discussion

Cette étude sur l'encapsulation de nanoparticules magnétiques au sein des oignons a mis en avant deux principaux résultats.

Tout d'abord, les analyses par diffraction des rayons X ont montré qu'il y a ségrégation entre les particules et la phase lamellaire lorsque la quantité de particules introduite est trop élevée. Cette hypothèse est confirmée par les observations de cryoMET : elles nous ont permis de conclure à l'existence d'une concentration en fer critique, comprise entre 58.7mM et 125mM, au delà de laquelle la stabilité des oignons n'est plus assurée.

Ensuite, concernant les taux d'encapsulation mesurés par résonance paramagnétique électronique et par magnétométrie, ils sont comparables. Ils sont compris entre 30 et 80%, alors que le taux d'encapsulation de nanoparticules de maghémite au sein de liposomes est de 2%⁵⁸. Ces mesures ont mis en évidence l'existence d'une concentration « seuil » en fer encapsulée. Les résultats de résonance paramagnétique électronique et de magnétométrie sont cohérents entre eux, à l'erreur près :

$$-[\text{Fe}]_{\text{seuil(RPE)}} = 32 \text{ mM} \pm 10\%$$

$$-[\text{Fe}]_{\text{seuil(SQUID)}} = 26 \text{ mM} \pm 1\%$$

La mise en évidence de cette concentration « seuil » en Fe(III) encapsulée nous permet de déterminer une charge maximale en fer au sein des oignons qui est de l'ordre de **2.10^{-2} moles de Fe(III) par mole de lipides**. Cette valeur est inférieure de deux ordres de grandeurs à la valeur maximale mesurée pour des liposomes⁵⁸ : 1,7 moles de Fe(III) par mole de lipides. Seulement, de part leur structure multicouches, les oignons contiennent beaucoup plus de lipides que des liposomes et le rapport $n_{\text{Fe(III)}}/n_{\text{lipides}}$ est d'autant plus faible. C'est pourquoi nous avons préféré raisonner en terme de nombre de moles de Fe(III) par vésicule.

Dans le cas des oignons, nous avons calculé le nombre d'oignons contenus dans 100mg de pâte (phase lamellaire cisailée), en supposant que la masse volumique d'un oignon est proche de 1 g/cm^3 (donc $100\text{mg} = 100\mu\text{L}$) et que le volume d'un oignon est celui d'une sphère de 300nm de diamètre. Connaissant le nombre de moles de Fe(III) introduit dans 100mg de pâte (déduit de $[\text{Fe}]_{\text{seuil(SQUID)}} = 26\text{mM}$), nous déduisons le nombre de moles de Fe(III) par oignon : environ 1.10^{-19} moles de Fe(III) par oignon.

Dans le cas des liposomes magnétiques⁶¹, nous avons calculé le nombre de moles de lipides par liposomes. Connaissant le diamètre des liposomes (200nm), l'aire occupée par la tête polaire d'une molécule de phosphatidylcholine ($S = 71.7 \text{ \AA}^2$, ⁸⁹) et faisant l'hypothèse que la circonférence du feuillet interne est la même que celle du feuillet externe, nous avons calculé le nombre de molécules, puis le nombre de moles, de phospholipides constituant la bicouche du liposome. Connaissant le nombre de moles de Fe(III) par mole de lipides, nous en déduisons un nombre de moles de Fe(III) par liposome : environ 1.10^{-18} moles de Fe(III) par liposome.

Finalement, la charge en Fe(III) est 10 fois moins importante dans les oignons que dans les liposomes, de diamètre comparable.

Les images de cryoMET montrent que les particules magnétiques sont encapsulées principalement sous forme d'agrégats entre les bicouches des oignons. Le diamètre de ces agrégats en fonction de la concentration en fer introduite a été calculé en nous basant sur les travaux de Berret *et coll.*⁶¹ : un « diamètre seuil » apparaît. Il existe donc une taille maximale des agrégats qu'il est possible d'encapsuler. Ainsi, la taille des agrégats pouvant se loger entre deux bicouches lipidiques, sans trop les déformer pour ne pas détruire l'oignon, constitue le facteur limitant de la charge en particules. La concentration seuil en fer introduite, déterminée par les mesures de taux d'encapsulation, dépend donc principalement de la taille des agrégats de particules. **L'état de floculation des particules de maghémite au sein du ferrofluide détermine finalement la quantité de particules encapsulées sous forme d'agrégats.**

Précisons que, le magnétomètre à détection SQUID étant un appareil de mesure très sensible comme le démontrent les valeurs des erreurs sur les taux d'encapsulation, les valeurs des concentrations en fer encapsulées seront déterminées dans la suite (IRM, chapitre 4) à partir des taux d'encapsulation obtenus par SQUID.

Références

- ¹ a) Garcia-Garcia E., Andrieux K., Gil S., Couvreur P., *Int. J. Pharm.*, **2005**, 298, 274 ; b) Lo EH., Singhal AB., Torchilin VP., Abbott NJ., *Brain Res. Rev.*, **2001**, 38, 140
- ² a) Arap W., Pasqualini R., Ruoshlati E., *Science*, **1998**, 279, 377; b) Olson TA., Mohanraj D., Roy S., Ramakrishnan S., *Int. J. Cancer*, **1997**, 73, 865; c) Maeda H., *Adv. Enzyme Regulation*, **2001**, 41, 189
- ³ Grislain L., Couvreur P., Lenaerts V., Roland M., Deprez-Decampeneere A., Speiser P., *Int. J. Pharm.*, **1983**, 15, 335
- ⁴ Juillerat-Jeanneret L., Schmitt F., *Medicinal Research Reviews*, **2007**, 27(4), 574
- ⁵ a) Wu M., Gunning W., Ratnam M., *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, **1999**, 8, 775; b) Toffoli G., Cernigoi C., Russo A., Gallo A., Bagnoli M., Boiocchi M., *Int. J. Cancer*, **1997**, 74, 193; c) Franklin WA., Waintrub M., Edwards D., Christensen K., Prendegast P., Woods J., Bunn PA., Kolhouse JF., *Int. J. Cancer. Suppl.*, **1994**, 8, 89
- ⁶ a) Boyle JJ., *Curr. Vasc. Pharmacol.*, **2005**, 3, 63 ; b) Hilgenbrink AR., Low PS., *J. Pharm. Sci.*, **2005**, 94, 2135
- ⁷ Saul JM., Annapragada A., Natarajan JV., Bellamkonda RV., *J. Control Release*, **2003**, 14, 563
- ⁸ Qualls MM., Thompson DH., *Int. J. Cancer*, **2001**, 93, 284
- ⁹ Leamon CP., Cooper SR., Hardee GE., *Bioconjug. Chem.*, **2003**, 14, 738
- ¹⁰ a) Derossi D., Chassaing G., Prochiantz A., *Trends Cell. Biol.*, **1998**, 8, 84; b) Bagshawe KD., *Br. J. Cancer*, **1987**, 56, 531; c) Tomino S., Paigen K., *J. Boil. Chem.*, **1975**, 250, 8503
- ¹¹ Embleton MJ., Rowland GF., Simmonds RG., Jacobs E., Mardsen CH., Baldwin RW., *Br. J. Cancer*, **1983**, 47, 43
- ¹² a) site de la « Cardiovascular and Interventional Radiological Society of Europe », cancer du foie : <http://www.cirse.org/index.php?pid=154&lang=4>; b) Liu J., Flores G.A., Sheng R., *J. Magn. Mater.*, **2001**, 225, 209

- ¹³ Chouly C., *Etude des relations structure-biodistribution et biocompatibilité de nanoparticules de magnétite-dextran (MD) utilisables pour l'IRM*, thèse de l'Université d'Angers, **1993**
- ¹⁴ Van Oss C.J., *Methods. Enzymol.*, **1986**, 132, 3
- ¹⁵ Moghimi SM., Patel HM., *Adv. Drug Delivery Rev.*, **1998**, 32, 45
- ¹⁶ a) Wilkins D., Meyers PA., *Brit. J. Pathol.*, **1966**, 47, 568 ; b) Kissel T., Rosser M., *Control. Rel. Bioact. Mater.*, **1991**, 18, 275; c) Tabata Y., Ikada Y., *Biomaterials*, **1988**, 9, 356
- ¹⁷ Illum L., Davis SS., *FEBS Lett.*, **1984**, 167, 79
- ¹⁸ Illum L., Jacobsen LO., Muller RH., Mak E., Davis SS., *Biomaterials*, **1987**, 8, 113
- ¹⁹ a) Portney N., Ozkan M., *Anal. Bioanal. Chem.*, **2006**, 384, 620; b) Gollander CG., Lin YS., Hlady V., Andrade JD., *Colloids Surf.*, **1990**, 49, 289
- ²⁰ Kayes JB., Rawlins DA., *Colloid Polym. Sci.*, **1979**, 257, 622
- ²¹ a) Couvreur P., Kante B., Roland M., Guiot P., Baudhuin P., Speiser P., *J. Pharm. Pharmacol.*, **1979**, 31, 331 ; b) Soma CE., Dubernet C., Bentolila D., Benita S., Couvreur P., *Biomaterials*, **2000**, 21, 1 ; c) Zobel HP., Zimmer A., Atmaca-Abdel S., Gilbert M., Werner D., Noe CR., Kreuter J., Stieneker F., *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **1999**, 47, 203 ; d) Giammona G., Cavallara G., Pitarresi G., Pedone E., *Colloid Polym. Sci.*, **2000**, 278, 69
- ²² a) Tartaj P., Puerto Morales M., Veintemillas-Verdaguer S., Gonzalez-Carreno T., Serna CJ., *J. Phys. D : Appl. Phys.*, **2003**, 36, R 182 ; b) Shinkai M., *J. Biosci. Bioeng.*, **2002**, 94(6), 606; c) Berry C.C., *J. Mater. Chem.*, **2005**, 15, 543
- ²³ Jain PK., El-Sayed IH., El-Sayed M., *Nanotoday*, **2007**, 2(1), 18
- ²⁴ Poste G., Kirsh R., *Biotechnology*, **1983**, 1, 869
- ²⁵ Faure C., Nallet F., Roux D., Milner S., Gauffre F., Olea D., Lambert O., *Biophys. J.*, **2006**, 91, 4340
- ²⁶ Olea D. and Faure C., *J. Chem. Phys.*, **2003**, 119, 12, 6111
- ²⁷ Belamie E., Argoul F., Faure C., *J. Electrochem. Soc.*, **2001**, 148, 4, C301

- ²⁸ Pott T., Laversanne R., Roux D., *Incorporation d'ADN dans les phases lamellaires et conception de nouveaux vecteurs non-ioniques*, Brevet FR.9916191, **1999**
- ²⁹ Poirier C., *Interaction colloïdes-cellules : étude de l'adhésion spécifique*, thèse à l'Université Bordeaux 1, 2004
- ³⁰ Chenevier P., *Vésicules multilamellaires de type oignons comme vecteurs biologiques ciblés*, thèse à l'Université Bordeaux 1, **2001**
- ³¹ Gauffre F., *Utilisation de vésicules préparées par cisaillement d'une phase lamellaire comme microréacteurs chimiques*, thèse à l'Université Bordeaux 1, **1997**
- ³² Faure C., Guillot S., Weissbecker P., Saadaoui H., *Adv. Mater.*, **2006**, 18, 1141
- ³³ Pott T., Roux D., *FEBS Letters*, **2001**, 511, 150
- ³⁴ Roux D. et coll., *Current Med. Chem.*, **2004**, 10, 1241
- ³⁵ Mignet N., Brun A., Degert C. et coll., *Nucleic Acid Research*, **2000**, 28(16)
- ³⁶ Gaubert S., Delord B., Amédée J., et coll., *Drug Delivery*, **2004**
- ³⁷ Mornet S., Vasseur S., Grasset F., Duguet E., *J. Mater. Chem.*, **2004**, 14, 2161
- ³⁸ a) Wilson MW., Kerlan RK., Fidelman NA., LaBerge JM., Koda J., Gordon RL., *Radiology*, **2004**, 230(1), 287; b) Lubbe AS., Bergemann C., Brock J., McClure DG., *J. Magn. Magn. Mater.*, **1999**, 194, 149; c) Lemke AJ., Senfft MI., Lubbe A., Bergemann C., Riess H., Felix R., *Eur. Radiol.*, **2004**, 14, 1949
- ³⁹ Jordan A., Wust P., Scholz R., Faehling H., Krause J., Felix R., *Scientific and clinical applications of magnetic carriers*, **1997**, 43, 569, Plenum Press, New York
- ⁴⁰ a) Viroonchatapan E., Ueno M., Sato H., Adachi I., Nagae H., Tazawa K., Horikoshi I., *Pharmaceutical Research*, **1995**, 12(8), 1176; b) Ozer AY., Farivar M., Hincal AA., *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **1993**, 39(3), 97
- ⁴¹ Berkovsky BM., Medvedev VF., Karkov MS., *Magnetic Fluids: Engineering Application*, Oxford University Press: New York, **1993**
- ⁴² Massart R., *IEEE Trans. Magn.* MAG-17, **1981**, 1247

-
- ⁴³ Franck R., Tourinho F., Massart R., Perzynski R., *Prog. Coll. and Polym. Sc.*, **1989**, 79, 128
- ⁴⁴ Cabuil V., Massart R., *J. Chem. Phys.*, **1987**, 967
- ⁴⁵ Bee A., Massart R., Neveu S., *J. Magn. Magn. Mater.*, **1995**, 149, 6
- ⁴⁶ Fauconnier N., Pons JN., Roger J., Bee A., *J. Colloid and Interface Sci.*, **1997**, 194, 427
- ⁴⁷ Fauconnier N., Bée A., Roger J., Pons JN., *J. Molecular Liquids*, **1999**, 83, 233
- ⁴⁸ a) Dubois E., Cabuil V., Boué F., Perzynski R., *J. Chem. Phys.*, **1999**, 111(15), 7147 ; b) Lefebure S., Dubois E., Cabuil V., Neveu S., Massart R., *J. Mater. Res.*, **1998**, 13(10), 2975
- ⁴⁹ Bacri J-C., Perzynski R., Salin D., *J. Magn. Magn. Mater.*, **1990**, 85, 27
- ⁵⁰ a) Chan T., Eley W., Liberti P., Kressel HY., *Investigative Radiology*, **1992**, 27, 443; b) Sjogren CE., Johansson C., Naevestad A., Sontum PC., Briley-Saebo K., Fahlvik AK., *Magn. Reson. Imaging*, **1997**, 15(1), 55
- ⁵¹ Reimer P., Shen T., Lee AS., Brady TJ., Wittenberg J., Weissleder R., *Proc. Soc. Reson. Med.*, 11th annual meeting, **1992**, New York, 3224
- ⁵² Mornet S., Portier J., Duguet E., *J. Magn. Magn. Mater.*, **2005**, 293, 127
- ⁵³ Sonvico F., Mornet S., Vasseur S., Dubernet C., Jaillard D., Degrouard J., Hoebeke J., Duguet E., Colombo P., Couvreur P., *Bioconjugate Chem.*, **2005**, 16, 1181
- ⁵⁴ Bulte J.W. M., De Cuyper M., *Methods in Enzymology*, **2003**, 373, 175
- ⁵⁵ Bulte J.W.M., De Cuyper M., Despres D., Frank J.A., *J. Magn. Magn. Mater.*, **1999**, 194, 204
- ⁵⁶ De Cuyper M., Valtonen S., *J. Magn. Magn. Mater.*, **2001**, 225, 89
- ⁵⁷ Bogdanov A.A., Martin C., Weissleder R., Brady T.J., *Biochimica et Biophysica Acta*, **1994**, 1193, 212
- ⁵⁸ Martina M-S., Fortin J-P., Ménager C., Clément O., Barratt G., Grabielle-Madelmont C., Gazeau F., Cabuil V., Lesieur S., *J. Am. Chem. Soc.*, **2005**, 127, 10676

- ⁵⁹ a) Harada A., Kataoka K., *Macromolecules*, **1998**, 31, 288 ; b) Kataoka K., Togawa H., Harada A., Yasugi K., Matsumoto T., Katayose S., *Macromolecules*, **1996**, 29, 8556 ; c) Harada A., Kataoka K., *J. Macromol. Sci., Pure Appl. Chem.*, **1997**, A34, 2119
- ⁶⁰ Lecommandoux S., Sandre O., Chécot F., Rodriguez-Hernandez J., Perzynski R., *Adv. Mater.*, **2005**, 17(6), 712
- ⁶¹ Berret J-F., Schonbeck N., Gazeau F., El Kharrat D., Sandre O., Vacher A., Airiau M., *J. Am. Chem. Soc.*, **2006**, 128, 1755
- ⁶² Bulte J.W.M., Douglas T., Witwer B., Zhang S., Strable E., Lewis B.K., Zywicke H., Miller B., Van Gelderen P., Moskowitz B.M., Duncan I.D., Frank J.A., *Nature Biotechnology*, **2001**, 19, 1141
- ⁶³ Jolivet J-P, *De la solution à l'oxyde*, **1994**, p68-p167, Inter Editions et CNRS Editions, Paris
- ⁶⁴ Cornell R.M., Schwertmann U., *The Iron Oxides*, **2003**, Wiley
- ⁶⁵ Sarrazin J., Verdaguer M., *L'oxydoréduction, concepts et expériences*, éd. Ellipses
- ⁶⁶ Verstraeten S. V., Nogueira L.V., Schreier S., Oteiza P.I., *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **1997**, 338(1), 121
- ⁶⁷ Suwalsky M., Martinez F., Cardenas H., Grzyb J., Strzalka K., *Chemistry and Physics of Lipids*, **2005**, 134, 69
- ⁶⁸ Mukherjee G.N., Sarkar S., *Journal of the Indian Chemical Society*, **1987**, 64, 660
- ⁶⁹ Wang Y., Krull I.S., Liu C., Orr J.D., *Biomedical Chromatography*, **2003**, 17, 149
- ⁷⁰ Feltin N., Pileni M-P., *Langmuir*, **1997**, 13, 3927
- ⁷¹ a) He Q.X., Yang H., Chen Q.Q., Liu S.Q., Huang K.L., *J. Magn. Mater. Devices*, **2003**, 34, 9 ; b) Qin R.H., Jiang W., Liu H.Y., Li F.S., *Mater. Rev.*, **2003**, 17, 66
- ⁷² Wen-Guang Y., Tong-Lai Z., Xiao-Jing Q., Jian-Guo Z., Li Y., *Materials Science and Engineering B*, **2007**, 136, 101
- ⁷³ Mann S., Williams R.J.P., *J. Chem. Soc. Dalton Trans.*, **1983**, 311

- ⁷⁴ Mann S., Kime M.J., Ratcliffe R.G., Williams R.J.P., *J. Chem. Soc. Dalton Trans.*, **1983**, 771
- ⁷⁵ Cushing B.L., Kolesnichenko V.L., O'Connor J., *Chem. Rev.*, **2004**, 104, 3893
- ⁷⁶ Mornet S., *Synthèse et modification chimique de la surface de nanoparticules de maghémite à des fins d'applications biomédicales*, thèse à l'Université Bordeaux 1, **2002**
- ⁷⁷ Herpin A., *Théorie du magnétisme*, 1968, Editions CEA
- ⁷⁸ Lee J., Isobe T., Senna M., *J. Colloid Interface Sci.*, **1996**, 177, 490
- ⁷⁹ Mann S., Hannington J.P., *J. Colloid Interface Sci.*, **1987**, 122, 326
- ⁸⁰ Adair J.H., Li T., Kido T., Havey K., Moon J., Mecholsky J., Morrone A., Talham D.R., Ludwig M.H., Wang L., *Materials Science and Engineering*, **1998**, R23, 139
- ⁸¹ a) Kaiser R., Miskolczy, *J. Appl. Phys.*, **1970**, 41, 1064 ; b) Bacri J-C., Perzynski R., Salin D., Cabuil V., Massart R., *J. Magn. Magn. Mater.*, **1986**, 62, 36
- ⁸² a) Domingo J.C., Mercadal M., Petriz J., De Madariaga M.A., *J. Microencapsulation*, **2001**, 18, 41 ; b) Shinkai M., Suzuki M., Iijima S., Kobayashi T., *Biotechnol. Appl. Biochem.*, **1994**, 21, 125 ; c) Lesieur S., Grabielle-Madelmont C., Paternostre M.T., Ollivon M., *Anal. Biochem.*, **1991**, 192, 334
- ⁸³ a) De Cuyper M., Joniau M., *Eur. Biophys. J.*, **1988**, 15, 311 ; b) Elmi M.M., Sarbolouki M.N., *Int. J. Pharm.*, **2001**, 215, 45
- ⁸⁴ Lesieur S., Grabielle-Madelmont C., Menager C., Cabuil V., Dadhi D., Pierrot P., Edwards K., *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**, 125, 5266
- ⁸⁵ Ponsinet V., *Etude structurale et magnétique des ferrosmections*, **1994**, thèse de l'Université Paris 6
- ⁸⁶ Fabre P., Casagrande C., Veyssie M., Cabuil V., Massart R., *Phys. Rev. Lett.*, **1990**, 64(5), 539
- ⁸⁷ Guinier A., *Ann. Phys.*, **1939**, 12, 161
- ⁸⁸ Berne B.J., Pecora R., *Dynamic Light Scattering*, **1976**, Wiley, New York

⁸⁹ J. Israelachvili, *Intermolecular and Surface Forces*, Second Edition, Harcourt Brace and Company, New York, **1998**

Chapitre 4

Applications

Après avoir étudié l'élaboration d'oignons contenant des nanoparticules inorganiques dans les chapitres 2 et 3, nous allons maintenant nous intéresser à leur caractérisation pour d'éventuelles applications dans les domaines du biomédical et de la catalyse.

Après une introduction sur les concepts de base de l'imagerie par résonance magnétique (IRM), nous étudierons les propriétés des oignons magnétiques en tant qu'agent de contraste via des mesures de relaxivités (vitesses de relaxation des protons environnant) réalisées grâce à un appareil d'IRM médical, développant un champ magnétique de 0,2 T. Puis nous décrirons brièvement le principe de l'hyperthermie, et nous verrons les résultats des premiers tests d'hyperthermie réalisés avec les oignons magnétiques.

Dans le cas des « hybrides » oignon/nanoparticules d'or, nous présenterons les résultats concernant une méthode originale de dépôt des nanoparticules d'or sur support d'oxyde de titane et d'oxyde de vanadium divisés via les oignons, ainsi que les premiers tests catalytiques sur une réaction modèle de combustion du benzène. Cette étude sera également menée sur des hybrides oignons/nanoparticules d'argent.

I- Applications des oignons magnétiques pour l'IRM

A- L'imagerie par résonance magnétique et les agents de contraste

1. La résonance magnétique nucléaire (RMN)^{1,2,3}

L'IRM est une imagerie de la résonance magnétique des protons des molécules d'eau présentes dans l'organisme, ou plutôt une imagerie de leur densité et de leur temps de relaxation. Elle est basée sur le principe de la résonance magnétique nucléaire (RMN) de l'hydrogène.

a)- Phénomène de résonance

Le noyau de l'atome d'hydrogène possède un spin nucléaire (du fait du mouvement de rotation sur lui-même) qui lui confère un moment cinétique J associé à un moment magnétique μ de la manière suivante : $\mu = \gamma.J$, avec γ le rapport gyromagnétique. Le nombre quantique de spin nucléaire, noté I , associé au spin nucléaire, doit être non nul pour que le noyau ait un moment magnétique. Le nombre quantique dépend de la parité de la masse et du numéro atomiques : il est demi-entier si tous les deux sont pairs, et entier si la masse est paire et le numéro atomique impair. Dans le cas de l'hydrogène, $I = 1/2$, le noyau possède donc un moment magnétique.

En l'absence d'un champ magnétique, les moments magnétiques de chaque spin nucléaire (de chaque atome d'hydrogène) sont orientés de façon aléatoire. Lorsqu'un champ magnétique statique B_0 est appliqué, les moments magnétiques s'alignent avec le champ magnétique et il en résulte une aimantation nucléaire macroscopique globale M_0 . Il s'établit alors une interaction entre le moment magnétique du spin nucléaire et le champ, qui lève la dégénérescence des niveaux d'énergie en $(2I+1)$ niveaux équidistants, séparés par une énergie $\Delta E = h.v_0$ avec $v_0 = (\gamma/2\pi).B_0$, fréquence de transition du spin nucléaire (ou précession de Larmor). La fréquence v_0 correspond donc à la **fréquence de résonance du proton** ; elle est proportionnelle à B_0 . ΔE est l'énergie qu'il faut fournir pour permettre aux noyaux de passer de l'état initial à l'état excité. Cette énergie est apportée par un second champ magnétique B_1 . La fréquence de ce champ magnétique alternatif à appliquer pour perturber l'aimantation

dépend du champ statique environnant. Dans la gamme de champ magnétique utilisé, il s'agit d'ondes radiofréquences.

b)- Application d'une impulsion radiofréquence

En présence du champ magnétique principal B_0 (orienté selon z dans la figure 4.1), tous les spins nucléaires sont orientés dans le champ magnétique principal parallèlement au champ B_0 et précessent à leur fréquence propre, la fréquence de Larmor. Il en résulte une aimantation globale M_0 dirigée selon O_z (figure 4.1a). Si l'on applique un champ magnétique alternatif B_1 (champ radiofréquences) perpendiculaire à B_0 et oscillant autour de B_0 à une fréquence qui correspond à la résonance des protons, alors l'aimantation résultante M_0 bascule d'un angle θ vers le plan (xOy) (figure 4.1b).

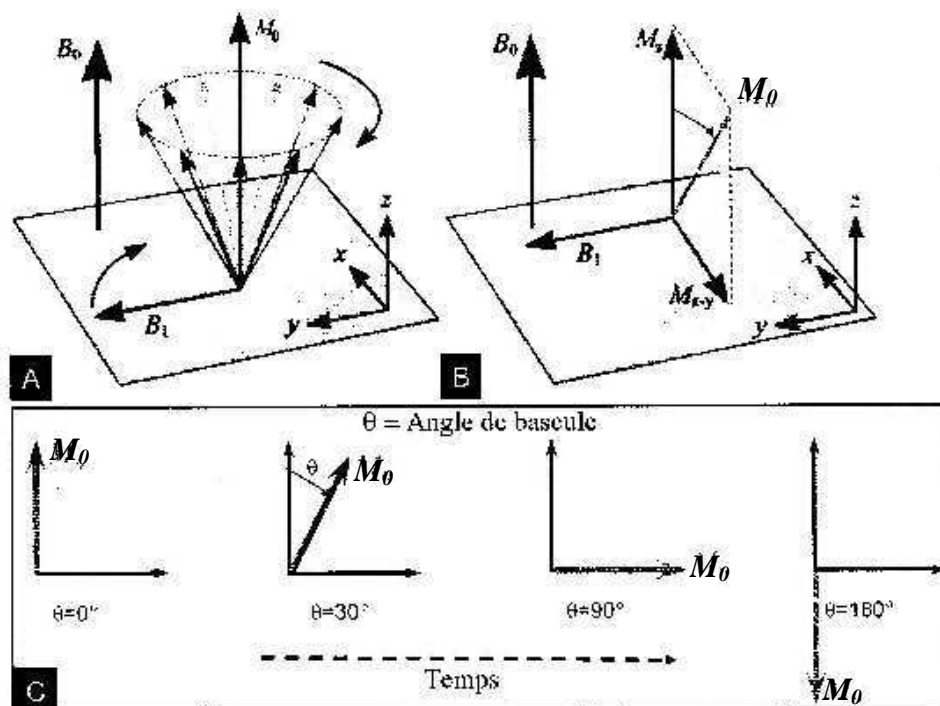


Figure 4.1 : Phénomène de résonance magnétique nucléaire²

Dans le référentiel tournant autour de B_0 à la fréquence de Larmor, l'aimantation M_0 précesse autour de B_1 , à la fréquence angulaire $\omega_1 = \gamma \cdot B_1$. L'angle de basculement θ entre O_z et M_0 peut donc être calculé via la relation : $\theta = \omega_1 \cdot t$, où t est la durée de l'impulsion. C'est donc la durée

de l'impulsion qui détermine la position finale de l'aimantation. En IRM, on parle d'impulsion d'excitation, et elle est caractérisée par l'angle de basculement final de l'aimantation : 30° , 90° , ou 180° sont utilisés en IRM (*figure 4.1c*).

M_0 comporte alors deux composantes (*figure 4.1b*) :

- une composante selon M_z , dite **composante longitudinale**
- une composante dans le plan xy, M_{xy} , dite **composante transversale**

c)- Relaxation

Retour à la position d'équilibre :

A l'arrêt de l'impulsion d'excitation, les spins retournent à leur position d'équilibre et l'aimantation globale retrouve son orientation parallèle au champ statique B_0 : on dit que le système relaxe. Il y a simultanément diminution rapide de la composante transversale M_{xy} et récupération progressive de la composante longitudinale M_z . Ce retour à l'équilibre est connu sous le nom de **précession libre** (free induction decay, FID) et il est à l'origine du signal RMN.

Pour décrire cette relaxation, on considère séparément les composantes transversale et longitudinale. Ces relaxations ont de toute façon des origines différentes : la relaxation longitudinale correspond au retour énergétique du système à un niveau plus bas après l'excitation, alors que la relaxation transverse (ou transversale) est due au déphasage des spins entre eux.

Relaxation longitudinale (T_1) ou relaxation spin-réseau :

Pour retourner à l'équilibre, les noyaux vont échanger leur excès d'énergie à l'environnement à l'environnement (ou réseau). Le temps nécessaire aux noyaux pour retrouver leur position d'équilibre dépend de la vitesse de dissipation de l'énergie en excès par le réseau. Le processus est bien décrit par une loi exponentielle :

$$M_z = M_0 (1 - e^{-t/T_1})$$

Le temps T_1 désigne le temps de relaxation longitudinale. A la fin de la durée T_1 , l'aimantation longitudinale a récupéré environ 63 % de sa valeur d'équilibre.

Cette relaxation dépend en fait de la mobilité des noyaux d'hydrogène engagés dans les molécules. Par exemple, le temps de relaxation T_1 de l'eau pure est de l'ordre de 3 à 4 secondes, tandis que celui de l'eau dans les tissus est de l'ordre de 0,5 s.

Relaxation transverse (T_2) ou relaxation spin-spin :

La diminution de la composante transversale M_{xy} de l'aimantation suit également une loi exponentielle :

$$M_{xy} = M_0 \cdot e^{-t/T_2}$$

Le temps T_2 désigne le temps de relaxation transverse. Pendant une durée T_2 , l'aimantation transversale perd environ 63 % de sa valeur initiale.

La relaxation transverse est due à l'interaction des spins entre eux. Chaque noyau est soumis au champ B_0 , légèrement modifié par les propriétés magnétiques des spins environnants. D'après la relation de Larmor qui dit que la vitesse de précession dépend du champ magnétique local, chaque spin peut alors avoir une vitesse de précession différente : le déphasage entre les spins explique alors la relaxation spin-spin.

Pour un volume d'échantillon étudié de taille macroscopique, il faut prendre en compte dans l'expression du temps de relaxation transverse les hétérogénéités du champ magnétique. Le déphasage est alors aussi dû à ces hétérogénéités et le temps de relaxation transverse réel s'écrit alors $T_2^* : 1/T_2^* = 1/T_2 + \gamma\Delta B$.

2. Le contraste en IRM

a)- Obtention d'une image à partir des signaux RMN

L'image est obtenue en collectant les signaux RMN dans chaque volume élémentaire de l'échantillon, appelé voxel. L'ensemble des signaux est détecté par un système de détection constitué de bobines (ou antennes de réception) placées perpendiculairement au champ B_0 qui sont parcourues par un courant induit par le retour à l'équilibre de l'aimantation protonique. Une transformée de Fourier à deux dimensions est appliquée et permet de restituer les amplitudes des signaux RMN à chacun des points. Une image en échelle de gris correspondant à une coupe de l'échantillon est ainsi reconstruite en fonction de l'intensité du signal de chacun des points.

b)- Contraste naturel

Le contraste naturel dépend des temps de relaxation, de la densité de noyaux d'hydrogène, de la vitesse de flux du liquide circulant, de la viscosité et de la température au sein des tissus. Ce sont principalement **les différences existant entre les temps de relaxation caractéristiques T_1 et T_2 des tissus** qui créent le contraste naturel. L'environnement physico-chimique des protons de l'eau dans le tissu va jouer un rôle primordial (par exemple, pour le sang, $T_1 = 2000\text{ms}$, $T_2 = 500\text{ms}$ à 4.7 T; pour la matière grise, $T_1 = 500\text{ms}$, $T_2 = 100\text{ms}$ à 4.7 T).

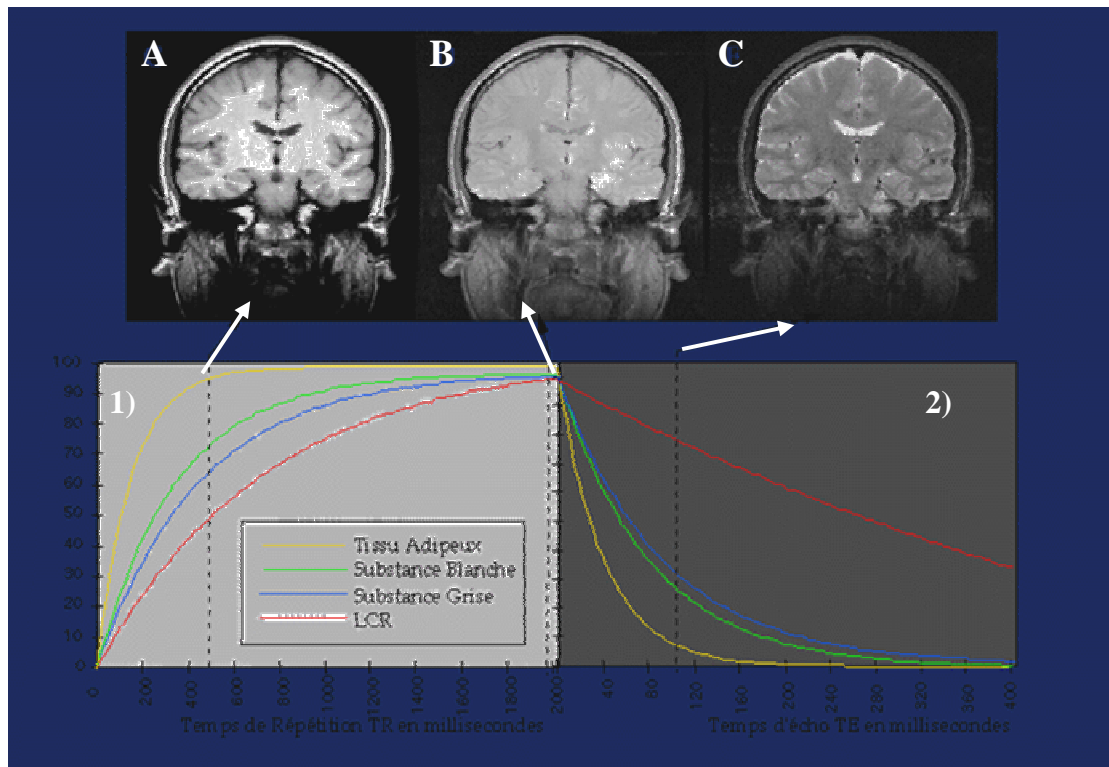


Figure 4.2 : Illustration du contraste naturel existant entre les différents tissus de l'organisme, suivant l'environnement des protons : imagerie d'une tête humaine (1.5 T)

c)- Importance des paramètres de la séquence d'impulsions

En dehors de l'influence de la nature du tissu étudié, le contraste en IRM dépend notamment de l'intensité du champ statique B_0 et **des paramètres des séquences d'acquisition**.

La séquence d'impulsions radiofréquences généralement utilisée est l'écho de spin. Elle est caractérisée par le temps écoulé entre deux séries d'impulsions T_R et par le temps écoulé entre un écho et une mesure T_E . La figure 4.3 montre comment il est possible de rehausser le signal de certains tissus par rapport aux autres en jouant sur les paramètres T_R et T_E .



Les différents contrastes obtenus en écho de spin reposent sur les différences de temps de relaxation longitudinale et transversale. 1) Si les impulsions sont répétées avec un TR court (ici 500 ms), alors l'aimantation sera d'autant plus importante que la remontée est rapide, c'est à dire que le T_1 est court ; le contraste obtenu est celui de l'image (A) où le Liquide Céphalo-Rachidien (LCR) apparaît en hyposignal et la graisse cutanée en hypersignal. Si le TR est long, alors le contraste est à peu près indépendant de T_1 comme sur l'image (B) obtenue avec un TR=2000 ms et un TE=25 ms. 2) Après une impulsion de 90° , l'aimantation qui était longitudinale est devenue transversale et c'est la décroissance en T_2 qui va influencer sur le contraste. Avec un temps d'écho relativement long, les tissus à T_2 long comme le LCR, apparaissent les plus intenses comme sur l'image (C) obtenue avec un TR=2000 ms et TE=100 ms.

Figure 4.3 : Importance des paramètres T_R et T_E

3. Les agents de contraste^{1,3}

Les agents de contraste permettent d'accentuer le contraste du tissu dans lequel ils sont localisés en modifiant localement les T_1 et T_2 des protons. C'est donc leur effet sur les temps de relaxation des protons de l'eau située dans le tissu que l'IRM permet de visualiser.

Un agent de contraste est caractérisé par son effet sur les vitesses de relaxation (ou relaxivités) des protons de l'eau. Elles s'expriment par : $R_{1(\text{ou } 2)} = 1/T_{1(\text{ou } 2)}$. En présence d'un agent de contraste, la relaxivité augmente (le temps de relaxation diminue). Elle résulte alors de la

vitesse de relaxation propre du tissu (vitesse intrinsèque) et de la contribution de l'agent de contraste :

$$1/T_{\text{observé}} = 1/T_{\text{intrinsèque}} + 1/T_{\text{agent de contraste}}$$

La vitesse de relaxation dépend linéairement de la concentration en agent de contraste dans le tissu. Il est donc possible de la déterminer en traçant $1/T_{1(\text{ou } 2)}$ en fonction de la concentration : la pente de la droite nous donne $r_{1(\text{ou } 2)}$.

Suivant les modifications qu'ils exercent sur les temps de relaxation, les agents de contraste sont divisés en deux catégories :

- les agents de type T_1 diminuent le T_1 et donnent un contraste positif
- les agents de type T_2 diminuent le T_2 et donnent un contraste négatif

a)- Les agents de contraste T_1

Cette catégorie regroupe tous les agents **paramagnétiques**.

Les relaxivités longitudinale et transverse de ces agents sont du même ordre de grandeur : le rapport r_2/r_1 est donc proche de 1. Seulement, comme les T_1 des tissus sont environ 10 fois plus élevés que leur T_2 , la présence des agents paramagnétiques diminue le T_1 des tissus, ce qui revient à augmenter l'intensité du signal (hypersignal, zones en surbrillance), d'où leur nom d'agents de **contraste positif**. Ce type de contraste est en général préféré par les radiologues car il est plus facilement détectable sans ambiguïté.

Les éléments paramagnétiques comportent sur leur couche électronique externe des électrons non appariés, ce qui leur confère un moment magnétique dipolaire non nul. On peut citer les molécules de dioxygène, les radicaux libres, ou certains ions métalliques (Fe^{3+} , Mg^{2+} , Co^{2+} , Mn^{2+} , Cu^{2+} , Gd^{3+} ...). La modification des vitesses de relaxation transverse et longitudinale est due à des interactions dipolaires entre le moment magnétique nucléaire de chaque proton et le moment magnétique électronique du composé paramagnétique. Ces interactions dépendent essentiellement de **la concentration en produit** et de **l'accessibilité des molécules d'eau** au produit. Il existe dans l'organisme des agents paramagnétiques naturels. L'hémoglobine par exemple est utilisée pour cartographier certaines fonctions spécifiques du cerveau⁴.

L'utilisation de cations d'éléments du groupe des lanthanides (Gd^{3+} , La^{3+} , ...) comme agents de contraste paramagnétiques s'est imposée du fait du grand nombre d'électrons non appariés présents sur leur couche externe, ce qui leur confère un moment magnétique plus élevé et donc une plus grande efficacité sur le signal. Utilisés sous forme de sels minéraux, ils sont toxiques pour l'homme car ils se condensent au pH physiologique formant des hydroxydes insolubles, difficilement éliminés par l'organisme. De plus, l'ion Gd^{3+} libre est lui-même toxique (risque de blocage du système réticulo-endothélial, échanges avec des ions calcium endogènes).

Afin de remédier à ce problème, des **chélates de gadolinium** ont été mis au point. Des amines couronne comme l'acide diéthylènetriaminepentaacétique (DTPA) ou l'acide tétraazacyclododecanetétraacétique (DOTA) sont utilisés pour complexer l'ion Gd^{3+} (*figure 4.4*).

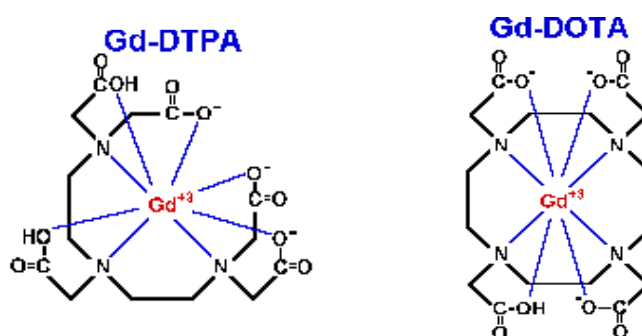


Figure 4.4 : Structure des complexes du gadolinium

Les constantes d'affinité de ces complexes sont élevées de sorte que le risque de dissociation, et donc de circulation du cation libre dans l'organisme, est faible. Les procédés impliqués dans l'augmentation de la vitesse de relaxation longitudinale globale du tissu sont multiples. Ils dépendent notamment du temps de résidence des molécules d'eau dans la sphère interne de coordination du complexe, et des temps d'échange de ces molécules avec celles de la solution. Plus ces échanges sont rapides, plus la propagation de l'effet de relaxation est efficace. Les développements actuels concernant ces complexes visent donc à optimiser leur structure moléculaire en les conjuguant à des macromolécules hydrophiles comme le dextrane, l'albumine ou des polylysines⁵, afin d'augmenter le nombre de molécules d'eau en interaction avec l'ion Gd^{3+} . Ces macromolécules permettent d'allonger le temps de demi-vie plasmatique

du complexe (70-100min). Les agents macromoléculaires peuvent ainsi être utilisés pour **l'imagerie des vaisseaux sanguins (angiographie)**⁶. De plus, leur encapsulation au sein de liposomes permet de les rendre spécifiques pour **l'imagerie du foie** et de les concentrer dans la zone visée. Il a été montré que les relaxivités d'un tel agent de contraste paramagnétique particulière dépendent alors aussi des propriétés physico-chimiques de la membrane lipidique^{7,8}. L'effet T_1 de ces liposomes peut également être amélioré par une fonctionnalisation par une macromolécule⁹.

b)- Les agents de contraste T_2

Les agents **superparamagnétiques** constituent de bons agents de contraste T_2 .

La relaxivité transverse des agents superparamagnétiques est bien plus élevée que leur relaxivité longitudinale : le rapport r_2/r_1 est bien supérieur à 2. L'augmentation de r_2 conduit à l'effondrement du signal (hyposignal, zones foncées) pour des séquences pondérées en T_2 , d'où leur nom d'agents de contraste négatifs. Plus la différence entre r_2 et r_1 sera grande (rapport r_2/r_1 élevé), meilleure sera l'efficacité de l'agent de contraste T_2 . Notons qu'il est parfois possible d'obtenir un hypersignal pour des séquences pondérées en T_1 .

Les nanoparticules magnétiques de taille suffisamment petite pour constituer des monodomaines magnétiques exhibent un comportement superparamagnétique à température ambiante. Les **nanoparticules d'oxyde de fer** notamment sont ainsi très utilisées comme agents de contraste superparamagnétiques. Du fait de leur susceptibilité magnétique très élevée, ces particules créent localement une grande hétérogénéité de champ à travers les molécules d'eau qui diffusent. Cette hétérogénéité de champ local a pour effet d'accélérer le déphasage des spins nucléaires de l'hydrogène et donc de diminuer le temps de relaxation transverse T_2 . Chaque particule se comporte donc comme un petit aimant 1000 à 10 000 fois plus magnétique qu'un composé paramagnétique. Leur action n'est pas limitée aux protons des molécules d'eau avec lesquelles elles sont en contact direct : elle se fait sur de plus longues distances. D'autre part, cet effet est accentué par l'agrégation des nanoparticules lors de leur internalisation au sein des endosomes¹⁰ ou lors de leur encapsulation dans des liposomes¹¹ ou dans des micelles de polymères¹². De plus, les particules superparamagnétiques sont efficaces à des concentrations plus faibles que les agents paramagnétiques.

B- Systèmes colloïdaux magnétiques et IRM : état de l'art

Deux catégories de nanoparticules superparamagnétiques sont actuellement commercialisées et utilisées comme agents de contraste T₂. On les distingue principalement par leur taille : les SPIO (superparamagnetic particles iron oxide) de taille comprise entre 30 et 100nm¹³, et les USPIO (ultrasmall SPIO) ou MION (monocristalline iron oxide nanocompound) de taille comprise entre 10 et 20nm¹⁴. Afin d'allonger le temps de demi-vie plasmatique de ces particules, elles sont enrobées d'une couche de dextrane. Les SPIO ont ainsi un temps de demi-vie plasmatique de 20 à 40 min, et les USPIO, de plus de 180 min¹⁵.

Les SPIO et les USPIO finissent par être phagocytés par les macrophages et sont donc principalement utilisés pour l'imagerie du foie : détection de tumeurs hépatiques ou de certaines pathologies comme les cirrhoses du foie. Les nanoparticules concentrées dans les cellules macrophagiques du foie provoquent l'effondrement de l'intensité du signal au sein de cet organe. La lésion ne contenant pas de nanoparticules apparaît en « surbrillance » par rapport au reste du foie. Parmi les USPIO, les particules de plus petite taille peuvent migrer à travers l'interstitium et diffuser vers les ganglions lymphatiques, ce qui en fait des agents de contraste en lymphographie¹⁶.

Les développements actuels visent à élaborer des produits plus spécifiques, ciblant et multifonctionnels.

Des agents de contraste immunospécifiques ont été développés. Ce sont par exemple des nanoparticules de magnétite enrobées de PEG sur lesquelles sont greffés des anticorps monoclonaux G-22 reconnus par des cellules de tumeurs du cerveau (gliomes). 48h après l'injection de ces particules, 50% de l'intensité du signal en T₂ diminue (hyposignal) au niveau des tumeurs¹⁷. Des SPIO couplés à des anticorps monoclonaux mAb-610 ont permis de cibler des cellules cancéreuses (HT-29, lignée du cancer du colon chez l'Homme) chez la souris. Seulement un à deux anticorps par particule ont suffi pour que le ciblage soit effectif : un effondrement de 42% du signal a été constaté au niveau de la tumeur, alors qu'une baisse de seulement 3% a été mesurée au niveau du foie¹⁸.

Le marquage de cellules du système immunitaire, comme les lymphocytes, par les nanoparticules magnétiques a permis de réaliser l'imagerie spécifique de lésions comme les

tumeurs cancéreuses. En effet, les lymphocytes ont la particularité de se concentrer autour des lésions. Les premiers travaux réalisés par Chan *et coll.* ont démontré la possibilité d'induire un contraste IRM autour d'un abcès, après injection intraveineuse de cellules macrophagiques migratrices marquées par des ferrosomes¹⁹. Plus récemment, Smirnov *et coll.*²⁰ ont injecté à des souris portant une tumeur des lymphocytes ciblant spécifiquement les antigènes ovalbumine (surexprimés à la surface des cellules cancéreuses) et marqués par des nanoparticules de maghémite. Le suivi des lymphocytes marqués par IRM à 7 T a montré que 24h après l'injection, un effondrement du signal est observé dans la rate. 72h après l'injection, l'hyposignal est observé dans la tumeur, uniquement. Les lymphocytes ont donc été redistribués de la rate vers la tumeur.

Le marquage de cellules souches est également possible. Les cellules souches ont la capacité de se différencier pour former n'importe quel type de cellules. Leur potentiel thérapeutique pour remplacer les populations de cellules endogènes défectueuses représente une avancée considérable. Des magnétodendrimères ont été internalisés au sein de cellules souches neurales dans des rats mutants, présentant un gène défectueux codant pour la protéine de base de la myéline (gaine lipidique participant à la conduction des messages nerveux)²¹. La migration de ces cellules vers le cerveau a pu être observée par IRM à 1.5 T, et la formation de myéline par ces cellules transplantées a pu être prouvée par un marquage immun. Le marquage par les nanoparticules magnétiques transfectées via l'encapsulation au sein de dendrimères n'a donc pas altéré les fonctions des cellules souches neurales.

L'encapsulation des nanoparticules magnétiques au sein d'édifices comme les liposomes ou les micelles de polymères n'est pas sans effet sur les relaxivités de tels agents de contraste. En effet, le confinement des nanoparticules au sein de ces « vésicules » conduit à une forte augmentation de la relaxivité transverse du composé vésicule-nanoparticules magnétiques par rapport à celle du ferrofluide non encapsulé. Ce phénomène a été observé pour des nanoparticules de maghémite citratées encapsulées au sein de liposomes¹¹ ou pour des nanoparticules de maghémite anioniques (6nm) emprisonnées dans le coeur hydrophile de micelles de polyélectrolytes¹². Ai *et coll.* ont montré qu'ils obtiennent une meilleure limite de détection pour l'IRM à 1.5 T en encapsulant des SPIO au sein du coeur hydrophobe de micelles de polymères amphiphiles²².

L'encapsulation des nanoparticules améliore donc la sensibilité de l'agent de contraste. Seulement un agrégat de particules peut se comporter comme une grosse particule

magnétique : la susceptibilité très élevée d'un tel agrégat entraîne une perte de résolution de l'image. Un compromis est donc à trouver entre sensibilité et résolution.

C- Les oignons magnétiques comme agent de contraste

Ce travail s'est fait en collaboration avec Gérard Raffard, Philippe Massot et Jean-Michel Franconi au sein du Centre de Résonance Magnétique des Systèmes Biologiques (RMSB, Bordeaux).

1. Nanoparticules magnétiques incorporées par encapsulation d'un ferrofluide

Dans le but d'utiliser les hybrides oignon/particules magnétiques comme agent de contraste, il est nécessaire de connaître leur effet sur les temps de relaxation des protons de l'eau T_1 et T_2 . L'influence du confinement du ferrofluide au sein de l'oignon ainsi que celle de l'agrégation des nanoparticules magnétiques va être étudiée.

Les mesures des temps de relaxation des protons ont été réalisées grâce à un appareil d'IRM médical corps entier (Siemens Magnetom Open Viva), développant un champ magnétique de 0,2 T. Elles ont été évaluées avec une antenne « tête ». Les séquences suivantes ont été utilisées :

-pour T_1 : séquence d'inversion avec lecture de la récupération par imagerie multi écho de gradient (TOMROP, T One by Multiple Read Out Pulses)

-pour T_2 : séquence multi écho de spin (CPMG, Carr-Purcell-Meiboom-Gill)

a)- Ferrofluide seul

Tout d'abord, nous avons mesuré les relaxivités transverse et longitudinale du ferrofluide. Pour cela, les temps de relaxation T_1 et T_2 de différentes dilutions du ferrofluide ont été mesurés, après perturbation de l'alignement des protons de l'eau dans un champ magnétique

de 0,2 T. L'inverse des temps de relaxation a ensuite été tracé en fonction de la concentration en fer des solutions de ferrofluide diluées²³. La figure 4.5 présente les droites pour le ferrofluide.

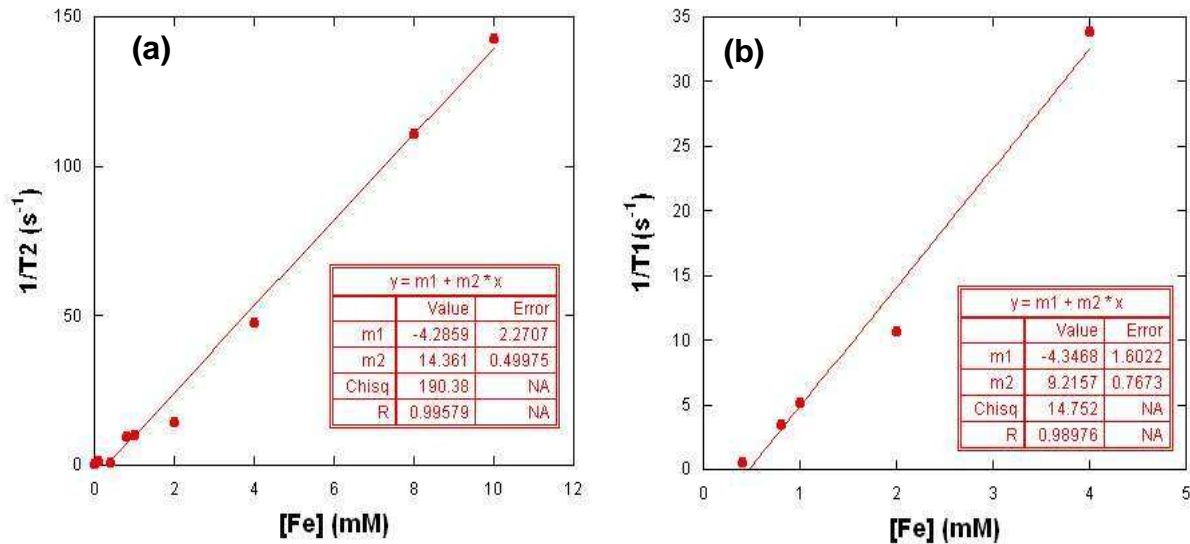


Figure 4.5 : Relaxivités (a) transverse et (b) longitudinale du ferrofluide

Les pentes des droites nous donnent les relaxivités : $r_2 = 14,4 \pm 0,5 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ et $r_1 = 9,2 \pm 0,8 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$. Nous pouvons en déduire le rapport $r_2/r_1 = 1,6 \pm 0,1$. Il est connu que si ce rapport est inférieur ou égal à 2, alors le composé analysé peut être considéré comme un agent de contraste T_1 , ce qui est le cas avec le ferrofluide utilisé ici. Habituellement les nanoparticules superparamagnétiques sont employées comme des agents de contraste T_2 , mais la très petite taille des nanoparticules considérées ici leur confère des propriétés d'agent de contraste T_1 .

b)- Oignons et ferrofluide

Deux lots d'échantillons ont été analysés :

- oignons + ferrofluide **avant** élimination des particules non encapsulées
- oignons + ferrofluide **après** élimination des particules non encapsulées

Pour chaque lot, nous avons préparé plusieurs séries de dispersions afin de connaître l'influence de l'encapsulation du ferrofluide au sein des oignons sur les relaxivités. Une série est constituée de 5 dispersions de concentration en oignons différente, mais pour lesquelles la concentration en fer introduite (c'est-à-dire la concentration en fer de la solution de

ferrofluide utilisée pour former la phase lamellaire) est identique. D'une série à l'autre la concentration en fer introduite varie.

Pour plus de clarté les différentes séries d'échantillons sont présentées dans le tableau 4.1.

Avant séparation			Après séparation			
Série	[Fe] _{introduite} (mM)	Concentration en oignons (mg/mL)	Série	[Fe] _{introduite} (mM)	[Fe] _{encapsulée} (mM)	Concentration en oignons (mg/mL)
1	5.0	20 ; 30 ; 35 ; 40 ; 50	9	10.8	5.1	2 ; 3 ; 3.5 ; 4
2	10.8	20 ; 30 ; 35 ; 40 ; 50	10	19.7	10.4	2 ; 3 ; 3.5 ; 4
3	15.0	20 ; 30 ; 35 ; 40 ; 50	11	39.4	27.2	2 ; 3 ; 3.5 ; 4
4	19.7	20 ; 30 ; 35 ; 40 ; 50	12	58.7	27.0	2 ; 3 ; 3.5 ; 4
5	39.4	20 ; 30 ; 35 ; 40 ; 50	13	75.0	24.0	2 ; 3 ; 3.5 ; 4
6	58.7	20 ; 30 ; 35 ; 40 ; 50				
7	75.0	20 ; 30 ; 35 ; 40 ; 50				
8	125.0	20 ; 30 ; 35 ; 40 ; 50				

Tableau 4.1 : Les différentes séries d'échantillons testés

Les relaxivités des échantillons « avant séparation » ont été déterminées en traçant $1/T_2$ et $1/T_1$ en fonction de la concentration en fer dans la dispersion, calculée à partir de $[Fe]_{introduite}$ et de la concentration en oignons dans la dispersion. Pour déterminer les relaxivités des échantillons « après séparation », il faut tenir compte des taux d'encapsulation déterminés par magnétométrie. $1/T_2$ et $1/T_1$ sont donc tracées en fonction de la concentration en fer dans la dispersion, calculée à partir de $[Fe]_{encapsulée}$ et de la concentration en oignons dans la dispersion.

Les tableaux 4.2a et 4.2b récapitulent les résultats pour tous les échantillons testés.

(a)

[Fe] _{introduite} (mM)	Avant séparation	
	r_2 (mM ⁻¹ s ⁻¹)	r_1 (mM ⁻¹ s ⁻¹)
ferrofluide	14.4 ± 0.5	9.2 ± 0.8
5.0	13 ± 2	0.7 ± 0.1
10.8	25 ± 2	1.8 ± 0.1
15.0	37 ± 3	1.3 ± 0.1
19.7	40 ± 9	0.6 ± 0.1
39.4	51 ± 4	0.5 ± 0.1
58.7	31 ± 4	1.2 ± 0.1
75.0	55 ± 10	1.7 ± 0.5
125.0	69 ± 10	0.9 ± 0.1

(b)

[Fe] _{encapsulée} (mM)	Après séparation	
	r_2 (mM ⁻¹ s ⁻¹)	r_1 (mM ⁻¹ s ⁻¹)
ferrofluide	14.4 ± 0.5	9.2 ± 0.8
5.1	1.8 ± 0.8	0.2 ± 0.1
10.4	12 ± 5	0.5 ± 0.3
24.0	5.8 ± 0.4	2 ± 1
27.0	34 ± 3	1.9 ± 0.2
27.2	29 ± 2	1.7 ± 0.1

Tableau 4.2 : Valeurs des relaxivités transverse et longitudinale pour les différentes séries d'échantillons (a) avant séparation, (b) après séparation, mesurées dans un champ magnétique appliqué de 0.2 T

Il faut préciser que les valeurs des relaxivités « avant séparation » traduisent les procédés de relaxation des protons de l'eau au contact des nanoparticules de maghémite **encapsulées** dans les oignons, et **non encapsulées**.

L'évolution de r_1 (avant ou après séparation) avec la concentration en fer introduite est peu significative. Nous pouvons considérer qu'elle est peu modifiée par $[\text{Fe}]_{\text{introduite}}$, sa moyenne étant de **1,1 mM⁻¹s⁻¹**. Pour le ferrofluide non encapsulé, r_1 est de l'ordre de **9 mM⁻¹s⁻¹**. L'encapsulation du ferrofluide au sein des oignons entraîne donc une diminution de la relaxivité longitudinale.

La valeur de la relaxivité transverse r_2 , que ce soit avant ou après séparation, est au moins égale ou supérieure à celle obtenue pour le ferrofluide non encapsulé. L'encapsulation du ferrofluide au sein des oignons aurait donc tendance à faire augmenter la valeur de r_2 .

Martina *et coll.*¹¹ ont étudié l'encapsulation d'un ferrofluide constitué de nanoparticules de maghémite au sein de liposomes. Ils ont observé que plus la concentration en particules au sein des liposomes est importante, plus la valeur de r_2 est élevée. La relaxivité transverse dépend donc de la concentration locale en particules, et celle-ci est maintenue à un niveau élevé grâce à l'encapsulation au sein des liposomes.

L'effet de la concentration locale en particules, c'est-à-dire de $[\text{Fe}]_{\text{encapsulée}}$ dans les oignons, est étudié sur la figure 4.6. Les relaxivités mesurées ont été portées en fonction de la concentration en fer introduite pour les séries d'échantillons « avant séparation », et en fonction de la concentration en fer encapsulée pour les séries « après séparation ».

Avant séparation, nous constatons que r_2 augmente avec la concentration en fer introduite, mais pas de façon linéaire. Nous ne sommes pas en mesure d'expliquer la variation obtenue mais nous pouvons penser qu'elle traduit la contribution des particules non encapsulées.

Après séparation, nous constatons que r_2 augmente de façon linéaire avec la concentration en particules au sein des oignons (**figure 4.6b**). En ce qui concerne le rapport r_2/r_1 permettant d'évaluer d'un point de vue physique l'efficacité de l'agent de contraste, il passe de **1.6** pour le ferrofluide seul, à **17** pour les oignons contenant $[\text{Fe}]_{\text{encapsulée}} = 27.2 \text{ mM}$.

L'encapsulation au sein des oignons améliore donc les propriétés d'agent de contraste T_2 du ferrofluide.

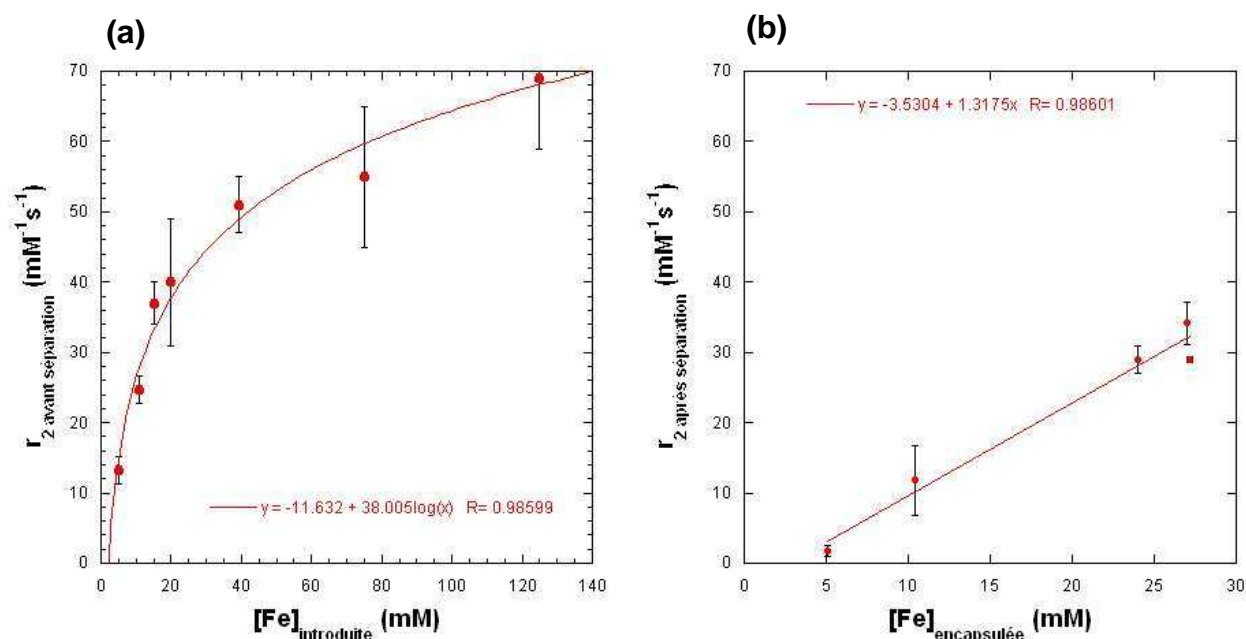


Figure 4.6 : Evolution des relaxivités transverses mesurées dans un champ magnétique appliqué de 0.2 T : (a) avant séparation, en fonction de la concentration en fer introduite et (b) après séparation, en fonction de la concentration en fer encapsulée

c)- Discussion

Le gain obtenu sur les propriétés d'agent de contraste T_2 du ferrofluide grâce à l'encapsulation provient principalement de l'effet de « clustering » ou « d'agrégation » des nanoparticules magnétiques au sein des oignons. La relaxation transverse est de type « spin-spin » : elle est fonction du déphasage existant entre les spins sous l'effet du champ magnétique statique et du champ local créé par la susceptibilité élevée des nanoparticules. La relaxivité transverse dépend donc de la quantité locale de particules. Nous voyons dans notre cas que r_2 augmente linéairement avec la concentration en particules encapsulées (**figure 4.6b**). Or nous avons montré que la taille des agrégats de particules encapsulés évolue avec cette concentration (chapitre 3, partie 2-II). Dans le tableau 4.3, nous avons récapitulé les valeurs de r_2 en fonction du diamètre des agrégats encapsulés calculé dans le chapitre 3, pour les $[\text{Fe}]_{\text{introduite}}$ pour lesquelles ces deux valeurs ont été déterminées. Des observations de cryoMET et des mesures de r_2 après séparation pour d'autres $[\text{Fe}]_{\text{introduite}}$ auraient été nécessaires afin de compléter cette étude. Il semble tout de même que la relaxivité transverse r_2 dépende

linéairement de la taille des agrégats encapsulés entre les bicouches des oignons (*figure 4.7*, pour indication).

$[\text{Fe}]_{\text{introduite}} \text{ (mM)}$	$[\text{Fe}]_{\text{encapsulée}} \text{ (mM)}$	diamètre (nm)	r_2 après séparation ($\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$)
19.7	10.4	8.5	12
39.4	27.2	11	29
58.7	27.0	12.5	34

Tableau 4.3 : Relaxivité transverse en fonction du diamètre des agrégats encapsulés (déterminé à partir des images de cryoMET) pour $[\text{Fe}]_{\text{introduite}} = 19.7, 39.4, 58.7 \text{ mM}$

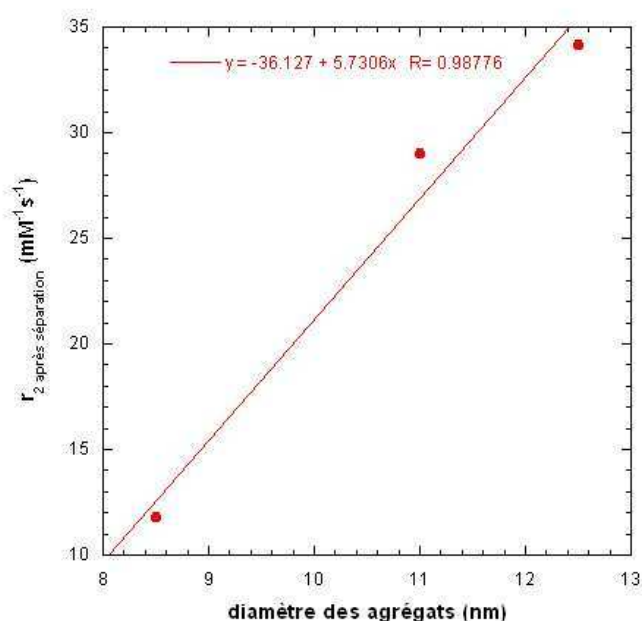


Figure 4.7 : Relaxivité transverse en fonction du diamètre des agrégats encapsulés (déterminé à partir des images de cryoMET) pour $[\text{Fe}]_{\text{introduite}} = 19.7, 39.4, 58.7 \text{ mM}$

Plusieurs travaux ont été réalisés concernant l'effet de l'agrégation des nanoparticules magnétiques sur les relaxivités des protons. Pour des nanoparticules magnétiques encapsulées au sein de micelles de polymères, il a été montré que plus les agrégats sont de taille importante, plus la relaxivité transverse augmente^{12,22}. Les mêmes observations ont été faites lorsque l'agrégation des nanoparticules magnétiques est causée par une augmentation de la

force ionique²⁴ ou par rassemblement de brins complémentaires d'oligonucléotides greffés en surface des nanoparticules²⁵.

L'efficacité d'un agent de contraste T_1 nécessite surtout que celui-ci soit en contact direct avec l'eau. L'accessibilité de l'eau aux nanoparticules magnétiques gouverne donc la relaxivité longitudinale. La diffusion de l'eau du milieu dispersant vers l'intérieur des oignons est ralentie par la présence des bicouches lipidiques. Ceci explique la diminution de la valeur de r_1 entre ferrofluide seul et ferrofluide encapsulé. L'encapsulation du ferrofluide diminue donc l'efficacité des nanoparticules magnétiques comme agent de contraste T_1 . La même observation est faite pour un ferrofluide encapsulé dans des liposomes¹¹.

Une différence de comportement de la relaxivité longitudinale entre liposomes et oignons apparaît pourtant : pour les liposomes, r_1 diminue quand la concentration locale en particules augmente, alors qu'elle reste constante dans le cas des oignons. La valeur de r_1 dépend principalement des interactions particules-eau. Or ces interactions n'augmentent pas avec la concentration en fer dans le cas des oignons. Nous avons vu en effet qu'augmenter $[\text{Fe}]_{\text{introduite}}$ revient à augmenter la taille des agrégats de particules encapsulés. Ce phénomène n'est pas susceptible d'améliorer sensiblement les interactions particules-eau puisque :

- il ne favorise pas les échanges de molécules d'eau entre milieu extérieur et intérieur de l'oignon,

- la « surface » de contact entre particules et eau n'est pas drastiquement augmentée.

En conclusion, l'encapsulation des nanoparticules de maghémite au sein des oignons améliore leurs propriétés d'agent de contraste T_2 , puisque le rapport r_2/r_1 passe de 1.6 pour le ferrofluide à 17 au maximum pour les particules encapsulées au sein des oignons (valeur « après séparation »). La figure 4.8 présente une comparaison des r_2/r_1 de deux agents de contraste déjà commercialisés (SPIO²⁶-Endorem- et USPIO²⁷-Sinerem- recouverts de dextrane), des liposomes¹¹ et des oignons magnétiques.

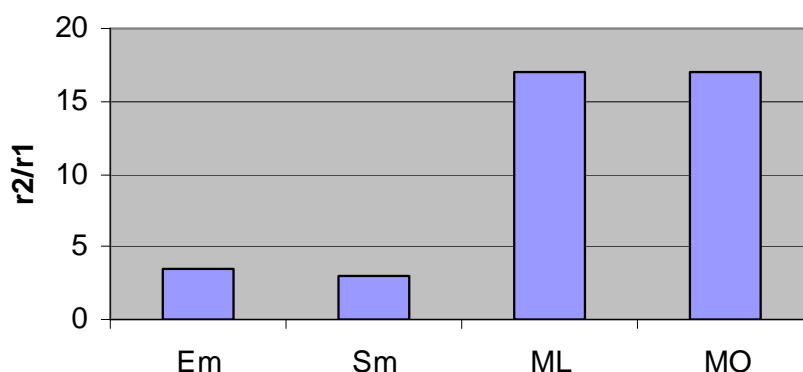


Figure 4.8 : Comparaison des r_2/r_1 de différents agents de contraste
à 0.47 T : Em : Endorem²⁶, Sm : Sinerem²⁷, ML : liposomes magnétiques¹¹,
à 0.2 T : MO : oignons magnétiques

Le comportement des oignons magnétiques comme agents de contraste est donc similaire à celui des liposomes. Il faut toutefois noter que les mesures de relaxivité ont été réalisées à 0.2T pour les oignons magnétiques, alors qu'elles ont été faites à 0.47 T pour les autres composés^{26,27,11}. Or il est connu que la relaxivité transverse augmente avec le champ magnétique statique : l'efficacité des oignons à 0.47 T devrait donc être améliorée et supérieure à celle des liposomes magnétiques.

Du point de vue des mesures physiques, les oignons magnétiques semblent donc être de meilleurs agents de contraste T_2 que ceux rapportés dans la figure 4.8, bien que leur charge en fer (déterminée dans le chapitre 3) soit environ 10 fois moins élevée que celle des liposomes magnétiques. Il faut sans doute voir ici **un effet du confinement des agrégats entre les bicouches** qui favorise les interactions des spins entre eux et augmente la vitesse de relaxation selon le mode « spin-spin ».

2. Nanoparticules magnétiques incorporées par synthèse *in situ*

Les propriétés physico-chimiques des nanoparticules synthétisées *in situ* ont été caractérisées dans le chapitre 3, partie 2-I. Elles mesurent entre 4 et 5 nm de diamètre et sont constituées d'un mélange de plusieurs phases cristallines. Leur cristallinité et leurs propriétés magnétiques sont faibles.

Les temps de relaxation ont été mesurés à 0.2 T pour différentes dilutions des dispersions d'oignons de l'échantillon « $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+} = 1$; $[\text{Fe}] = 0.1\text{M}$; $\text{pH}=10$ à 4°C , $J=6$ », contenant des nanoparticules de 3 nm de diamètre en moyenne. L'inverse des temps de relaxation a ensuite été tracé en fonction de la concentration en fer totale dans la dilution ($[\text{Fe}]_{\text{dispersion}}$), calculée à partir de $[\text{Fe}]$ totale introduite dans la dispersion-mère ($[\text{Fe}]=0.1\text{M}$). La figure 4.9 présente les droites obtenues.

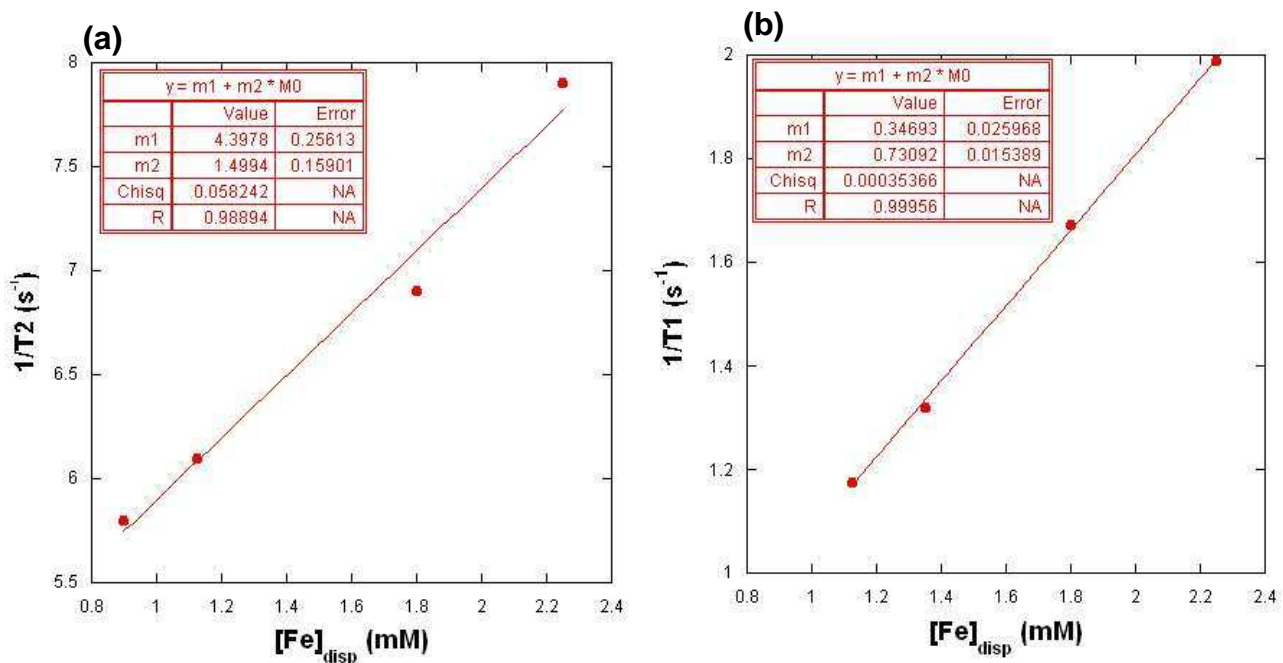


Figure 4.9 : Relaxivités (a) transverse, (b) longitudinale des oignons contenant des particules de 3nm de diamètre

Si l'on calcule le rapport des relaxivités transverse et longitudinale, on trouve : $r_2/r_1 = 2,1 \pm 0,1$. Cette valeur est de l'ordre de 2, nous pouvons donc considérer que les oignons peuvent se comporter comme des agents de contraste T_1 . Leur comportement est complètement différent de celui des oignons au sein desquels a été encapsulé un ferrofluide. Les oignons « blancs » (sans particule) présentant déjà le comportement d'agent T_1 ($r_2/r_1 = 1,3$), nous pouvons considérer que l'effet des nanoparticules synthétisées *in situ* sur les temps de relaxation des protons de l'eau est négligeable. Ceci peut être imputé aux faibles propriétés magnétiques de ces particules. De plus, le rendement de la réaction de synthèse n'étant pas déterminé, nous ne

connaissons pas la quantité d'ions Fe^{3+} restant en solution. Or cet ion étant paramagnétique, il est susceptible de participer à ce comportement d'agent T_1 .

II- Applications des oignons magnétiques pour l'hyperthermie magnétique

A- Principe de l'hyperthermie²⁸

L'hyperthermie est une voie thérapeutique explorée depuis une quarantaine d'années dans le cadre des thérapies anti-cancéreuses. Elle consiste à provoquer localement une élévation de température dans le tissu malade (de 41 à plus de 46°C).

L'échauffement peut se faire :

- par contact avec un liquide chaud externe (eau)
- par ultrasons, micro-ondes, radiofréquences ou infrarouges, pas de nécessité de contact direct avec la source
- par insertion de la source d'échauffement dans la zone à traiter (micro-antennes, sondes, médiateurs)

Des appareils focalisant des ultrasons ou des radiations électromagnétiques sur les tissus à traiter sont commercialisés. Ils permettent seulement de traiter des tumeurs superficielles, le traitement de tumeurs plus profondes nécessitant l'apport d'une énergie trop élevée pour ne pas détruire les tissus sains. L'insertion d'un « médiateur », capable de convertir en chaleur une énergie reçue à distance, apparaît donc comme une technique particulièrement appropriée pour le traitement de tumeurs profondes.

Parmi les médiateurs les plus prometteurs, on trouve les nanoparticules magnétiques qui sont connues pour s'échauffer en présence d'un champ alternatif magnétique. Leur puissance d'absorption spécifique (specific absorption rate, SAR) dépend à la fois de leurs caractéristiques (distribution en taille et propriétés magnétiques) et de leur environnement (viscosité du milieu, amplitude et fréquence du champ appliqué).

Les particules dont le diamètre est généralement supérieur à 15-20 nm comportent plusieurs domaines magnétiques (multidomaines) et sont ferri- ou ferromagnétiques. Leur échauffement

est alors dû à des pertes par hystérèse et la SAR est proportionnelle à la fréquence et à l'aire du cycle parcouru. Les particules plus petites sont monodomaines et présentent un comportement superparamagnétique. Elles ne présentent pas de cycle d'hystérèse et ne peuvent par conséquent pas s'échauffer via le mécanisme précédent : l'énergie absorbée est alors dissipée par un mécanisme de relaxation de Néel. Les moments magnétiques au sein du domaine magnétique s'alignent dans le champ magnétique alternatif appliqué et relaxent selon un temps caractéristique appelé temps de relaxation de Néel, qui dépend de la constante d'anisotropie magnétocristalline.

Qu'elles soient multidomaines ou monodomaines, les particules magnétiques peuvent également dissiper l'énergie absorbée selon un mécanisme de relaxation de Brown. Dans ce cas, ce ne sont pas les moments magnétiques qui subissent une rotation à l'intérieur du cristal, mais c'est la particule entière qui, sous réserve que la viscosité du milieu environnant soit suffisamment faible, fait le choix de tourner sur elle-même. L'échauffement est alors provoqué par la friction avec le milieu environnant. Ce phénomène est donc très sensible aux espèces moléculaires présentes en surface (enrobage des particules par une couche de dextrane par exemple)²⁹.

Sous réserve d'employer des champs de fréquence adaptée, les nanoparticules superparamagnétiques présentent en général une puissance d'absorption spécifique supérieure à celle des particules ferrimagnétiques^{30,31}.

Les recherches cliniques en matière d'hyperthermie ont exploré deux voies :

- la thermoablation : l'élévation de température dépasse les 46°C et elle a pour but de provoquer une nécrose des cellules du tissu malade.

- l'hyperthermie « douce » : l'élévation de température se fait dans le domaine 41-45°C. Elle constitue une technique permettant d'améliorer les effets de la radiothérapie et de la chimiothérapie, et elle peut stimuler des réponses immunitaires anti-tumorales.

La thermoablation présentant un risque élevé d'endommagement des tissus sains, l'hyperthermie douce apparaît comme la voie thérapeutique la plus prometteuse. Dans le domaine de température préconisé (41-45°C), il a été montré que les cellules cancéreuses subissent des dysfonctionnements (menant parfois à leur apoptose – suicide cellulaire-) que ne connaissent pas les cellules saines. Ces dysfonctionnements sont mis à profit pour renforcer l'efficacité des traitements par radiothérapie et chimiothérapie. Ainsi l'efficacité combinée

des radiations et de l'hyperthermie a pu être expliquée par une altération de l'ADN causée par l'irradiation et un dysfonctionnement du processus de réparation de la cellule cancéreuse dû à l'hyperthermie³².

La maîtrise des paramètres de synthèse des nanoparticules magnétiques, permettant de contrôler leurs propriétés physico-chimiques, a favorisé le développement de **l'hyperthermie induite par fluide magnétique** (magnetic fluid hyperthermia, MFH) pour provoquer des élévations de température dans la gamme 42-43°C^{31,32}. Afin d'atteindre une efficacité optimale, les particules doivent : posséder une SAR élevée pour minimiser les doses à injecter, être en concentration suffisante dans le tissu à traiter, et avoir une répartition homogène afin de produire un échauffement homogène dans la zone ciblée.

Le premier facteur dépend d'une part des propriétés physico-chimiques des particules, et d'autre part des fréquences et amplitudes du champ magnétique alternatif disponibles.

Le deuxième facteur peut faire intervenir l'encapsulation au sein de « vésicules » et la vectorisation (capacité d'internalisation par les cellules ciblées).

En ce qui concerne l'homogénéité d'échauffement, elle a été démontrée *in vitro* par Chan *et coll.*³³ et Jordan *et coll.*³⁴. Sur des souris auxquelles a été injecté un carcinome (tumeur cancéreuse), un échauffement à 47°C pendant 30min est induit par l'injection au niveau de la tumeur de nanoparticules de magnétite-dextrane. La distribution du ferrofluide dans la tumeur s'homogénéise durant l'échauffement (« thermal bystander effect »). Dans 44 % des cas, la croissance de la tumeur fut ralentie au bout de 40 jours de traitement³⁵. L'effet d'homogénéisation de la distribution a également été observé avec des magnétoliposomes cationiques (magnetic cationic liposomes, MCL) injectés en sous-cutané à des rats portant un gliome³⁶. La température au niveau de la tumeur passe de 36 à 43°C en 30min. Au bout d'un mois de traitement, une régression complète de la tumeur est observée chez les rats traités.

En 2000, le premier prototype d'un système d'hyperthermie clinique a été mis au point par l'équipe de Jordan à Berlin. Il a permis de réaliser des essais cliniques de phase I/II prometteurs pour le traitement de tumeurs du cerveau (gliomes) par MFH couplée à la radiothérapie³⁷.

B- Oignons magnétiques et hyperthermie

Ces tests ont été réalisés en collaboration avec Sébastien Vasseur, Lucile Hardel, Lydia Raison et Etienne Duguet (ICMCB, Bordeaux).

1. Nanoparticules magnétiques incorporées par encapsulation d'un ferrofluide

Les hybrides oignon/particules magnétiques (dispersion à 500mg/mL) ne présentent pas d'échauffement sous l'effet d'un champ magnétique oscillant (88mT, 108kHz) durant 40 min. Ceci paraît normal étant donné que le ferrofluide seul de particules de maghémite de 3,7 nm ne présente pas non plus d'échauffement à ce champ et à cette fréquence. Soulignons cependant que les tests sont limités par l'appareillage qui ne fonctionne qu'à une seule fréquence.

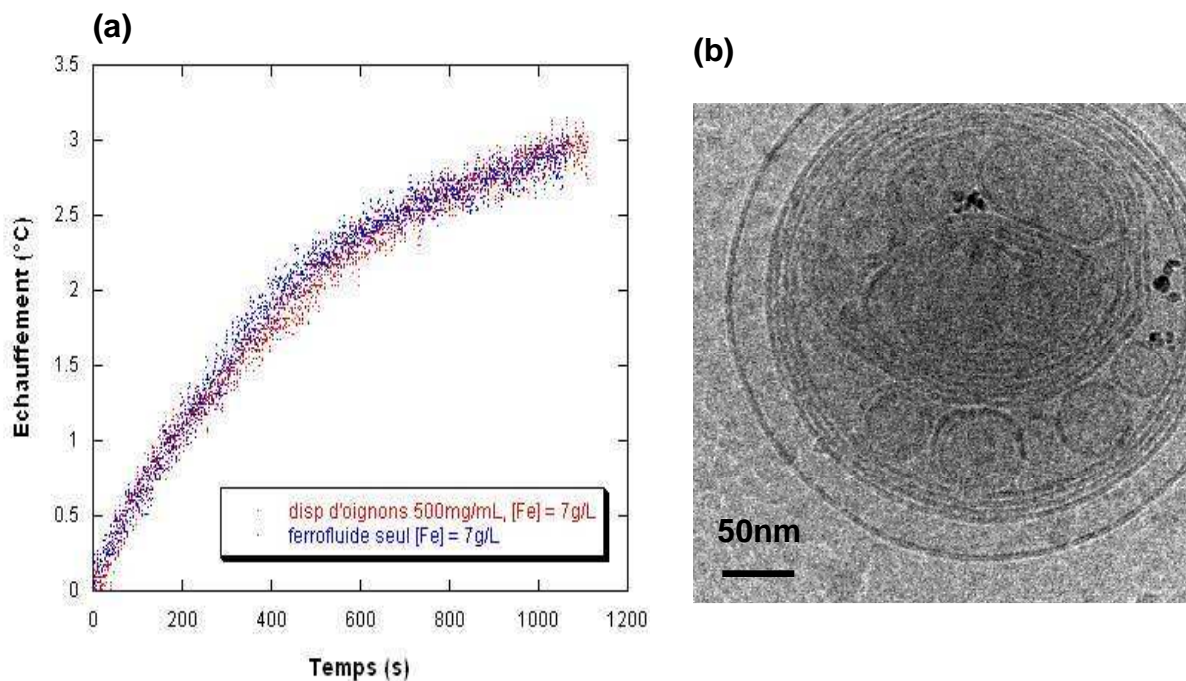


Figure 4.10 : (a) Echauffement d'une dispersion d'oignons contenant des particules de 8 nm de diamètre et ferrofluide correspondant ; (b) Image de cryoMET caractéristique d'un échantillon oignon/particules de 8 nm

Bien qu'elle ne soit pas détaillée dans ce manuscrit, l'encapsulation de nanoparticules de maghémite de 8 nm de diamètre au sein des oignons a aussi été abordée au cours de ce travail de thèse. La capacité d'échauffement des hybrides oignons/particules de 8 nm a également été testée. Nous avons comparé l'échauffement d'une dispersion d'oignon/particules de 8 nm à $[\text{Fe}] = 7\text{g/L}$ et celui d'une dilution du ferrofluide contenant les particules de 8 nm à $[\text{Fe}] = 7\text{g/L}$ (**figure 4.10a**). Les deux échantillons sont comparables puisque la concentration en fer est identique.

Les deux courbes d'échauffement ont la même allure et les pentes à l'origine sont identiques. Cependant, nous ne pouvons pas conclure au sujet de l'effet de l'encapsulation des particules au sein des oignons sur le mécanisme d'échauffement. En effet, les images de cryoMET réalisées sur quelques dispersions d'oignon/particules de 8 nm montrent que les oignons sont déstructurés en présence de ces nanoparticules (**figure 4.10b**). La taille des agrégats de particules dans le ferrofluide dilué dans l'eau ($D_h = 50\text{ nm}$ étudié par diffusion dynamique de la lumière) est sans doute à l'origine de cette déstructuration. Les taux d'encapsulation de ces nanoparticules doivent être faibles. Par conséquent la plupart des particules sont dans le milieu dispersant, libres. Elles se comportent finalement comme les particules du ferrofluide seul, expliquant l'allure identique des deux courbes de la figure 4.10a. Des expériences supplémentaires sont nécessaires pour conclure.

2. Nanoparticules magnétiques incorporées par synthèse *in situ*

Afin de connaître le pouvoir chauffant des oignons contenant des nanoparticules ayant été synthétisées par coprécipitation (chapitre 3, partie 2-I), nous les avons soumis à un champ magnétique oscillant (88mT, 108kHz) durant 40min et nous avons mesuré la température au sein de l'échantillon durant ce temps. La figure 4.11 présente l'évolution de la température de l'échantillon « $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}=1$, $[\text{Fe}]=0.1\text{M}$, $\text{pH}=10$ (NaOH), 4°C » à $J=0$ et à $J=9$ en fonction du temps. A $J=0$, aucune particule n'est synthétisée, alors qu'à $J=9$ des particules de 4 nm de diamètre ont été formées.

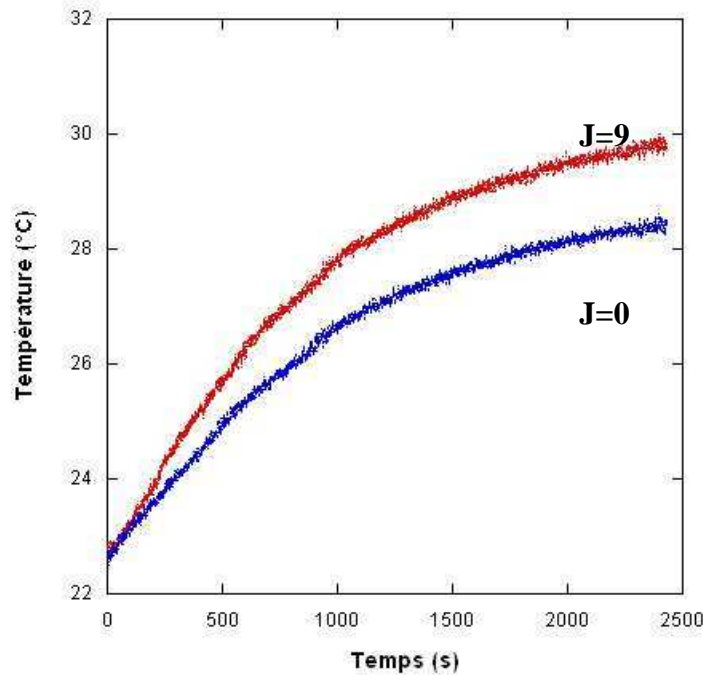


Figure 4.11 : Echauffement de l'échantillon « $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}=1$, $[\text{Fe}]=0.1\text{M}$, $\text{pH}=10$ (NaOH), 4°C » à $J=0$ et $J=9$ (dispersion à 100 mg/mL en oignons)

A $J=0$, l'échantillon ne contient pas de particules. Or nous constatons que la température en son sein augmente de $5,8^\circ\text{C}$. Cette élévation de température en l'absence de particules provient très vraisemblablement des courants de Foucault liés à la présence d'espèces ioniques. En effet, bien que nous utilisons un solénoïde pour favoriser la composante magnétique du champ électromagnétique, la composante électrique n'est pas nulle et elle induit des courants électriques au sein de l'échantillon qui ont pour effet de provoquer un échauffement de celui-ci par effet Joule.

A $J=9$, la température de l'échantillon s'élève de $7,2^\circ\text{C}$. Les courants de Foucault contribuent ici aussi à l'échauffement, mais celui-ci est plus important à $J=9$ qu'à $J=0$ (de $1,4^\circ\text{C}$). Cette différence pourrait être attribuée aux particules synthétisées.

Un autre paramètre à prendre en compte est la pente à l'origine des courbes. Elle est proportionnelle au pouvoir chauffant de l'échantillon (SAR, specific absorption rate) défini comme suit :

$$\text{SAR} = C \frac{m_{\text{eau}}}{m_{\text{Fe}}} \frac{dT}{dt}$$

avec C la capacité calorifique de la dispersion, m_{eau} la masse d'eau, m_{Fe} la masse de l'élément magnétique et dT/dt la pente de la courbe.

Nous n'avons pas mesuré la capacité calorifique des oignons, donc nous ne pouvons pas donner de valeur pour le SAR, mais nous pouvons comparer les pentes à l'origine. La pente est plus élevée à $J=9$ qu'à $J=0$: le pouvoir chauffant « évolue » donc entre $J=0$ et $J=9$. Cette évolution est peut-être due aux particules qui se sont formées entre $J=0$ et $J=9$.

Conclusion :

Le ferrofluide seul, comportant des particules de maghémite de 4 nm de diamètre, ne présente pas d'échauffement dans les conditions testées. Par conséquent les oignons au sein desquels il est encapsulé non plus.

Les oignons contenant des nanoparticules de 4 nm synthétisées *in situ* ($J=9$) présentent un échauffement et une pente à l'origine (donc un SAR) supérieurs à ceux des oignons ne contenant que Fe^{2+} et Fe^{3+} . Il est difficile d'attribuer cet échauffement au seul fait des particules, étant donné qu'elles sont peu magnétiques (chapitre 3) et qu'elles font la même taille que les particules de maghémite du ferrofluide.

Il serait bien sûr nécessaire de compléter cette étude, en testant d'autres paramètres de champ et de fréquence, en faisant notamment varier la taille et la concentration en particules, et en comparant le comportement particules encapsulées/non encapsulées dans les deux cas.

III- Applications des hybrides oignon/nanoparticules d'or pour la catalyse supportée

Ce travail a été réalisé en collaboration avec Damien Debecker et Eric Gaigneaux (Unité de Catalyse et Chimie des Matériaux Divisés, Université Catholique de Louvain, Belgique) dans le cadre du réseau d'excellence FAME. L'élaboration des catalyseurs et les observations par MET ont été faites à Bordeaux ; la caractérisation par AES et XPS et les tests catalytiques ont été réalisés par Damien Debecker à Louvain-la-Neuve.

Dans la partie 1 du chapitre 2, nous avons abordé la catalyse supportée, et nous avons vu que la taille des nanoparticules de métaux nobles déposées sur le support constitue un paramètre

crucial pour leur activité et accessibilité pour les réactifs. Le mode de préparation « classique » des catalyseurs utilise l'imprégnation du support par un sel d'ions métalliques précurseurs, suivie d'un traitement thermique à haute température (plus de 300°C). Ce dernier peut induire un frittage des nanoparticules, entraînant une augmentation de leur diamètre et diminuant leur activité catalytique. Afin de réduire voire d'éliminer ce phénomène, nous avons pensé utiliser les oignons pour déposer des nanoparticules d'or ou d'argent sur le support d'oxyde de titane divisé. Les nanoparticules étant « pré-fabriquées », la seule étape nécessaire sera l'élimination de la matrice organique qui se fera, de manière contrôlée, à une température inférieure à celle utilisée dans la méthode par imprégnation. Par ailleurs, nous pensons que les bicouches lipidiques pourraient limiter la diffusion des particules et les protéger de la coalescence durant la combustion. Dans le cadre de la chimie environnementale, l'équipe d'Eric Gaigneaux s'intéresse à la combustion des composés organiques volatiles comme les dioxines³⁸. C'est pourquoi l'activité catalytique a été testée sur la réaction de conversion du benzène, molécule modèle des dioxines.

A- Elaboration des catalyseurs

Deux types de nanoparticules métalliques ont été synthétisées au sein des oignons, puis incorporées sur le substrat : des particules d'or et d'argent.

1. Nanoparticules d'or

En ce qui concerne la synthèse des nanoparticules d'or, elle se fait par hydratation (principe de fabrication des hybrides dans le chapitre 2-IV), c'est-à-dire par encapsulation des ions précurseurs au sein de la phase lamellaire cisailée. La concentration en sel d'or KAuCl_4 introduite est 10^{-1}M et les observations de microscopie électronique en transmission montrent des particules de taille comprise entre 5 et 10 nm.

Ces hybrides oignon/nanoparticules d'or ont servi à imprégner un support composé de particules de TiO_2 de quelques micromètres. 4 mL d'une dispersion d'oignons à 25 mg/mL sont dilués pour atteindre un volume total de 100 mL auquel est ajouté 1 gramme de TiO_2 . Le tout est ensuite évaporé sous vide pendant 2h. L'évaporation induit vraisemblablement la

déstructuration partielle des oignons et le dépôt de particules d'or entourées d'un film lipidique. Des observations de MET ont ensuite été réalisées et elles ne permettent pas d'affirmer avec certitude que des particules d'or sont déposées sur le support. Les particules d'or synthétisées sont très petites, elles font à peine 5 nm de diamètre (*figure 4.12a*). Une analyse élémentaire par EDS (Energy Dispersive X-ray Spectroscopy) a été réalisée grâce à une sonde RX qui est couplée au microscope électronique. Elle est faite sur une zone d'environ 1 μm de diamètre contenant un agrégat de grains de TiO_2 présentant de petites particules, de faible contraste, suspectées d'être des clusters d'or. Le spectre témoigne de la présence d'or (*figure 4.12b*).

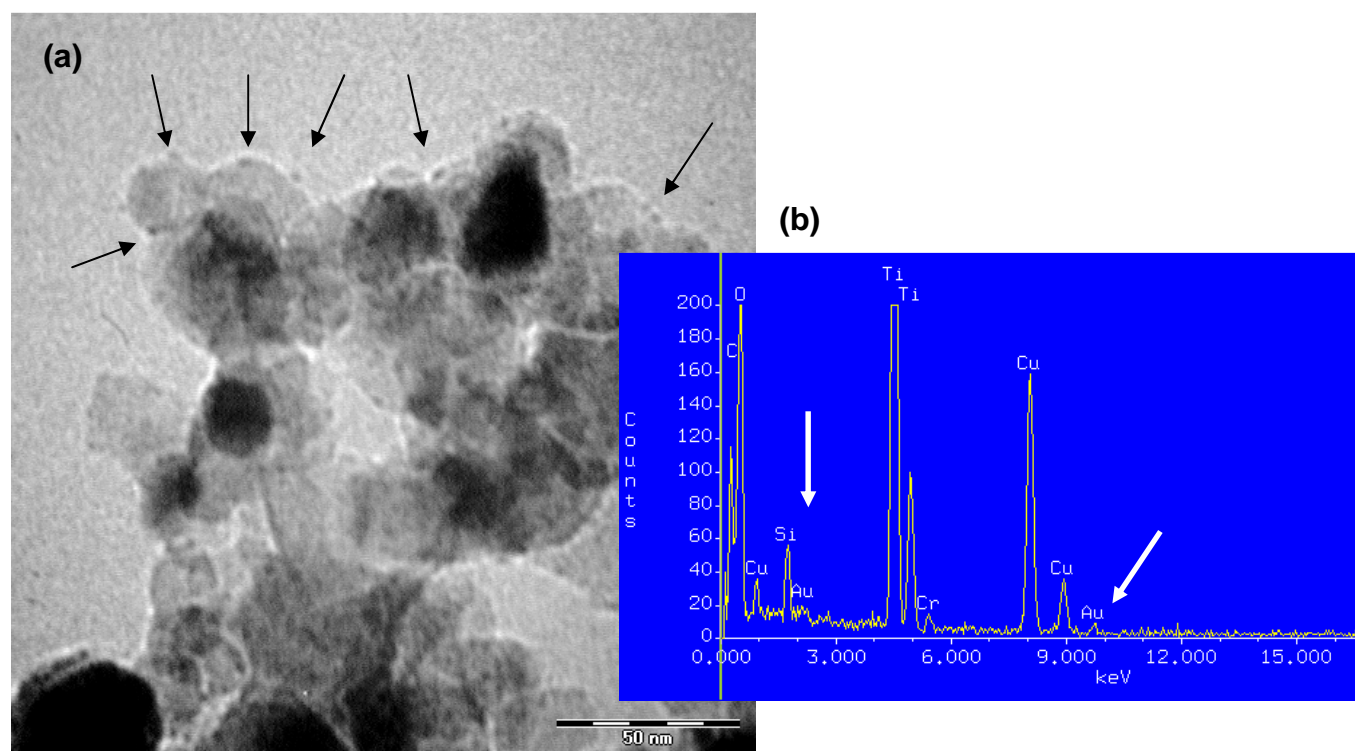


Figure 4.12 : (a) Cliché de MET et (b) spectre obtenu après une analyse élémentaire par EDS, pour l'échantillon « support TiO_2 + nanoparticules d'or ». Les présences de Cu et de Cr sont dues respectivement aux composants de la grille de MET et de la canne du porte-objet.

Une analyse élémentaire par XPS (X-ray Photoelectron Spectroscopy) confirme la présence d'or dans l'échantillon, comme le montre le spectre de la figure 4.13.

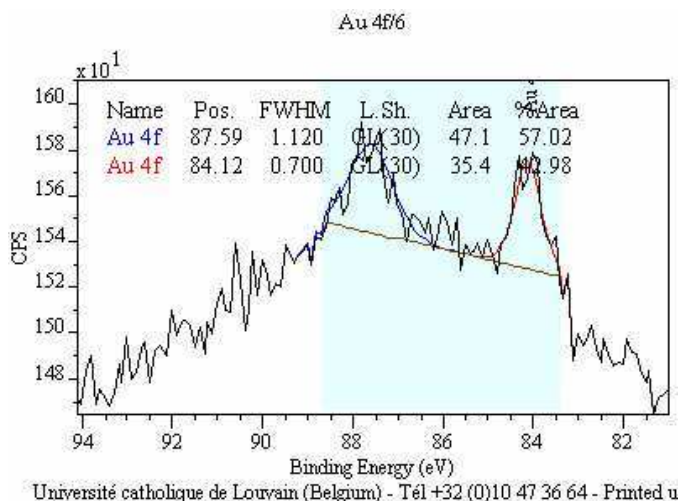


Figure 4.13 : Spectre XPS de « support TiO₂ + nanoparticules d’or »

La très faible intensité des pics indique que la quantité d’or en présence est très faible, ce qui est confirmé par spectroscopie d’émission atomique.

2. Nanoparticules d’argent

En ce qui concerne la synthèse des nanoparticules d’argent, deux méthodes sont employées : l’encapsulation des ions précurseurs par hydratation directe de la phase lamellaire, et la diffusion de ces ions du milieu dispersant vers l’intérieur de l’oignon. La concentration en AgNO₃ introduite est 0,44 M. Ces deux méthodes ont déjà été étudiées par Faure *et coll.*, et ils ont montré que :

- le tensioactif constituant les oignons (Genamin T020) servait de réducteur pour les ions Ag⁺,
- la taille des particules obtenues varie en fonction du temps d’incubation de 3 nm au bout de 30min à 10nm au bout de 17h dans le cas de la méthode par diffusion,
- la taille des particules est de l’ordre de 10 nm par la méthode d’hydratation.

La préparation des catalyseurs est la même : 4 mL d’une dispersion d’oignons à 25 mg/mL sont dilués pour atteindre un volume total de 100 mL auquel est ajouté 1 gramme de TiO₂, puis le tout est évaporé pendant 2h. Nous avons fait varier le temps d’incubation dans les 4 échantillons testés :

- diffusion : 30min et 20h

-hydratation : 40min et 4h.

Un catalyseur utilisant des grains de $\text{TiO}_2/\text{V}_2\text{O}_5$ + nanoparticules d'argent a également été préparé par cette méthode.

Un cliché de MET typique des échantillons obtenus montrent des particules d'argent de 5-10nm de diamètre (*figure 4.14a*). Le spectre issu de l'analyse élémentaire réalisée sur la zone décrite par cette image présente des pics caractéristiques de l'argent (*figure 4.14b*).

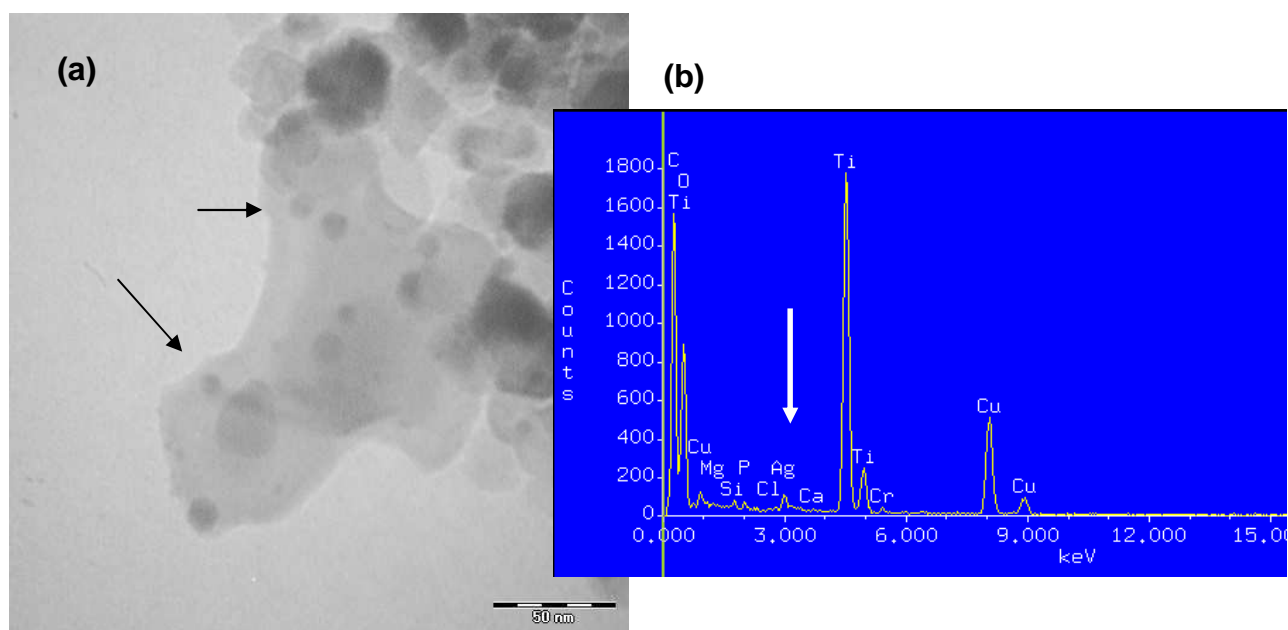


Figure 4.14 : (a) Cliché de MET et (b) spectre obtenu après une analyse élémentaire par EDS, pour l'échantillon « support TiO_2 + nanoparticules d'argent »

Une analyse élémentaire par XPS confirme la présence d'argent (*figure 4.15*).

La position des pics correspondant aux énergies de liaison de l'atome d'argent ne permet pas de confirmer la présence d'argent métallique. Afin de pouvoir conclure, il serait nécessaire de réaliser le spectre XPS de « support TiO_2 + Ag^+ » et de comparer les positions des pics. Un déplacement des pics vers les énergies de liaison plus élevées dans ce cas serait le signe d'un état plus oxydé de l'argent.

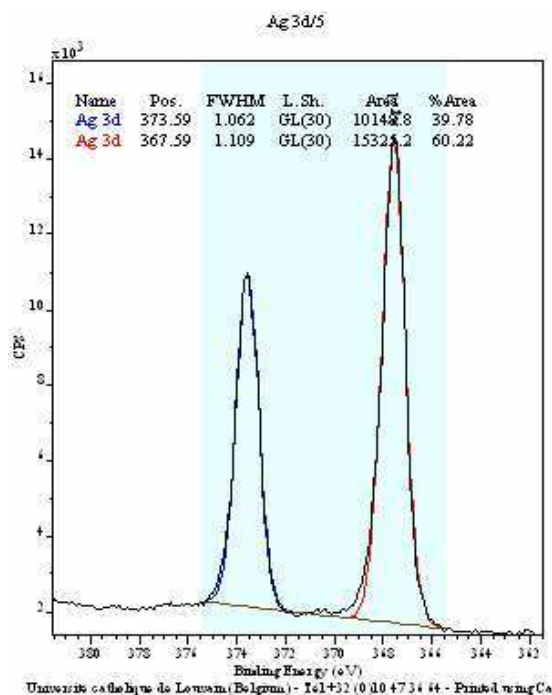


Figure 4.15 : Spectre XPS de « support TiO_2 + nanoparticules d'argent »

3. Calcination

Nous avons établi par des analyses thermogravimétriques que la matrice de tensioactifs était calcinée à 320°C .

Après calcination à 350°C dans le cas de « support TiO_2 + nanoparticules d'argent », des observations de MET montrent que les nanoparticules d'argent font toujours entre 5 et 10nm (**figure 4.16**). Ceci est une preuve de la conservation de la taille des particules pendant et après le traitement thermique : aucun frittage des particules n'est à déplorer. La présence des lipides semble donc protéger les nanoparticules de la coalescence.

B- Activité catalytique

L'activité catalytique des catalyseurs ainsi préparés a été testée sur la réaction d'oxydation totale du benzène en CO_2 , H_2O , etc, par calcination. Le benzène est choisi comme composé organique volatile modèle de la dioxine, molécule comportant deux cycles phényles. Des catalyseurs Ag/TiO_2 et $\text{Ag/V}_2\text{O}_5\text{-TiO}_2$ ont été testés, pour des nanoparticules préparées par la méthode d'hydratation.

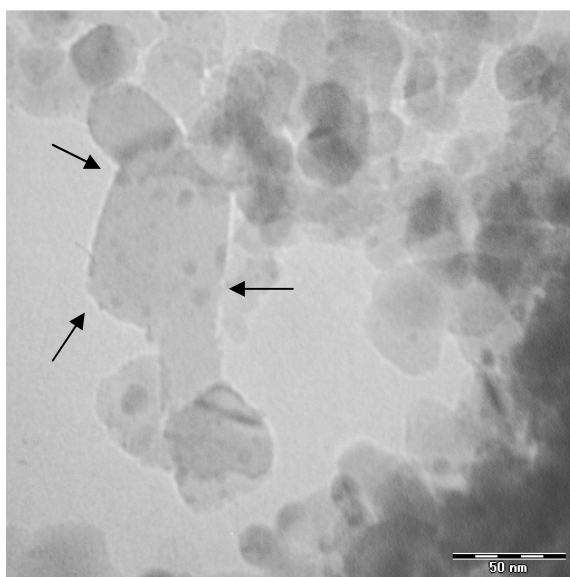


Figure 4.16 : Cliché de MET de l'échantillon « support TiO_2 + nanoparticules d'argent » calciné à 350°C

La figure 4.17 présente le taux de conversion du benzène en fonction de la température pour un catalyseur TiO_2 et Ag/TiO_2 .

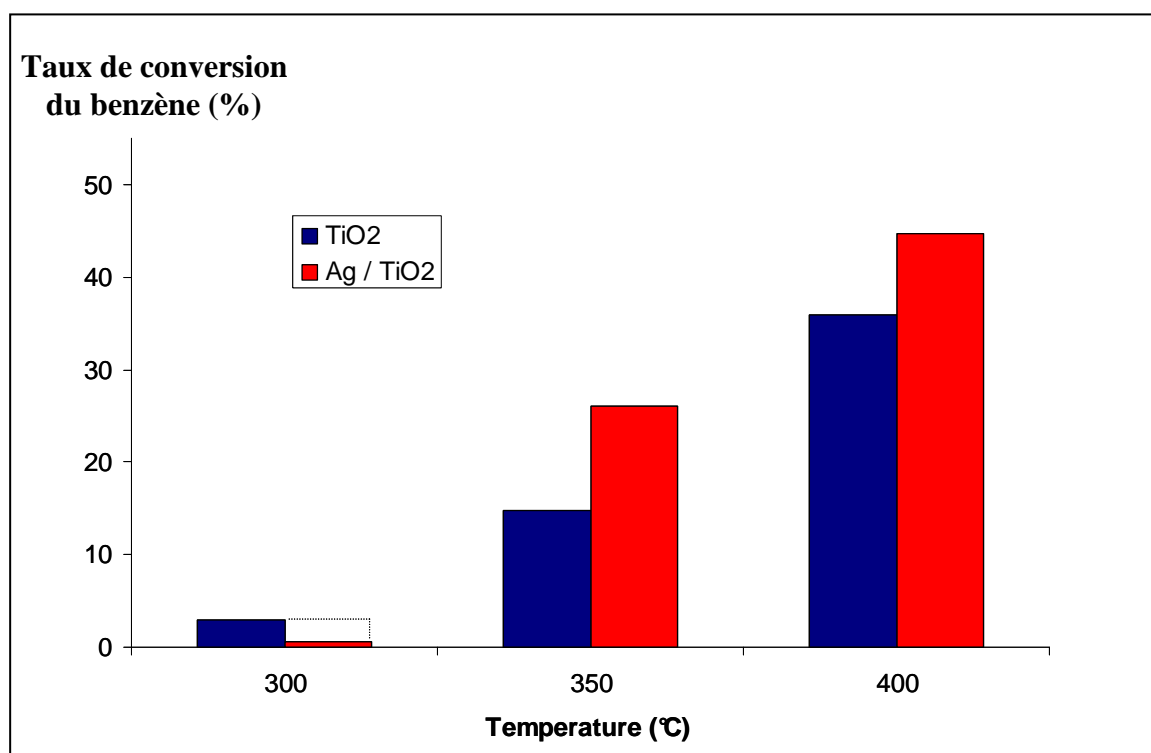


Figure 4.17 : Taux de conversion du benzène en fonction de la température de calcination pour un catalyseur TiO_2 et Ag/TiO_2

A 350°C et 400°C, le taux de conversion du benzène est plus important en présence du catalyseur comportant des nanoparticules d'argent, alors qu'à 300°C, le taux de conversion du benzène est plus faible en présence de Ag/TiO₂ qu'en présence de TiO₂. Par contre, lorsque la réaction est réalisée à 300°C en présence de Ag/TiO₂ préalablement calciné à plus de 350°C, alors le taux de conversion revient au niveau de celui de la réaction faite avec TiO₂ seul (traits en pointillé). Ainsi la présence des lipides lors de la première expérience à 300°C gênait l'accessibilité de la molécule de benzène aux grains de TiO₂ et à l'argent, limitant leur activité catalytique à 300°C.

La figure 4.18 présente le taux de conversion du benzène en fonction de la température pour un catalyseur V₂O₅-TiO₂ et Ag/V₂O₅-TiO₂.

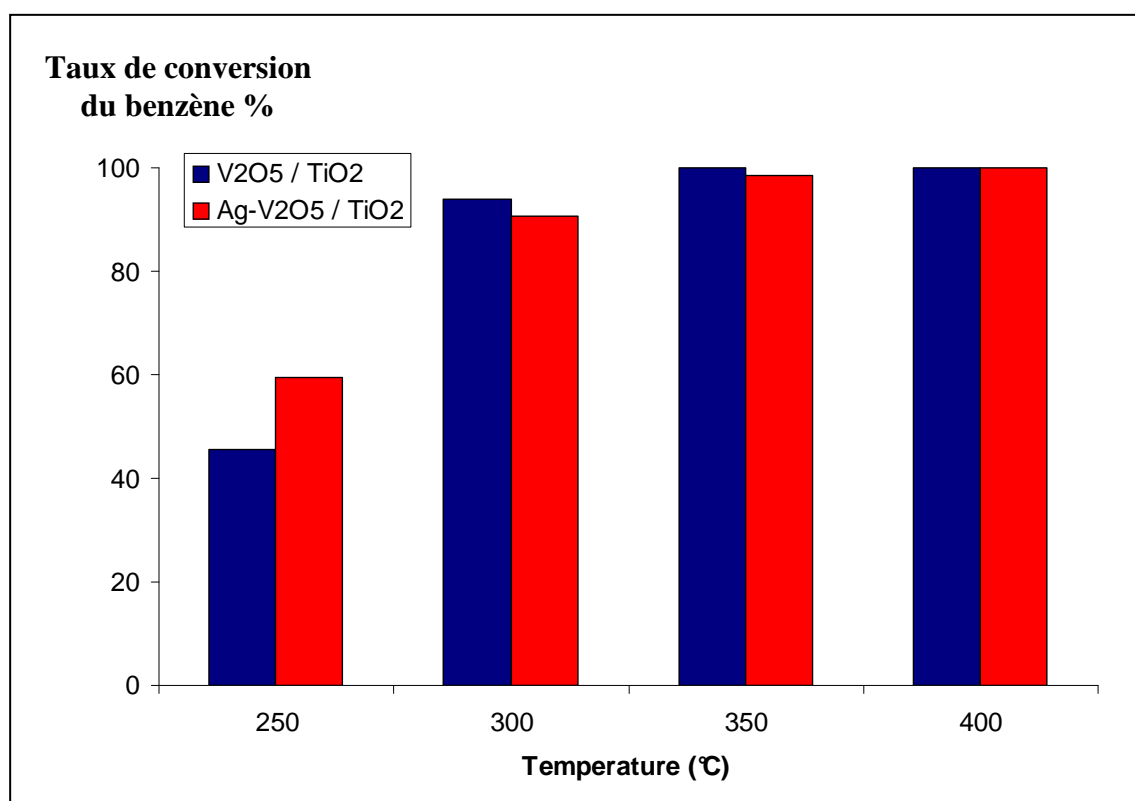


Figure 4.18 : Taux de conversion du benzène en fonction de la température de calcination pour un catalyseur V₂O₅-TiO₂ et Ag/V₂O₅-TiO₂

L'activité catalytique importante des catalyseurs à base de vanadium a déjà été démontrée³⁹ et elle explique les taux de conversion élevés observés. Il est à noter qu'à 250°C, le taux de conversion est plus élevé en présence des nanoparticules d'argent : ceci peut s'expliquer par un effet de synergie entre vanadium et métal noble, déjà mis en évidence dans l'équipe d'Eric Gaigneaux⁴⁰.

Conclusion :

Une méthode originale d'élaboration de catalyseurs supportés a ainsi été mise au point. Elle utilise les oignons pour le dépôt, puis la protection des particules d'or ou d'argent lors de la réaction de combustion. L'activité catalytique des catalyseurs à l'argent a été démontrée.

Références

- ¹ Rivière C., *Les colloïdes magnétiques et leur utilisation biophysique dans la détection, le guidage et le suivi cellulaire invitro et in vivo*, thèse de l'Université Paris 6, **2005**
- ² Puddephat M., *Principle of Magnetic Resonance Imaging*, **2003**, copyright easy measure, Ltd
- ³ Mornet S., *Synthèse et modification chimique de la surface de nanoparticules de maghémite à des fins d'applications biomédicales*, thèse à l'Université Bordeaux 1, **2002**
- ⁴ Okuhata Y., *Adv. Drug Delivery Rev.*, **1999**, 37, 121
- ⁵ a) Brasch R.C., *Magn. Reson. Med.*, **1991**, 22, 282; b) Unger E., Tilcock C., Ahkong Q.F., Fritz T.A., *Invest. Radiol.*, **1990**, 25, S65
- ⁶ a) Ogan M.D., Schmiedl U., Moseley M.E., Grodd W., Paajanen H., Brasch R.C., *Invest. Radiol.*, **1987**, 22, 665; b) Rebizak R., Schaefer M., Dellacherie E., *Bioconjug. Chem.*, **1997**, 8, 605; c) Lim T.H., Lee D.H., Kim Y.H., Park S.W., Park P.H., Seo D.M., Kim S.T., Lee T.K., Mun C.W., *Radiology*, **1993**, 189, 765; d) Wiener E.C., Brechbiel M.W., Brothers H., Magin R.L., Gansow O.A., Tomalia D.A., Lauterbur P.C., *Magn. Reson. Med.*, **1994**, 31, 1
- ⁷ Fossheim S.L., Fahlvik A.K., Klaveness J., Muller R.N., *Magn. Reson. Imaging*, **1999**, 17(1), 83
- ⁸ Weissig V., Babich J., Torchilin V., *Colloids and Surfaces B : Biointerfaces*, **2000**, 18, 293
- ⁹ Trubetskoy V.S., Cannillo J.A., Milshtein A., Wolf G.L., Torchilin V.P., *Magn. Reson. Imaging*, **1995**, 13(1), 31
- ¹⁰ a) Billotey C., Wilhelm C., Devaud M., Bacri J.C., Bittoun J., Gazeau F., *Magn. Reson. Med.*, **2003**, 49, 646; b) Wilhelm C., Gazeau F., Roger J., Pons J.N., Bacri J.-C., *Langmuir*, **2002**, 18, 8148
- ¹¹ Martina M.-S., Fortin J.-P., Ménager C., Clément O., Barratt G., Grabielle-Madélmont C., Gazeau F., Cabuil V., Lesieur S., *J. Am. Chem. Soc.*, **2005**, 127, 10676

-
- ¹² Berret J-F., Schonbeck N., Gazeau F., El Kharrat D., Sandre O., Vacher A., Airiau M., *J. Am. Chem. Soc.*, **2006**, 128, 1755
- ¹³ Bengele H.H., Palmacci S., Rogers J., Jung C.W., Crenshaw J., Josephson L., *Magn. Reson. Imaging*, **1994**, 12(3),433
- ¹⁴ Weissleder R., Lee A.S., Fischman A.J., Reimer P., Shen T., Wilkinson R., Callahan R.J., Brady T.J., *Radiology*, **1991**, 181, 254
- ¹⁵ Bogdanov A., Papisov M., Weissleder R., Shen T., Brady T.J., *Proc. Soc. Magn. Reson. Med.*, 11th annual meeting, **1992**, 864, New York
- ¹⁶ Kresse M., Wagner S., Taupitz M., *Scientific and clinical applications of magnetic carriers*, **1997**, 41, 545, Plenum Press, New York
- ¹⁷ Suzuki M., Honda H., Kobayashi T., Wakabayashi T., Yoshida J., Takahashi M., *Brain Tumor Pathol.*, **1996**, 13, 127
- ¹⁸ Cerdan S., Lotscher H.R., Kunnecke B., Seeling J., *Magn. Reson. Med.*, **1989**, 12, 151
- ¹⁹ Chan T.W., Eley C., Liberti P., So A., Kresel H.Y., *Invest. Radiol.*, **1997**, 27, 443
- ²⁰ Smirnov P., Lavergne E., Gazeau F., Lewin M., Boissonnas A., Doan B-T., Gillet B., Combadière C., Combadière B., Clément O., *Magn. Reson. Med.*, **2006**, 56, 498
- ²¹ Bulte J.W.M., Douglas T., Witner B., Zhang S-C., Strable E., Lewis B.K., Zywicke H., Miller B., Van Gelderen P., Moskowitz B.M., Duncan I.D., Frank J.A., *Nature Biotechnology*, **2001**, 19, 1141
- ²² Ai H., Flask C., Weinberg B., Shuai X., Pagel M.D., Farrell D., Duerk J., Gao J., *Adv. Mater.*, **2005**, 17, 1949
- ²³ Gillis P., Koenig S.H., *Magn. Reson. Med.*, **1987**, 5, 323
- ²⁴ Roch A., Gossuin Y., Muller R.N., Gillis P., *J. Magn. Magn. Mater.*, **2005**, 293, 532
- ²⁵ Perez J.M., Josephson L., Weissleder R., *Chem. Bio. Chem.*, **2004**, 5, 261
- ²⁶ Bogdanov A.A., Lewin M., Weissleder R., *Adv. Drug Delivery Rev.*, **1999**, 37, 279
- ²⁷ Jung C.W., *Magn. Reson. Imaging*, **1995**, 13, 675

-
- ²⁸ Mornet S., Vasseur S., Grasset F., Duguet E., *J. Mater. Chem.*, **2004**, 14, 2161
- ²⁹ Chan D.C.F., Kirpotin D.B., Bunn P.A., *Scientific and clinical applications of magnetic carriers*, **1997**, p607, Plenum Press, New York
- ³⁰ Hergt R., Andra W., D'Ambly C.G., Hilger I., Kaiser W.A., Richter U., Schmidt H.G., *IEEE Trans. Magn.*, **1998**, 34, 3745
- ³¹ Jordan A., Rheinlander T., Waldofner N., Scholz R., *J. Nanoparticle Res.*, **2003**, 5, 597
- ³² Jordan A., Scholz R., Wust P., Fahling H., Felix R., *J. Magn. Magn. Mater.*, **1999**, 201, 413
- ³³ Chan D.C.F., Kirpotin D.B., Bunn P.A., *J. magn. Magn. Mater.*, **1993**, 122, 374
- ³⁴ Jordan A., Wust P., Scholz R., *Int. J. Hyperthermia*, **1996**, 12, 705
- ³⁵ Jordan A., Scholz R., Wust P., *Int. J. Hyperthermia* **1997**, 13, 587
- ³⁶ Shinkai M., Yanase M., Suzuki M., Honda H., Wakabayashi T., Yoshida J., Kobayashi T., *J. Magn. Magn. Mater.*, **1999**, 194, 176
- ³⁷ Jordan A., Scholz R., Maier-Hauff K., Felix R. et coll., *J. Magn. Magn. Mater.*, **2001**, 225, 118
- ³⁸ a) Bertinchamps F., Attianese A., Mestdagh M.M., Gaigneaux E.M., *Catalysis Today*, **2006**, 112, 165 ; b) Bertinchamps F., Cimpeanu V., Gaigneaux E.M., Parvulescu V.I., *Applied Catalysis A : General*, **2007**, 325, 283 ; c) Debecker D.P., Bertinchamps F., Blangenois N., Eloy P., Gaigneaux E.M., *Applied Catalysis B : Environmental*, **2007**, 74, 223 ; d) Cellier C., Lambert S., Gaigneaux E.M., Poleunis C., Ruaux V., Eloy P., Lahousse C., Bertrand P., Pirard J-P., Grange P., *Applied Catalysis B : Environmental*, **2007**, 70, 406
- ³⁹ a) Everaert K., Baeyens J., *Waste Manage.*, 2004, 24, 37; b) Bertinchamps F., Poleunis C., Grégoire C., Bertrand P., Gaigneaux E-M., *4th International Conference on Environmental catalysis*, Heidelberg, Book of abstracts (5-8 June), 2005, p155; c) Alemany L.J., Berti F., Busca G., Ramis G., Robba D., Toledo G.P., Trombetta M., *Appl. Catal. B : Environ.*, **1996**, 10, 299
- ⁴⁰ Bertinchamps, Debecker D.P., Treinen M.A., Dos Santos M.A., Grégoire C., Gaigneaux E-M et coll., Europacat-8, Turku (Finland), Aug 26-31, 2007 (poster communication)

L'objectif de ce travail de thèse était double :

-d'une part, le milieu confiné que constitue l'oignon devait être utilisé pour la synthèse de nanoparticules inorganiques de taille et de forme contrôlées,

-d'autre part, il visait à élaborer un hybride oignon/nanoparticules stable, c'est-à-dire dont la structure interne est conservée en présence des nanoparticules inorganiques, afin de pouvoir exploiter les propriétés des oignons pour des applications biomédicales.

Dans le chapitre 2, nous avons montré que l'oignon pouvait servir de « microréacteur chimique » pour la synthèse de nanoparticules d'or. Le mécanisme de réduction des ions précurseurs AuCl_4^- a été mis en évidence par des analyses infrarouge, qui ont montré que l'un des constituants des bicouches des oignons, la monooléine, pouvait servir d'agent réducteur. L'insertion dans les bicouches d'un groupement présentant une forte affinité pour l'or métallique permet de modifier la taille et la morphologie des particules. Le diamètre des particules notamment passe de 20 nm en l'absence de NH_2 , à 5-10 nm en sa présence. Il est encore possible de diminuer la taille et d'améliorer la monodispersité des particules obtenues en faisant appel à la photoactivation UV ou à la radiolyse γ . Dans le premier cas, les particules ont une taille de 5 nm, dans le deuxième, elles atteignent 3 nm. De plus, par radiolyse γ , des assemblages originaux de nanoparticules ont été formés. La structure interne de l'oignon est conservée dans la voie chimique classique, par contre les méthodes de préparation par irradiation (UV et γ) déstructurent l'oignon.

Dans le chapitre 3, l'élaboration d'oignons magnétiques a été décrite, avec ses deux voies : la synthèse *in situ* de particules magnétiques, et l'encapsulation d'un ferrofluide.

La coprécipitation intravésiculaire des ions Fe^{2+} et Fe^{3+} a permis de produire des oignons stables en présence de nanoparticules de 4 nm de diamètre environ. Par contre, comme il a déjà été constaté dans la littérature pour des synthèses en milieu confiné, la cristallinité des particules est faible et elles sont constituées d'un mélange de plusieurs phases cristallines. Par conséquent, les propriétés magnétiques de ces particules sont faibles.

L'encapsulation de nanoparticules « pré-formées » au sein des oignons se fait principalement sous forme d'agrégats. La capacité d'encapsulation des oignons est donc limitée par la taille des agrégats pouvant se loger entre les bicouches. Ainsi, nous avons montré qu'il existe une concentration maximale en particules encapsulées.

Dans le chapitre 4, les caractérisations des hybrides oignons/nanoparticules pour les applications envisagées ont été abordées.

Nous avons montré que les oignons au sein desquels des nanoparticules de maghémite « pré-formées » ont été encapsulées, se comportent comme de bons agents de contraste T_2 . Ces propriétés remarquables ont été imputées au confinement des agrégats de particules entre les bicouches des oignons. En hyperthermie, ces particules, trop petites (4 nm), ne génèrent pas d'échauffement au sein de la dispersion. Concernant les nanoparticules synthétisées *in situ*, leurs faibles propriétés magnétiques ne les rendent pas adaptées pour ce type d'applications.

L'utilisation des hybrides oignon/nanoparticules d'or et d'argent est prometteuse pour la catalyse. En effet, nous avons montré que le dépôt des particules sur le support d'oxyde inorganique divisé est possible via les oignons. De plus, les bicouches lipidiques semblent protéger les nanoparticules de la coalescence durant le traitement thermique du catalyseur.

D'un point de vue plus général, concernant l'intégrité de l'oignon en présence des particules, deux facteurs semblent se dégager : le rapport diamètre des particules / pas smectique de la phase lamellaire, et la quantité de particules. En effet, dans le cas de l'or, nous avons montré que plus le diamètre des particules est grand par rapport à la distance de répétition des bicouches lipidiques, plus la phase lamellaire est désorganisée. Les oignons sont par conséquent déstructurés. Le même effet a été constaté pour les oxydes/hydroxydes de fer formés *in situ* : les particules grossissent avec le temps, détruisant la structure interne de l'oignon. L'influence de la quantité de particules présente est clairement mise en évidence dans le cas de la synthèse des particules d'or par les méthodes d'irradiation.

Concernant la taille des particules synthétisées *in situ*, nous avons montré que la présence, au sein des bicouches, d'un tensioactif capable de s'adsorber à la surface des particules pour en limiter la croissance permet un contrôle relatif de leur taille. C'est le cas pour l'or avec l'octadécylamine, mais aussi pour les oxydes/hydroxydes de fer avec les phosphatidylcholine. La croissance confinée entre les bicouches joue également un rôle dans ce contrôle de la taille.

Les perspectives à ce travail de thèse sont multiples. Nous pouvons citer :

- pour les nanoparticules d'or, développer les tests en catalyse, notamment avec les particules préparées par irradiation, plus petites, donc plus réactives, et plus nombreuses,
- pour la préparation de nanoparticules magnétiques *in situ*, augmenter la cristallinité des particules (afin d'améliorer leurs propriétés magnétiques), en essayant notamment d'augmenter la vitesse de diffusion des ions OH^- à travers les bicouches lipidiques ; les caractériser alors pour l'IRM et les tester en hyperthermie,
- pour l'encapsulation du ferrofluide, tester les hybrides oignon/particules de 4nm comme agent de contraste T_2 *in vivo* ; déterminer les conditions optimales d'encapsulation pour des particules de plus grande taille afin de pouvoir développer des applications en hyperthermie.

A plus long terme, la co-encapsulation d'un principe actif et de nanoparticules magnétiques au sein de l'oignon, ainsi qu'une étude *in vivo* sont également envisagées.

Incorporation de nanoparticules inorganiques dans des vésicules multilamellaires lipidiques de type « oignon »

Résumé :

Ce travail de thèse a porté sur l'incorporation de nanoparticules inorganiques au sein de vésicules multilamellaires lipidiques de type « oignon ».

La synthèse intravésiculaire de nanoparticules d'or a été réalisée par voie chimique, photoréduction UV et radiolyse gamma. Nous avons montré qu'il est possible de contrôler la morphologie des particules par la composition vésiculaire dans le cas d'une réduction chimique. Quelle que soit la voie de synthèse, nous avons établi que la stabilité de l'oignon dépend de la taille des nanoparticules qu'il contient et de leur nombre. L'utilisation de ces structures hybrides, oignons/nanoparticules (or et argent), pour la catalyse supportée a été abordée.

Nous avons également élaboré des oignons magnétiques selon deux voies: par synthèse intravésiculaire de nanoparticules magnétiques et par encapsulation d'un ferrofluide. Les propriétés des oignons en terme de magnétisme, d'hyperthermie magnétique et d'agents de contraste pour IRM ont été étudiées.

Mots clés :

Vésicules lipidiques de type « oignon » ; nanovecteur hybride organique/inorganique ; synthèse en milieu confiné ; encapsulation d'un ferrofluide ; agent de contraste pour l'IRM ; hyperthermie

Insertion of inorganic nanoparticles inside onion-type multilamellar lipidic vesicles

Abstract :

This work deals with the insertion of inorganic nanoparticles inside onion-type multilamellar vesicles.

Intravesicular synthesis of gold nanoparticles was performed via three paths: chemical reduction, UV photoreduction and gamma radiolysis. Control of nanoparticles morphology via chemical composition of vesicles was demonstrated for chemical reduction. Whatever the synthetic path, onion stability depends on the number and the size of synthesized particles. Such an organic/inorganic hybrid, onion/nanoparticles (gold and silver), was tested for heterogeneous catalysis.

Magnetic onions were also elaborated via two methods: intravesicular synthesis of magnetic nanoparticles and ferrofluid encapsulation. Magnetic properties of onions, as contrast agent for MRI and for hyperthermia, were measured.

Keywords :

Onion-type lipidic vesicles ; organic/inorganic hybrid nanocarrier ; synthesis in constrained medium; ferrofluid encapsulation; MRI contrast agent; hyperthermia