



THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par l'Université de Toulouse III-Paul Sabatier
Discipline ou spécialité : *Sciences et génie des matériaux*

Présentée et soutenue par
Sèmiyou Ayélé OSSENI

Le 14 décembre 2012

NANOPLATEFORMES HYBRIDES MULTIMODALES POUR L'IMAGERIE MÉDICALE

JURY

<i>Gilles LEMERCIER</i>	<i>Professeur- Université de Reims</i>	<i>(Rapporteur)</i>
<i>Rachid MAHIOU</i>	<i>Professeur- Université de Clermont-Ferrand</i>	<i>(Rapporteur)</i>
<i>Justin TEISSIE</i>	<i>Directeur de recherche- CNRS-IPBS</i>	<i>(Examineur)</i>
<i>Jeannette DEXPERT-GHYS</i>	<i>Chargée de recherche- CNRS-CEMES</i>	<i>(Invitée)</i>
<i>Marc VERELST</i>	<i>Professeur- Université de Toulouse III</i>	
<i>Robert MAURICOT</i>	<i>Maître de conférence-Université de Toulouse III</i>	
<i>Marie-Joëlle MENU</i>	<i>Professeur-Université de Toulouse III</i>	<i>(Présidente)</i>

Ecole doctorale : Sciences de la matière
Unité de recherche : Centre d'Élaboration des Matériaux et d'Études Structurales (CEMES)
Directeur(s) de Thèse : Pr. Marc VERELST et Dr. Robert MAURICOT

Remerciements

Aucun travail ne s'accomplit dans la solitude¹. Aussi ai-je voulu au terme de cet humble travail remercier, tous ceux qui, de près ou de loin ; y ont contribué sous quelque forme que ce soit.

Ce travail a été réalisé principalement au sein de l'équipe *Nanomatériaux* du CEMES (Centre d'Élaboration des Matériaux et d'Études Structurales) de Toulouse. Je remercie Mr Jean-Pierre LAUNAY directeur du CEMES à l'époque, de m'y avoir accueilli. Je remercie également le ministère français de l'enseignement supérieur et de la recherche qui, par le biais de l'Université Paul Sabatier m'a octroyé une allocation de recherche pour ces travaux de thèse.

Je tiens particulièrement à témoigner toute ma reconnaissance à Mr Marc VERELST, professeur à l'université Paul Sabatier de Toulouse d'avoir accepté de diriger ces travaux. Aussi, voudrais-je le remercier pour m'avoir sélectionné pour travailler sur ce sujet pluridisciplinaire et de m'avoir mis en contact avec des équipes de spécialistes dans les différents domaines que ça soit en France, aux Pays- Bas et au Brésil. J'ai pu apprécier au cours de ces trois années, ses grandes qualités scientifiques et humaines. Sa disponibilité, son aide et sa bonne humeur m'ont été d'un grand soutien. Il a su me motiver pour l'exercice difficile qu'était la rédaction de ce manuscrit.

J'adresse mes remerciements à Mr Robert MAURICOT, maître de conférences à l'IUT de Toulouse, pour avoir accepté de codiriger ce travail. Merci pour sa disponibilité et les enrichissements précieux dont il m'a fait bénéficier au cours de nombreuses discussions. Ce fut d'un enthousiasme constant d'avoir été votre doctorant.

J'adresse également mes remerciements à Mme Jeannette DEXPERT-GHYS, chargée de recherche au CEMES/CNRS, pour sa disponibilité, ses nombreux conseils sur la spectroscopie de terres rares. En un mot, vous avez été pour moi une maman dans l'équipe.

Je tiens à remercier Mr Gilles LEMERCIER, professeur à l'Université de Reims et Mr Rachid MAHIOU, professeur à l'Université de Clermont Ferrand pour avoir accepté de juger ce manuscrit en qualité de rapporteurs ; à Mr Justin TEISSIE, directeur de recherche à l'Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale de Toulouse pour avoir accepté d'examiner ce travail de thèse en tant qu'examineur et à Mme Marie-Joëlle MENU, professeur à l'université Paul Sabatier pour avoir accepté d'examiner ce travail de thèse en tant qu'examinatrice et présider au jury de ma thèse.

Au cours de ces travaux j'ai eu à collaborer avec d'autres personnes de divers laboratoires et je m'en voudrais de ne pas les remercier ici. Je pense à :

Mr Eddy MAGDELEINE, Mme Véronique SANTRAN de la société ICELLTIS de Toulouse et Daniel CUSSAC de l'INSERM-U1048 Toulouse, qui m'ont fait les tests de cytotoxicité, d'internalisation, de marquage biologique et d'imagerie utilisant mes matériaux synthétisés.

Mme Hélène GROS-DAGNAC, et Mr Pierre CELSIS de la plateforme d'imagerie médicale de l'hôpital de Purpan qui m'ont aidé à faire des images à 3 Tesla avec un appareil clinique en Imagerie par Résonance Magnétique (IRM).

Mr Olivier TILLEMENT (Professeur à l'université de Lyon, équipe FENNEC) et Pascal PERRIAT (Professeur à l'INSA-Lyon) qui m'ont accueilli chaleureusement dans leur laboratoire pour les mesures relaxométriques à 1,4 Tesla.

Mr Robin GARCIA (Institut Sainte Catherine-Avignon) qui m'a fait de l'imagerie par tomographie de rayons X.

Mr Joop A. Peters (Laboratoire de Biocatalyse et de chimie organique de l'Université de Technologie de Delft (Pays-Bas)) qui m'a fait l'honneur de m'accueillir dans son laboratoire pour les mesures relaxométriques à 7 et 9,4 Tesla. Je tiens à lui témoigner toute ma reconnaissance. J'ai grandement apprécié le travail à ses cotés. Je pense entre autres aux longues journées passées devant le spectromètre, et toute sa disponibilité à m'aider à mieux interpréter les résultats. Qu'il en soit ici, chaleureusement remercié.

Mr José Mauricio CAIUT (Laboratoire des matériaux inorganiques et de physicochimie de surface -USP (*Ribeirão Preto*, Sao Paulo, **Brésil**)), qui m'a permis de faire un séjour de 3 mois dans son laboratoire en collaboration avec l'Institut de chimie d'Araraquara et la faculté de pharmacie d'Araraquara -UNESP, (*Araraquara*, Sao Paulo, **Brésil**) pour m'avoir permis d'acquérir des connaissances sur la fonctionnalisation de nanoparticules. Merci pour les nombreux échanges scientifiques ou non que nous avons eus. Ce séjour au Brésil a été pour moi très enrichissant car il m'a permis de découvrir toute une autre culture et ce qu'est « la joie de vivre ». Je continue toujours d'avoir la nostalgie ...*Saudade* !

J'aimerais témoigner toute ma sympathie envers les personnes avec lesquelles j'ai passé ces années au CEMES. Je pense à David NEUMEYER pour ses nombreux conseils, sa patience et sa disponibilité pendant les moments difficiles passés avec le montage de sulfuration ; Sévérine LECHEVALLIER pour m'avoir initié au début de ma thèse et à David NGUYEN, Christophe, Sylvain, Mehdi et Sandra.

Mes remerciements s'adressent également à tous mes amis de la Tunisie et de Toulouse.

Enfin, j'aurais une pensée particulière pour toute ma famille qui depuis Cotonou (BENIN) n'a ménagé aucun effort pour me soutenir au cours de ma formation. Qu'elle en soit ici très chaleureusement remerciée.

TABLE DES MATIÈRE

Introduction générale	1
Chapitre I: Nanoparticules pour l'imagerie et la thérapie médicale	5
I.1. Les différentes nanoparticules	8
I.1.1. Définition des nanoparticules.....	8
I.1.2. Différents types de nanoparticules.....	8
I.1.2.1. Les liposomes.....	9
I.1.2.2. Les polymères.....	9
I.1.2.3. Les nanoparticules lipidiques.....	10
I.1.2.4. Les nano-émulsions.....	10
I.1.2.5. Les micelles.....	10
I.1.2.6. Les quantum dots.....	11
I.1.2.7. Les nanoparticules d'or.....	11
I.1.2.8. Les nanoparticules d'oxyde de fer.....	12
I.1.2.9. Les nanoplateformes de carbone.....	12
I.1.2.10. Les nanoparticules d'oxyde/ oxysulfure de lanthanide.....	13
I.1.2.11. Les nanoparticules de silice.....	14
I.1.3. Les systèmes de délivrance de médicaments nanoparticulaires.....	15
I.1.3.1. Nanoparticules multifonctionnelles, principe général.....	17
I.1.3.2. Ciblage passif.....	18
I.1.3.3. Ciblage actif.....	18
I.1.3.4. Destruction interne par IR ou champ magnétique.....	19
I.2. Intérêt des nanoparticules pour la médecine	19
I.2.1. Avantages des nanoparticules.....	19
I.2.2. Applications des nanoparticules.....	19
I.3. Conclusion	20
Chapitre II : L'imagerie médicale	21
II.1. Les différentes techniques d'imagerie médicale	24
II.1.1. Rayons X.....	24
II.1.2. Ultrasons.....	25
II.1.3. Imagerie par Résonance Magnétique.....	26
II.1.4. Imagerie nucléaire.....	27
II.1.5. Imagerie de fluorescence.....	28
II.1.6. Imagerie multimodale.....	29
II.2. Conclusion	29

Chapitre III : Synthèse et caractérisation de nanoparticules luminescentes	31
III.1. Synthèse et caractérisations des NPs luminescentes à base de Ln₂O₃ (Ln = Gd, Dy et Ho)	34
III.1. 1. Synthèse et caractérisations des NPs de Gd ₂ O ₃ : Eu ³⁺	35
III.1.1.1. Principe et méthode.....	35
III.1.1.2. Résultats et discussions.....	36
III.1.1.2.1. Caractérisations.....	36
III.1.1.2.2. Contrôle de la taille des particules.....	38
III.1.1.2.3. Propriétés optiques des particules.....	42
III.1. 2. Synthèse et caractérisations des NPs de Ho ₂ O ₃ : Eu ³⁺ et Dy ₂ O ₃ : Eu ³⁺	44
III.1. 3. NPs à base de Ln ₂ O ₃ (Ln = Gd, Dy et Ho) pour l' « upconversion » :	45
III.1.3.1. Le phénomène d' « upconversion ».....	46
III.1.3.2. Émission des NPs de Gd ₂ O ₃ : Er ; Yb.....	52
III.1.3.2.1. Sous excitation NIR.....	52
III.1.3.2.2. Sous excitation UV.....	55
III.1.3.3. Émission des NPs de Ln ₂ O ₃ (Ln = Dy et Ho): Er ; Yb.....	56
III.1.3.4. Conclusion.....	57
III.2. Synthèse et caractérisations des NPs luminescentes à base de Ln₂O₂S (Ln = Gd, Dy et Ho)	57
III.2.1. Structure cristalline des oxysulfures de lanthanides Ln ₂ O ₂ S.....	57
III.2.2. Synthèse et caractérisation des NPs de Gd ₂ O ₂ S :Eu ³⁺	58
III.2.2.1. Principe et méthode.....	58
III.2.2.2. Résultats et discussions.....	60
III.2.3. Synthèse et caractérisation des NPs de Ho ₂ O ₂ S :Eu ³⁺ et Dy ₂ O ₂ S :Eu ³⁺	65
III.2.4. Synthèse et caractérisation des NPs à base de Gd ₂ O ₂ S pour l' « up-conversion » : Gd ₂ O ₂ S: Er ; Yb.....	66
III.2.4.1. Sous excitation NIR.....	66
III.2.4.2. Sous excitation UV.....	68
III.2.5. Émission des NPs de Ln ₂ O ₂ S (Ln = Ho, Dy):Er ; Yb	69
III.3. Conclusion	70
Chapitre IV : Fonctionnalisation de surface	71
IV.1. Rappel bibliographique	74
IV.2. Revêtement des NPs par une couche de silice aminée ou mésoporeuse	76
IV.1.1. Principe et méthode.....	76

IV.1.2. Résultats et discussions.....	77
IV.3. Revêtement des NPs par une couche de silice mésoporeuse.....	81
IV.2.1. Principe et méthode.....	81
IV.2.2. Résultats et discussions.....	82
IV.4. Conclusion.....	84
<u>Chapitre V : Applications biomédicales.....</u>	85
V.1. Étude de la cytotoxicité des NPs et imagerie de fluorescence.....	88
V.1.1. Principe et méthode.....	88
V.1.2. Résultats et discussions.....	89
V.1.3. Conclusion.....	91
V.2. Greffage de molécules biologiques à la surface des NPs.....	91
V.2.1. Greffage de la streptavidine.....	92
V.2.1.1. Principe et méthode.....	93
V.2.1.2. Résultats et discussions.....	94
V.2.1.3. Conclusion.....	96
V.2.2. Greffage d'anticorps à la surface des NPs pour détection d' <i>Escherichia coli</i>	96
V.2.2.1. Principe et méthode.....	97
V.2.2.1.1. Greffage de la protéine A sur les NPs de $Gd_2O_3:Eu^{3+}@SiO_2$ -APTMS.....	98
V.2.2.1.2. Conjugaison des NPs avec l'anticorps IgG1.....	99
V.2.2.1.3. Immuno-essais et imagerie de fluorescence.....	100
V.2.2.2. Résultats et discussions.....	101
V.2.2.3. Conclusion.....	104
V.3. Utilisation des NPs à base de lanthanides (Gd, Ho et Dy) comme agents de contraste pour l'Imagerie par Résonance Magnétique (IRM).....	104
V.3.1. Étude des propriétés relaxométriques des suspensions aqueuses de Ln_2O_3 et Ln_2O_3S ($Ln= Gd^{3+}, Ho^{3+}$ et Dy^{3+}).....	104
V.3.1.1. Principe et méthode.....	105
V.3.1.2. Résultats et discussions.....	106
V.3.1.3. Conclusion.....	113
V.3.2. L'IRM sur des fantômes par résonance magnétique.....	113

TABLE DES MATIERES

V.4. Utilisation des NPs de $Gd_2O_2S:Eu^{3+}$ comme agent de contraste en tomographie par rayons X.....	115
V.5. Conclusion.....	119
Conclusion générale et perspectives	121
Annexes.....	125
Références bibliographiques.....	139

INTRODUCTION GENERALE

Le progrès de la médecine n'est pas seulement le produit de notre plus grande compréhension des processus biologiques, mais il est aussi dû à la manière dont la technologie permet de diffuser et d'exploiter les résultats trouvés.

La nanomédecine est l'utilisation médicale des nanostructures pour le diagnostic et le traitement des maladies. En diagnostic, les nanostructures sont utilisables tant pour le diagnostic *in vivo* que pour le diagnostic *in vitro*. *In vitro*, les nanoparticules (NPs) et les dispositifs de manipulation ou de détection permettent la reconnaissance, la capture et la l'accumulation des biomolécules alors qu'*in vivo* ces NPs sont utilisées comme agent de contraste pour l'imagerie. Il y a alors une forte demande, pour le développement des agents d'imagerie multimodale de haute performance avec des méthodes de synthèse simples. En thérapie, ces NPs sont utilisées pour la vectorisation ou la délivrance de certains médicaments.

C'est dans ce contexte que nous proposons au cours de ces travaux de thèse, de développer de véritables « ***nanoplateformes hybrides multimodales pour l'imagerie médicale*** ». Pour cela, ces NPs développées doivent être biocompatibles. Elles doivent également avoir la propriété d'être stables à température ambiante, et avoir un comportement *in vivo* leur permettant d'échapper aux défenses immunitaires de l'organisme et rendant possible le ciblage d'une population cellulaire donnée. En vue de son application à l'échelle industrielle, le procédé de fabrication de ces NPs doit en outre être simple et avoir un faible coût de revient.

Dans une première partie, nous présenterons brièvement les différentes NPs existantes ainsi que leur intérêt pour l'imagerie et la thérapie médicale (Chapitre I). Nous nous intéresserons ensuite aux différentes techniques d'imagerie médicale, et plus particulièrement à l'imagerie de fluorescence *in vitro*, l'imagerie par résonance magnétique et à la tomographie par rayons X (Chapitre II).

La seconde partie sera ensuite consacrée à la synthèse et à la caractérisation des NPs luminescentes (Chapitre III). Ensuite, la surface de ces NPs sera modifiée chimiquement (Chapitre IV).

La troisième et dernière partie présentera l'utilisation des NPs pour différentes applications biomédicales (Chapitre V). Dans un premier temps, une étude de la cytotoxicité et de l'internalisation des NPs sera effectuée. Ensuite, des biomolécules seront greffées à la surface de ces NPs pour la reconnaissance de cibles ou marqueurs biologiques définis. Enfin, les différentes applications (imagerie de fluorescence, imagerie par résonance magnétique et la tomographie par rayons X) seront explorées.

CHAPITRE I :
NANOPARTICULES POUR
L'IMAGERIE ET LA
THERAPIE MEDICALE

CONTENU

I.1. LES DIFFERENTES NANOPARTICULES	8
I.1.1. Définition des nanoparticules.....	8
I.1.2. Différents types de nanoparticules.....	8
I.1.2.1. Les liposomes.....	9
I.1.2.2. Les polymères.....	9
I.1.2.3. Les nanoparticules lipidiques.....	10
I.1.2.4. Les nano-émulsions.....	10
I.1.2.5. Les micelles.....	10
I.1.2.6. Les quantum dots.....	11
I.1.2.7. Les nanoparticules d'or.....	11
I.1.2.8. Les nanoparticules d'oxyde de fer.....	12
I.1.2.9. Les nanoplateformes de carbone.....	12
I.1.2.10. Les nanoparticules d'oxyde/ oxysulfure de lanthanide.....	13
I.1.2.11. Les nanoparticules de silice.....	14
I.1.3. Les systèmes de délivrance de médicaments nanoparticulaires.....	15
I.1.3.1. Nanoparticules multifonctionelles, principe général.....	17
I.1.3.2. Ciblage passif.....	18
I.1.3.3. Ciblage actif.....	18
I.1.3.4. Destruction interne par IR ou champ magnétique.....	19
 I.2. INTERET DES NANOPARTICULES POUR LA MEDECINE	 19
I.2.1. Avantages des nanoparticules.....	19
I.2.2. Applications des nanoparticules.....	19
 I.3. CONCLUSION	 20

L'application médicale des nanotechnologies : la nanomédecine, se situe à l'interface de trois grandes disciplines (la biologie, la physique, et la chimie). Ce nouveau domaine est en pleine effervescence. Les nanoparticules (NPs) véhiculant un agent de contraste ou délivrant sélectivement un principe actif dans les cellules cibles incarnent la version moderne des « magic bullets » imaginée au début du XXème siècle par le médecin allemand Paul Ehrlich.²

Après avoir donné une définition des NPs, nous présenterons les principaux types et différentes générations de NPs, leurs avantages ainsi que les applications envisagées pour la médecine. Enfin, nous présenterons des exemples de NPs approuvées pour un usage clinique thérapeutique ou diagnostique.

I.1. LES DIFFERENTES NANOPARTICULES

I.1.1. Définition des nanoparticules

En octobre 2011, la commission de l'union européenne a défini un nanomatériau comme « un matériau dont les constituants principaux ont des dimensions comprises entre 1 et 100 nm ».³ Une NP est alors un assemblage d'atomes, formant un objet dont au moins une dimension est comprise entre 1 et 100 nm.

La figure I.1 compare les nanostructures avec les objets connus dans la vie quotidienne.

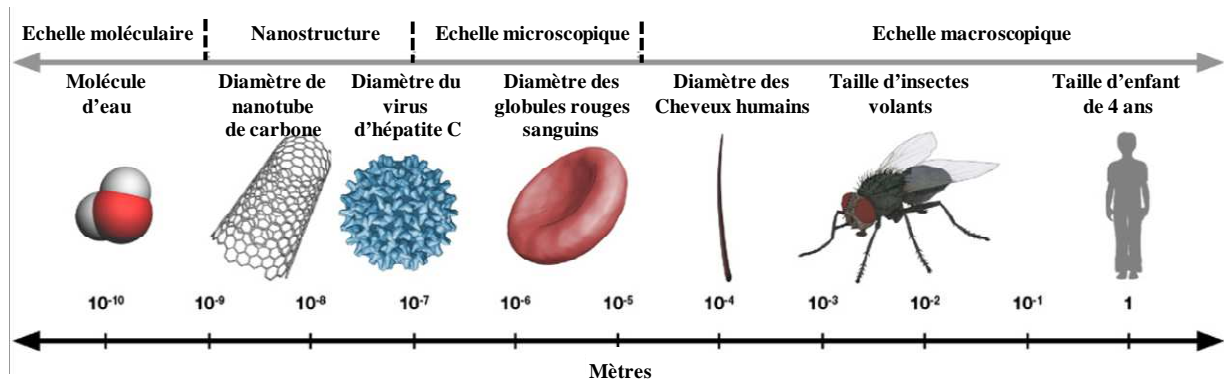


Figure I.1: Gamme de tailles des nanostructures comparée à celles des principaux objets connus.

I.1.2. Différents types de nanoparticules

Il existe une grande variété de NPs allant des particules d'or aux liposomes, en passant par les NPs polymériques. Si le choix du cœur des particules est primordial en ce qui concerne

la protection et l'éventuel relargage des agents d'intérêt, le contrôle de la surface l'est tout autant. Ce sont en effet ses propriétés de surface qui permettront à la particule de véhiculer les agents thérapeutiques ou de diagnostic vers la zone ciblée. Le cœur de ces NPs est généralement composé d'assemblages organiques ou inorganiques.⁴ Nous allons décrire ici les NPs les plus courantes.

I.1.2.1. Les liposomes

Les liposomes ont été utilisés comme vecteurs de médicaments depuis 1965.⁵ Ce sont des vésicules sphériques de quelques dizaines à quelques milliers de nm de diamètre. Ces vésicules sont composées d'une ou de plusieurs bicouches lipidiques qui permet (tent) de séparer un milieu intravésiculaire d'un milieu extérieur.⁶

Ces particules sont depuis de nombreuses années utilisées comme outils pour la biologie, la biochimie, la médecine ainsi que par l'industrie des cosmétiques en tant que transporteurs de principes actifs thérapeutiques ou d'agents d'imagerie.⁷ Leur caractère non toxique et biocompatible fait de ces colloïdes des systèmes intéressants pour les applications *in vivo*. Cependant, les liposomes présentent également quelques limitations : ils ont effectivement montré une faible capacité d'encapsulation (notamment pour les molécules lipophiles piégées dans la double couche de phospholipides), une stabilité modérée, une production délicate, et un relargage précoce des principes actifs hydrophiles dans le sang.⁸

Les niosomes sont des ensembles supramoléculaires similaires aux liposomes, à la différence que les molécules constituant la double couche ne sont pas des phospholipides mais des surfactants de synthèse (lipides non ioniques).⁹ C'est également le cas des polymersomes, pour lesquels des copolymères bloc (comportant une partie hydrophile et une partie hydrophobe) forment la structure emprisonnant le réservoir aqueux.¹⁰

I.1.2.2. Les polymères organiques

Les NPs de polymères, sont synthétisées par des méthodes de polymérisation/polycondensation de polymères biodégradables. Les polymères les plus couramment utilisés sont : le poly(acide lactique) (PLA), poly(acide glycolique) (PGA), poly(lactide-co-glycolide) (PLGA), le chitosane, le poly-epsilon-caprolactone. Ils sont utilisés dans l'industrie alimentaire ou encore dans le domaine de la chirurgie (fils de suture...)¹¹ Les polymères peuvent être également naturels, à base d'albumine¹² ou de gélatine.¹³ Ils peuvent se présenter soit sous la forme de nanosphères constituées de matrice de polymère dans laquelle le principe actif peut être dispersé ou dissous, soit sous la forme de nanocapsules comportant un réservoir dans lequel le principe actif est

protégé par une mince paroi de polymère de quelques dizaines de nanomètres d'épaisseur.¹⁴ Leur taille est généralement inférieure à 300 nm.¹¹ Du polyéthylène glycol (PEG) peut être greffé à leur surface, ils sont souvent utilisés dans le traitement du cancer.

I.1.2.3. Les nanoparticules lipidiques

Les NPs lipidiques ont une place de choix dans leur utilisation comme nanovecteurs de principes actifs.¹⁴ En effet, les lipides rentrent dans la composition de la membrane plasmique. Ils sont également synthétisables par émulsion et peuvent se présenter sous la forme de nanocapsules ou nanosphères.¹⁴ Dans les deux cas, ils peuvent présenter un cœur aqueux ou huileux, ce qui leur permet de transporter des principes actifs de propriétés physico-chimiques variées (hydrophiles, hydrophobes ou encore amphiphiles). De la même manière que pour les liposomes, à leur surface, des agents dispersants (de type PEG par exemple) et des ligands (anticorps, peptides, acide folique...) peuvent être greffés pour acquérir respectivement un caractère « furtif » et un ciblage spécifique vers les cellules cibles.

I.1.2.4. Les nano-émulsions

Les nano-émulsions sont obtenues par dispersion d'un mélange de phases huile/eau. Les gouttelettes de phases dispersées sont transparentes ou translucides et de taille nanométrique (20-200 nm). Elles sont stabilisées par un film à surface active composé de surfactant ou de co-surfactant.^{15,16,17} Les nano-émulsions sont beaucoup utilisées en formulations pharmaceutiques car elles se forment spontanément (facile à préparer), sont optiquement transparentes, et thermodynamiquement stables. Grâce à leur petite taille, elles permettent d'éviter le crémage ou la sédimentation qui peut avoir lieu lors du stockage ou coalescence des gouttelettes.

I.1.2.5. Les micelles

Les nano-émulsions et les phases micellaires peuvent apparaître similaires du point de vue composition et taille structurale, mais il convient de noter que les phases micellaires se forment par auto-assemblage thermodynamique alors que les nano-émulsions ne se forment pas spontanément. En effet, dans le cas des nano-émulsions, la formation de gouttelettes nécessite l'application d'un cisaillement externe. La structure des micelles est du type cœur-coquille (« core-shell » en anglais) en milieu aqueux. Les micelles se forment lorsque la concentration en surfactants dans le milieu dépasse une valeur seuil nommée concentration micellaire critique. Les micelles sont donc des systèmes supramoléculaires qui sont en équilibre avec les molécules amphiphiles en solution. Selon le surfactant utilisé, on distingue différents types : micelles à base de phospholipides ou de surfactants pegylés,

micelles à base de copolymères (pluronic, (L) acide polyaminés, polyesters). Les micelles polymériques sont fortement stables *in vitro* et *in vivo*, biocompatibles et ont fait récemment l'objet de quelques essais cliniques.¹⁸

I.1.2.6. Les quantum dots

Les « quantum dots » (QDs) sont des nano-cristaux colloïdaux semi-conducteurs de taille allant de 2 à 8 nm.¹⁹ Les QDs sont dotés de propriétés électroniques et optiques uniques de part leur taille et leur composition.²⁰ Ils peuvent être : administrés par injection, excitables *in vivo* à des longueurs d'onde variant avec le milieu chimique local et sont détectables grâce à leur fluorescence par une caméra CCD (charge coupled device).²¹ Leur surface peut être modifiée pour améliorer leur solubilité, sensibilité, spécificité et leur visualisation en ciblage tissulaire.¹⁸

Ces QDs révèlent néanmoins des inconvénients : leur luminescence est « aléatoire », elle disparaît et réapparaît. On parle de phénomène de scintillement ou « photobleaching » en anglais. De plus, la durée de vie de luminescence est faible de l'ordre de 20 ns, ce qui n'est pas adapté pour des observations de longue durée.²² Les études préliminaires révèlent qu'ils sont toxiques à cause de la présence d'éléments toxiques qui rentrent dans leur composition (Cd, ...).²³ Enfin, les modes d'élimination naturelle de ces composés demeurent méconnus.

I.1.2.7. Les nanoparticules d'or

L'avancée rapide des nanotechnologies observée durant cette dernière décennie a permis le développement de différents types de NPs d'or fonctionnalisées pour des applications en thérapie photo-thermique, imagerie moléculaire, bio-détection et en thérapie génétique.^{24, 25} Les propriétés : optique et photo-thermique de ces NPs dépendent de leur taille en raison de l'oscillation collective des électrons de surface.²⁶

L'intensité d'absorption et de diffusion des NPs d'or est significativement plus élevée que celle de la plupart des colorants absorbants et diffusants organiques²⁷, ce qui les rend excellentes comme candidates d'agent de contraste en imagerie. Les interactions électron-phonon et phonon-phonon dans ces nanoparticules génèrent de la chaleur après une exposition dans le proche infrarouge (NIR : 650-900 nm)²⁸.

Les nanobilles, nanocapsules et nanobâtonnets d'or^{29, 30, 31}, synthétisés en utilisant une grande variété de réactifs par des méthodes de synthèse chimiques^{32, 33, 34} et électrochimiques^{35, 36} ; absorbent dans la région NIR . Ces NPs couplées à l'imagerie ont été largement utilisées pour la destruction thermique des tumeurs.

I.1.2.8. Les nanoparticules d'oxyde de fer

Les NPs d'oxyde de fer superparamagnétiques désignées par le terme SPIO (Super Paramagnetic Iron Oxide) possèdent des propriétés magnétiques uniques qui font d'elles des matériaux avancés candidats pour la biomédecine. Elles peuvent servir d'agents de contraste pour l'IRM, de « points chauds » locaux capables de tuer les cellules malignes et de transporteurs colloïdaux lors de la vectorisation de médicaments ou du diagnostic^{37, 38, 39}. La propriété des SPIOs provient du fort moment magnétique qu'ils acquièrent en présence d'un champ magnétique externe. Leur moment magnétique élevé engendre un fort contraste en imagerie IRM. En plus de posséder d'excellentes propriétés magnétiques, les SPIOs sont biocompatibles et biodégradables ; donc non toxiques. Au cours de la dégradation, les ions Fe libres n'augmentent pas sensiblement la teneur en fer contenu dans le corps et s'incorporent naturellement dans l'hémoglobine. Ils sont alors dégradés par des voies normales de recyclage du fer.⁴⁰

Les SPIOs sont généralement synthétisés par co-précipitation de suspensions alcalines de $\text{Fe}(\text{OH})_2$ et $\text{Fe}(\text{OH})_3$.⁴¹ La taille des particules peut varier entre quelques nanomètres et plusieurs centaines nanomètres de diamètre.⁴² Pour accroître leur stabilité, leur demi-vie de circulation et leur biocompatibilité, diverses méthodes ont été utilisées pour fonctionnaliser les NPs de SPIO avec un revêtement de polymères inertes, comme le dextran,⁴³ des polysaccharides,⁴⁴ le polyéthylène glycol (PEG) et l'oxyde de polyéthylène (PEO).⁴⁵

I.1.2.9. Les nanoplateformes de carbone

On distingue principalement les fullerènes, les nanotubes de carbone (NTC) et les nanodiamants.

Les fullerènes sont une famille de composés du carbone dont l'existence a été prédite en 1970 et officiellement prouvée en 1985.^{46, 47} La forme la plus connue est le fullerène C_{60} . Les fullerènes peuvent prendre une forme géométrique rappelant celle d'une sphère, d'un ellipsoïde, d'un tube ou d'un anneau. Grâce à leurs caractéristiques physiques, chimiques, propriétés électriques et optiques, les fullerènes et leurs dérivés sont incorporés dans des nouveaux dispositifs ou matériaux.^{48, 49} Les fullerènes peuvent jouer le rôle de radio-protecteur. En effet, ils permettent la protection contre les dommages causés par irradiation aux rayons X (7 Gy) *in vitro* et *in vivo* chez la souris, en réduisant la formation d'espèces réactives de l'oxygène.⁵⁰ Des études se poursuivent sur l'augmentation de la solubilité des fullerènes et leur toxicité.⁵¹

Les nanotubes de carbone (NTC) sont des feuilles de graphène cylindriques. Les NTC peuvent être utilisés pour l'ablation des cellules cancéreuses par hyperthermie en raison de leur forte absorption optique dans la région du NIR, ainsi que pour la vectorisation de médicaments vers les cellules cancéreuses en raison de leur grande surface spécifique. On distingue : les NTC mono paroi désignés

par le terme SWCNT (Single Wall Carbone Nano Tube) dont le diamètre est compris entre 1 et 3 nm et la longueur comprise entre 5 et 30 nm, des NTC multi parois désignés par le terme MWCNT (Multi Wall Carbone Nano Tube) de diamètre compris entre 10 et 150 nm et de longueur allant de 200 nm à quelques micromètres.⁵²

Les Nanodiamants (ND) sont des agents très intéressants pour des applications en biologie et en médecine en raison de leur plus grande biocompatibilité par rapport à d'autres nanomatériaux de carbone, leur photo-stabilité, la facilité de purification, la disponibilité commerciale et de leur faible cytotoxicité.⁵³ Ils peuvent être fonctionnalisés et conjugués à une grande variété de molécules pour le marquage cellulaire et la vectorisation de médicaments, ce qui leur confère un potentiel important d'applications thérapeutiques et de diagnostic.⁵⁴

I.1.2.10. Les nanoparticules d'oxyde/oxysulfure de lanthanides

Les NPs à base de lanthanides et plus particulièrement les oxydes et oxysulfures de lanthanides dopés ou non avec des éléments tels que (Eu^{3+} , Tb^{3+} , Yb^{3+} , Er^{3+} , Tm^{3+} , ...) ont connu un essor remarquable dans leur développement au cours de cette dernière décennie.

Les NPs de Gd_2O_3 dopées ou non sont généralement synthétisées par co-précipitation,^{55, 56} spray pyrolyse,⁵⁷ et par réaction en phase solide⁵⁸ avec des tailles comprises entre 2 et 500 nm selon la méthode utilisée. La surface de ces NPs peut être facilement modifiée par greffage de molécules biologiques pour des applications en bio-détection.^{56, 57} Les NPs de Gd_2O_3 trouvent également un grand intérêt pour l'IRM grâce au pouvoir contrastant du gadolinium.

Huang et *al.*⁵⁹ ont synthétisé par voie sol-gel des NPs creuses, poreuses, superparamagnétiques et paramagnétiques de Gd_2O_3 de taille inférieure à 200 nm. Lorsque la surface des NPs creuses de Gd_2O_3 est recouverte par un film de carbone, ces NPs qui avaient des propriétés paramagnétiques deviennent superparamagnétiques. Un fort pouvoir contrastant a été aussi observé lors des essais effectués *in vivo* en IRM. Une bonne biocompatibilité et viabilité cellulaire de ces NPs ont été également prouvées.

Récemment, Park et *al.*⁶⁰ ont rapporté que les NPs de Gd_2O_3 et $\text{Gd}(\text{OH})_3$ peuvent être utilisées comme agent de contraste positif en IRM en raison de la forte contribution du Gd^{3+} à la valeur de relaxivité longitudinale mesurée. Il a été également démontré que les NPs de Gd_2O_3 de tailles inférieures à 100 nm et revêtues d'une couronne de SiO_2 sont actives en IRM. Une bonne viabilité avec des cellules normales ainsi qu'une accumulation sélective dans les cellules tumorales ont été prouvées. Ces nanoparticules multifonctionnelles sont également utilisables pour la thérapie par capture de neutrons : la curie thérapie.⁶¹

Lechevallier et *al.*⁶² ont aussi montré la possibilité d'utiliser les NPs de Gd_2O_3 : Eu^{3+} , et $\text{Gd}(\text{OH})\text{CO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$: Eu^{3+} (160 nm de diamètre) comme bio-marqueurs. Ces NPs synthétisées par

coprécipitation, sont facilement internalisées dans des cellules cancéreuses (cellules Hela) et sont fortement luminescentes en microscopie confocale.

Das et *al.*⁶³ ont synthétisé des nanocristaux de $\text{Dy}_2\text{O}_3:\text{Tb}^{3+}$ ayant 3 nm de diamètre pour être utilisés comme nanocristaux bimodaux pour l'IRM et l'imagerie optique. Il a été montré que ces nanocristaux sont d'excellents agents de contraste T2 à 7T pour l'IRM aussi bien dans un fantôme (mélange eau-gel d'agarose à 1% mass en gel d'agarose) que pour la visualisation de cellules tumorales de la souris. Ces nanocristaux sont également non cytotoxiques jusqu'à 1 mg/mL et fluorescent bien en microscopie confocale à fluorescence.

Les NPs d'oxysulfure de lanthanides ont aussi fait l'objet de plusieurs études. En effet, Tian et *al.*⁶⁴ ont montré que les NPs de $\text{Gd}_2\text{O}_2\text{S}:\text{Tb}^{3+}$ agglomérées et non sphériques synthétisées par précipitation suivie d'une sulfuration sont utilisables comme luminophores, aussi bien sous excitation UV-visible qu'en excitation par rayons X. Ces résultats ont été confortés par les travaux de Xing et *al.*⁶⁵ qui ont également synthétisé des NPs de $\text{Gd}_2\text{O}_2\text{S}:\text{Tb}^{3+}$, sphériques et de diamètre ≈ 120 nm par précipitation suivie d'une sulfuration. Ces NPs sont d'excellents luminophores aussi bien sous excitation UV-visible qu'en excitation par rayons X. D'autres parts, ces mêmes auteurs ont montré que les NPs de $\text{Y}_2\text{O}_2\text{S}:\text{Yb}$, Ho , synthétisées par la méthode précitée, sont utilisables en « up-conversion ». En effet, elles émettent de la lumière verte sous excitation laser (980 nm) et l'intensité d'émission est significativement supérieure à celle de $\text{NaYF}_4:\text{Yb}$, Er habituellement utilisé en « up-conversion ». Ce qui offre la possibilité d'utiliser ces NPs comme marqueurs biologiques excitables dans l'IR.⁶⁶

Très récemment, Abliz et *al.*⁶⁷ ont montré par leurs travaux, la possibilité d'utiliser les microparticules (diamètre ≈ 20 μm) de $\text{Gd}_2\text{O}_2\text{S}:\text{Tb}^{3+}$ pour le diagnostic en thérapie photodynamique par activation clinique par rayons X. La PDT classique permet d'activer directement l'agent photosensibilisant par la lumière. Mais cette méthode présente des limites du fait de la faible profondeur de pénétration de la lumière (2 à 5 mm) dans les tissus et ne peut s'appliquer qu'aux tumeurs de surface telles que les mélanomes. Une nouvelle méthode non invasive basée sur l'utilisation des rayons X pour activer indirectement un agent photosensibilisant: la Photofrine II, a été proposée. A l'intérieur du corps, le photosensibilisateur (Photofrine) s'accumule préférentiellement dans la tumeur. Sous excitation par RX, les particules de $\text{Gd}_2\text{O}_2\text{S}:\text{Tb}^{3+}$ émettent de la lumière dans le visible, laquelle lumière permet d'activer le photosensibilisateur. Lors de cette activation par absorption de photons émis par $\text{Gd}_2\text{O}_2\text{S}:\text{Tb}^{3+}$, il y a génération d'oxygène singulet $^1\text{O}_2$ cytotoxique dans la tumeur. Les résultats montrent une réduction dramatique ($\approx 90\%$) de la viabilité des cellules du glioblastome humain lorsqu'elles sont traitées avec les particules et la Photofrine II.

I.1.2.11. Les nanoparticules de silice

Les autres types de NPs qui sont en cours de développement sont les nanoparticules de silice. Les NPs de SiO_2 sont synthétisées par le procédé sol-gel.⁶⁸ Leur taille est généralement inférieure à 50

nm. Celles-ci sont rendues luminescentes en incorporant dans leur matrice des terres rares, typiquement de l'euporium trivalent (Eu^{3+}). En effet l'ion Eu^{3+} introduit dans une matrice minérale, possède une luminescence stable dans le temps. Elles sont facilement modifiables, chimiquement et biologiquement par des agents détecteurs. Elles sont généralement utilisées en imagerie par fluorescence et comme agent vecteur de médicaments et de gènes. ^{69, 70, 71}

I.1.3. Les systèmes de délivrance de médicaments nanoparticulaires

La plupart des pathologies sont traitées grâce à l'utilisation de médicaments. Certains de ces médicaments sont composés de molécules chimiques alors que d'autres sont constitués de molécules biologiques. Cependant, l'utilisation des médicaments génère souvent certains effets secondaires. L'amélioration des systèmes d'administration et plus particulièrement l'injection directe des médicaments est une procédure qui cherche à être améliorée par l'industrie pharmaceutique et les patients. L'encapsulation des médicaments dans des transporteurs est une possibilité qui a été étudiée durant cette dernière décennie.

Les nanotechnologies offrent des moyens thérapeutiques directs ou sélectifs des cellules ou tissus malades. À court et moyen terme, la principale utilisation des produits nanoparticulaires médicaux est la vectorisation des principes actifs. C'est le cas du Doxil[®] et de l'Abraxane[®] commercialisés sur le marché. ⁷² Le Doxil[®] est un médicament utilisé dans le traitement du cancer ovarien à l'état avancé ou dans le cas de récurrence après à une chimiothérapie. Il peut être aussi utilisé pour traiter les myélomes multiples. Le Doxil[®] est une molécule encapsulée dans un liposome comportant des agents de furtivité afin d'améliorer sa biodistribution ; de telles particules sont appelées liposomes furtifs. L'Abraxane[®] (Baxter Healthcare) est préconisé pour le traitement du cancer du sein. Cette particule est basée sur l'encapsulation de paclitaxel, une molécule anticancéreuse (le Taxol), au sein d'une matrice protéique (albumine) ayant une taille de 130 nm.

Nous distinguons trois générations de vecteurs :

➤ *1^{ère} génération de vecteurs :*

Constituée de nanoparticules sphériques ou capsulaires, c'est la génération la plus connue et la plus accessible. L'intérêt de ces particules réside dans leur capacité à éviter l'excrétion et l'élimination par le système rénal. En effet, l'élimination se fait principalement dans l'organisme par le rein disposant d'un système de fonctionnement basé sur la filtration à travers les pores de quelques nanomètres. Ainsi, lorsque des agents d'intérêt de faible poids moléculaire sont encapsulés au sein de vecteurs colloïdaux d'une dizaine de nanomètres, l'élimination par voie rénale devient impossible. En conséquence, l'effet de ces particules est prolongé. La taille des NPs doit toutefois être suffisamment petite pour qu'elles ne restent pas bloquées dans les plus petits vaisseaux sanguins.

Bien que la taille des NPs leur permette d'éviter de nombreux pièges « géométriques » de l'organisme, elles peuvent être souvent phagocytées par les défenses immunitaires : les macrophages. Il convient alors d'éviter la phagocytose en trompant les défenses immunitaires pour atteindre la zone d'intérêt : on parle alors de furtivité.

➤ *2^{ème} génération de vecteurs :*

Comme nous l'avons évoqué dans le cas de la 1^{ère} génération de vecteurs, les mécanismes naturels de métabolisation et d'élimination limitent grandement l'activité thérapeutique ou de diagnostic des médicaments ou des agents de contraste injectés. Non seulement l'élimination de la substance d'intérêt de la circulation sanguine diminue la dose qui va finalement atteindre les tissus ciblés, mais l'accumulation de cette même substance dans les organes d'élimination ou de séquestration (rein, foie, rate ...) peut également entraîner des effets secondaires toxiques au niveau de ces tissus. Dans le cas de l'utilisation d'agent de contraste, ces accumulations peuvent de plus masquer la zone d'intérêt, et donc perturber et fausser la détection. C'est pourquoi de nouvelles stratégies ont été développées afin d'augmenter la durée de vie des NPs dans le compartiment sanguin. Il s'agit de la modification chimique de la surface des nano-transporteurs. Nous pouvons distinguer les NPs PEGylées ou des NPs revêtues d'une couche de polymère hydrophile servant d'agent de furtivité. Le temps de séjour de ces NPs dans la circulation sanguine peut être suffisamment important pour relarguer lentement un agent thérapeutique dans le sang, ou pour qu'il se produise une accumulation passive au sein des tissus.

Cependant certaines particules telles que les colloïdes furtifs restent longtemps dans le sang et finissent par être extravasées hors du compartiment sanguin. Ainsi, pour faciliter leur accumulation dans un tissu donné, il est indispensable de fonctionnaliser leur surface avec des ligands biologiques qui seront reconnus par les cellules composant le tissu d'intérêt. La 3^{ème} génération de vecteurs fut alors créée.

➤ *3^{ème} génération de vecteurs :*

C'est la combinaison des NPs cœur « core » et une enveloppe « shell » à base de polymère dotée de ligands biologiques biosélectifs comme des anticorps⁷³, des peptides⁷⁴, des saccharides, des oligonucléotides ou d'autres molécules comme l'acide folique.⁷⁵ L'ajout de ces ligands à la surface des nanoparticules favorise généralement leur capture par les macrophages.⁷⁶ C'est pourquoi il est important d'associer aux agents de ciblage des agents de furtivité afin de contrebalancer cet effet. La formation d'une barrière stérique risque toutefois de masquer les ligands et donc de rendre caduque le ciblage actif. La balance entre les deux effets est parfois difficile à régler. Par conséquent, les agents de ciblage sont éloignés du cœur de la NP par un bras espaceur (le plus souvent une chaîne

polyoxyéthylène) de manière à ce qu'ils évoluent à la surface de la couche de furtivité. L'utilisation des bras espaceurs est également avantageuse dans la mesure où elle offre à l'agent de ciblage une plus grande liberté de mouvement favorisant ainsi sa complexation avec la cible. En effet, il a été montré que le greffage de ligands directement à la surface d'une particule entraîne une diminution importante de la vitesse de complexation, la liberté de mouvement du ligand étant fortement réduite par l'inertie de la particule. La flexibilité du bras espaceur permet alors de redonner suffisamment de liberté de mouvement à l'agent de ciblage afin de maximiser les probabilités de rencontre entre le ligand et le récepteur dans la bonne conformation. La figure I.2 illustre l'évolution de ces 3 générations de nanoparticules.

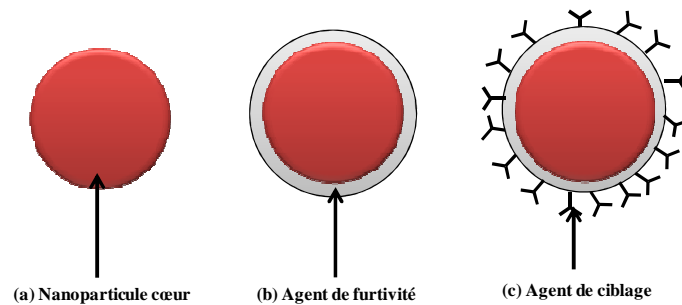


Figure I.2: Schéma illustrant l'évolution des nanoparticules: (a) 1^{ère} génération de vecteurs, (b) 2^{ème} génération de vecteurs et (c) 3^{ème} génération de vecteurs.

I.1.3.1. Nanoparticule multifonctionnelle, principe général

Le concept de NP multifonctionnelle décrit par Ferrari⁷⁷ prend en compte toutes les considérations citées précédemment et est illustré dans la figure I.3.

Une telle NP a la capacité de transporter un ou plusieurs principes actifs, ainsi qu'un agent de contraste permettant son suivi dans l'organisme du patient. La présence d'agents de furtivité à la surface des particules permet d'éviter leur capture par les macrophages et augmente leur temps de circulation dans l'organisme. Les agents d'infiltration permettent de traverser les barrières biologiques (telles que la paroi des vaisseaux sanguins) qui se dressent entre les NPs et la zone ciblée. Enfin, les agents de ciblage (anticorps par exemple) greffés sur la NP autorisent un ciblage actif et favorisent donc l'accumulation dans le tissu cible et/ou l'internalisation par les cellules visées.⁷⁷

La NP constitue alors une plateforme sur laquelle viennent se placer :

- L'agent de furtivité,
- L'agent de ciblage,
- L'agent d'infiltration,
- L'agent de contraste,
- L'agent thérapeutique.

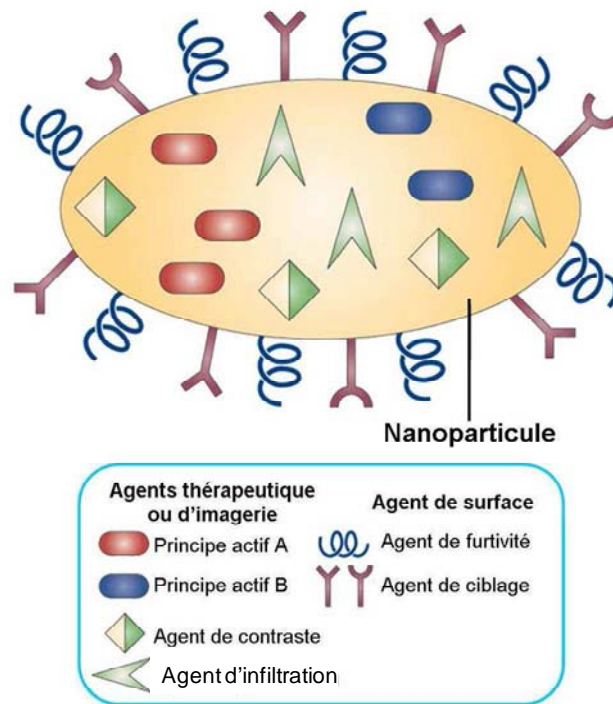


Figure I.3: Nanoparticule multifonctionnelle.⁷⁷

I.1.3.2. Ciblage passif

Il existe plusieurs médicaments à base de nanovecteurs commercialisés utilisant un mode de ciblage passif connu sous le nom de processus à « perméabilité et rétention améliorées ». ⁷⁸ En raison de leur taille et de leurs propriétés de surface, certaines NPs peuvent s'échapper vers les tissus au travers de la paroi des vaisseaux sanguins. ⁷⁹ Les tumeurs cancéreuses ont tendance à avoir un drainage lymphatique et de vaisseaux sanguins plus important et plus perméable que les tissus sains, favorisant ainsi une accumulation de NPs en elles, de manière à concentrer le médicament cytotoxique à l'endroit approprié. Une autre stratégie de ciblage passif utilisée pour le foie, consiste à utiliser des cellules myéloïdes comme les macrophages qui absorbent les NPs et les concentrent dans le site à traiter (le foie) ; comme un cheval de Troie.

I.1.3.3. Ciblage actif

Des molécules spécifiques sont greffées à la surface des NPs permettant ainsi la reconnaissance de récepteurs spécifiques des cellules cancéreuses. Le ciblage actif peut être utilisé pour introduire des médicaments dans les cellules cancéreuses par absorption du nanovecteur par les cellules. La combinaison du ciblage actif et passif permet, de réduire fortement l'interaction des

médicaments transportés avec les tissus sains et d'améliorer l'efficacité de la chimiothérapie tout en utilisant de faibles doses de médicament.

I.1.3.4. Destruction interne par IR ou au champ magnétique

Une fois parvenu aux cellules cancéreuses par ciblage actif, le nanovecteur absorbe le rayonnement Infra rouge appliqué. Il se crée alors un fort réchauffement dans la tumeur cancéreuse suivi d'une destruction sélective des cellules malignes sans endommager les cellules saines. Un tel mode de destruction est également utilisé avec les NPs magnétiques pour détruire les cellules malignes par hyperthermie en utilisant une bobine magnétique à haut champs.

I.2. INTERETS DES NANOPARTICULES POUR LA MEDECINE

I.2.1. Avantages des nanoparticules

L'utilisation des NPs en médecine : la nanomédecine est devenue un domaine très prometteur quant aux différents modes de délivrance des médicaments (« drug delivery » en anglais) et en particulier le développement de thérapies ciblées pour l'oncologie. Transporter des médicaments à l'aide de NPs présente plusieurs avantages tels que :

- La protection des médicaments contre les dégradations dans l'organisme avant d'atteindre leur cible.
- L'amélioration de l'absorption des médicaments dans les tumeurs et les cellules cancéreuses elles-mêmes.
- Le meilleur contrôle de la distribution des médicaments dans les tissus au cours du temps.
- L'absence d'interactions des médicaments avec les cellules saines, évitant ainsi les effets secondaires.

I.2.2. Applications des nanoparticules

Comme nous l'avons détaillé dans les paragraphes précédents, outre la délivrance des médicaments, les NPs peuvent être utilisées en radiothérapie, thermothérapie, thérapie photodynamique et en diagnostic plus particulièrement en imagerie médicale.

- La radiothérapie consiste à détruire des cellules placées à proximité d'une source émettant des rayonnements ionisants. L'intérêt des NPs est alors de véhiculer ou de concentrer les effets ionisants directement au niveau de la zone à traiter.⁸⁰

- La thérapie thermique ou hyperthermie a la même finalité, mais utilise une élévation de la température pour y parvenir. Il s'agit alors de provoquer par un champ extérieur (magnétique ou laser par exemple) un échauffement local grâce à des NPs situées dans la zone à traiter, de manière à ce que l'énergie dissipée soit suffisante pour élever la température de quelques degrés (autour de 45°C) induisant la destruction des cellules^{81,82}.
- La thérapie photodynamique (PDT) est une technique de traitement basée sur l'utilisation de molécules photosensibilisatrices (PS), non cytotoxiques dans l'obscurité, et qui vont être activées par une irradiation lumineuse, de longueur d'onde appropriée (dépendante du PS). L'activation du PS va aboutir à la génération d'espèces fortement cytotoxiques (le plus souvent l'oxygène singulet $^1\text{O}_2$, mais aussi d'autres espèces réactives de l'oxygène) pour les cellules hôtes des PS.⁸³

I.3. Conclusion

Les études effectuées durant cette dernière décennie ont montré un grand intérêt des NPs pour le diagnostic de certaines pathologies et la délivrance des médicaments lors de leur traitement.

Nous pouvons alors énumérer quelques critères souhaitables pour des systèmes destinés à la thérapie et /ou à l'imagerie médicale.

- ✓ Avoir une taille nanométrique allant d'un nanomètre à quelques centaines de nanomètres et une bonne stabilité physico-chimique (franchissement des barrières biologiques, internalisation facile par endocytose dans les cellules cibles).
- ✓ Être biodégradable ou biocompatible.
- ✓ Permettre l'association avec un principe actif pour la thérapie et/ou une sonde (agent de contraste, éléments luminescents, éléments radioactifs) pour le diagnostic ou le ciblage cellulaire.

Dans le chapitre suivant, nous présenterons les différentes techniques d'imagerie médicale et biomédicale, leur principe de fonctionnement, leurs avantages et inconvénients.

CHAPITRE II :
L'IMAGERIE MEDICALE

CONTENU

II.1. LES DIFFERENTES TECHNIQUES D'IMAGERIE.....	24
II.1.1. Rayons X.....	24
II.1.2. Ultrasons.....	25
II.1.3. Imagerie par Résonance Magnétique.....	26
II.1.4. Imagerie nucléaire.....	27
II.1.5. Imagerie de fluorescence.....	28
II.1.6. Imagerie multimodale.....	29
II.2. CONCLUSION.....	29

Dans le chapitre précédent, nous avons montré que, grâce aux récentes avancées les NPs sont utilisées en nanomédecine pour le diagnostic et le traitement de certaines pathologies. L'imagerie médicale est utilisée pour le diagnostic pour des buts cliniques ou scientifiques.

L'imagerie médicale est l'une des méthodes permettant de visualiser les processus biologiques au sein même des organismes vivants, de manière non invasive. Elle est essentielle à la compréhension de leur physiologie et de leurs pathologies afin de mieux les diagnostiquer, les pronostiquer et les soigner. L'imagerie constitue donc un outil d'investigation de choix de plusieurs champs de la médecine et de la biologie. Selon les informations recherchées, nous pouvons classer les différentes techniques d'imageries en deux grandes classes :

- L'imagerie structurelle : permet d'avoir des informations sur l'anatomie des organes (taille, volume, localisation et forme éventuelle d'une lésion).
- L'imagerie fonctionnelle : permet d'avoir des informations sur le fonctionnement des organes (physiologie, métabolisme, ...).

Nous présenterons les différentes techniques d'imagerie médicale et biomédicale, leur principe de fonctionnement, leurs avantages et inconvénients.

II.1. LES DIFFERENTES TECHNIQUES D'IMAGERIE MEDICALE

Les différentes techniques d'imagerie médicale et biomédicale sont dites non invasives et peu traumatisantes. En effet, en dehors de l'injection de traceurs pour certaines modalités, aucun prélèvement (biopsie) ni aucune atteinte des barrières de l'organisme n'est nécessaire à leur mise en œuvre.

Ce sont souvent des rayons électromagnétiques qui sont utilisés pour obtenir les informations désirées, sans effectuer de prélèvements sur l'organisme. Nous avons des rayons gamma dans le cas de l'imagerie nucléaire pour les rayonnements les plus énergétiques, les rayons X, les ultrasons lors des échographies, les ondes radio dans le cas des IRM (en complément d'un champ magnétique constant), et enfin les rayonnements infrarouges dans le cas de l'imagerie de fluorescence *in vivo*.

II.1.1. Rayons X

La possibilité de visualiser les organes internes chez les êtres vivants par l'utilisation des rayons X a été découverte pour la première fois en 1895 par Röntgen.⁸⁴ En effet, Röntgen a démontré par ses premières images en radiographie X qu'il existe une différence de contraste entre l'os, les tissus mous et l'air se trouvant entre ces structures. Cette technique s'est largement développée et continue d'être utilisée jusqu'à nos jours.⁸⁵

Le principe de la technique consiste à placer le sujet entre une source de rayons X (≈ 100 keV) et un détecteur de rayons X. Au cours de l'exposition du corps aux rayons X, chaque constituant de ce dernier absorbe plus ou moins le rayonnement X. La différence d'intensité absorbée qui existe entre les différents tissus constitue ce que l'on appelle le contraste. Ce contraste est d'autant plus fort que le numéro atomique (Z) de l'élément absorbant est élevé.⁸⁶ Le contraste est naturellement produit grâce au calcium ($Z=20$) contenu dans les os. Les agents de contraste les plus couramment utilisés sont l'iode ($Z=53$) ou le baryum ($Z=56$). Les NPs d'or ($Z=79$) sont également proposées comme agent de contraste pour l'imagerie par rayons X. Cependant, ces agents iodés ou nano-particulaires ont un faible pouvoir de contraste ce qui entraîne l'injection de fortes doses lors de leur utilisation.

L'imagerie par rayons X est un type d'imagerie structurelle rapide offrant une bonne résolution des structures de quelques dizaines de micromètres et présentant un fort pouvoir contrastant. Cependant, la technique présente quelques insuffisances dans le cas des organes à faible contraste. Le dispositif est simple, peu onéreux et fournit directement l'image sans autres calculs préalables. Le dispositif expose le sujet aux rayonnements ionisants, et donc ne peut être appliqué comme un outil de diagnostic pour le même sujet que sous des mesures de sécurité adéquates.

II.1.2. Imagerie par ultrasons

La technique d'imagerie la plus connue et employant les ultrasons est l'échographie. Elle est utilisée dans le domaine de la médecine, de la recherche et de l'industrie. Lors de l'exposition de la partie du corps à examiner aux ultrasons, les tissus mous sont transparents mais présentent des interfaces qui permettent de réfléchir différemment les ondes ultrasonores. La résolution spatiale dépend de la fréquence utilisée (généralement entre 5-15 MHz).

Pendant cette dernière décennie, il a été prouvé la possibilité d'utiliser des microbulles (diamètre $< 5\mu\text{m}$) pour l'imagerie par ultrasons.⁸⁷ Ces particules sont généralement des émulsions d'huiles perfluorocarbonées stabilisées par une couche de phospholipides^{88, 89}. Ces huiles possèdent la propriété de dissoudre d'importantes quantités de gaz (elles sont notamment utilisées pour produire le sang artificiel). Ces microbulles sont fortement échogènes en milieu aqueux puisque la différence de densité entre le gaz contenu dans les microbulles et les tissus environnants est grande.

Pour des raisons physiques, les NPs n'ont aucun rôle dans cette technique. En effet, les fréquences permettant la détection des particules de taille inférieure à $1\mu\text{m}$ excèdent 30 MHz ce qui ne permet qu'une profondeur de pénétration de quelques millimètres dans les tissus vivants.

Le plus gros avantage de cette technique est qu'elle est relativement bon marché, ne nécessite pas d'équipement lourd, est portable. L'utilisation des ultrasons est sans danger c'est pour cela que ce type d'imagerie est utilisé pour imager le fœtus.

II.1.3. Imagerie par résonance magnétique (IRM)

L'imagerie par résonance magnétique est un outil puissant non invasif d'imagerie médicale. L'IRM est très utilisée pour : diagnostiquer précocement le cancer, contrôler des implants, imager le fonctionnement du cerveau et la vascularisation de certains organes.

Le principe de la technique est basé sur la Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) combinée avec la relaxation des protons de l'eau dans un champ magnétique. Lorsque des noyaux (^1H de l'eau, composés organiques) possédant des spins non appariés sont soumis à un fort champ magnétique, il se produit un alignement parallèle ou antiparallèle des spins.⁹⁰ Au cours de cet alignement, les spins précessent à une fréquence spécifique appelée fréquence de Lamor (figure II.1. a). A la résonance, les protons absorbent d'énergie et s'excitent à l'état antiparallèle. Ensuite, il se produit une relaxation des spins excités vers l'état initial. Il existe deux temps de relaxation : temps de relaxation longitudinale T1 et temps de relaxation transversale T2 (figure II.1.c, d).

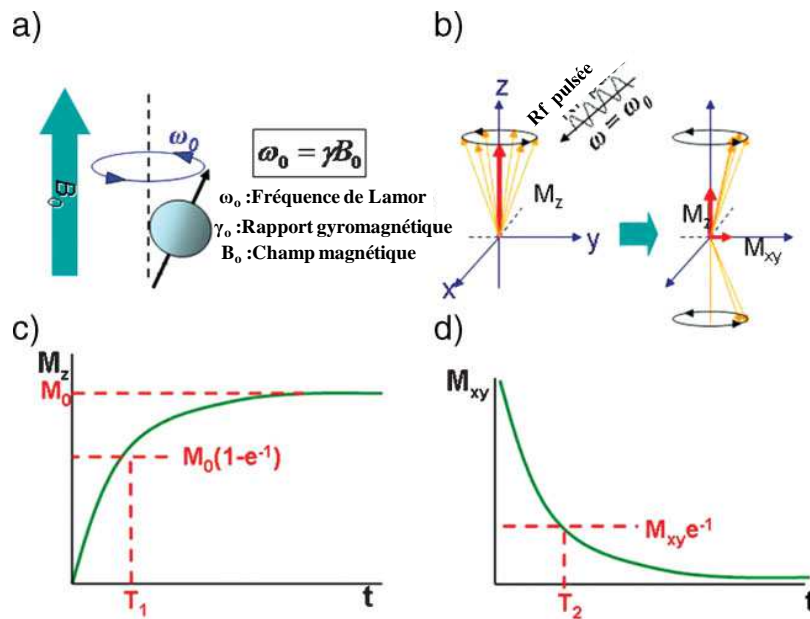


Figure II.1. Principe de l'IRM : a) alignement parallèle ou antiparallèle de spins dans un champ magnétique et précession à la fréquence de Lamor ω_0 ; b) changement de la magnétisation des spins – relaxation des spins excités ; c) temps de relaxation longitudinale T1 ; d) temps de relaxation transversale T2.⁹¹

Selon ces différents processus de relaxation, les agents de contraste sont classés en agents de contraste T1 ou T2.

Les agents de contraste T1 dits agents de contraste positif sont généralement des composés paramagnétiques contenant les ions métalliques tels que : Mn^{2+} , Mn^{3+} , Fe^{3+} et Gd^{3+} . Le Gd^{3+} est plus

fréquemment utilisé du fait de ses 7 électrons célibataires et de son long temps de relaxation.^{92, 93} En dehors du Gd^{3+} , seul le Mn^{2+} est approuvé en imagerie clinique et connu sous le nom de Mn-dipyridoxyldiphosphate $[Mn(DPDP)]^{4-}$. Certains complexes de gadolinium sont disponibles dans le commerce. C'est le cas de : DTPA (diethylenetriaminepentaacetic acid) appelé Magnevist®, DOTA (1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7,10-tetraacetic acid) appelé Dotarem®, et DPDP (dipyridoxyldiphosphate) appelé Teslascan®. Les doses cliniques recommandées pour ces complexes sont de l'ordre de 1 g de Gd dans un corps de 70 kg.⁹⁴

Les agents de contraste T2 dits agents de contraste négatif possèdent un court temps de relaxation induisant des images à faible contraste. Ils sont généralement des composés superparamagnétiques de fer. Les NPs d'oxyde de fer approuvées en imagerie clinique sont connues sous le nom de Feridex IV® et Resovist® utilisés pour imager le foie ; et GastroMARK® pour imager le côlon.⁹⁴

Lors d'une imagerie clinique, ce sont les protons de l'eau contenue dans les tissus qui sont observés.⁹⁵ Afin de renforcer la différence de contraste entre les tissus, il est important d'ajuster les vitesses de relaxation longitudinale ($1/T1$) et transversale ($1/T2$) de l'eau dans les tissus. Pour ce faire, il existe un nombre illimité de séquences pulsées, ce qui garantit la possibilité de variation des paramètres de numérisation lors de l'IRM et par conséquent une grande liberté pour choisir le meilleur contraste selon la composition, l'emplacement et l'environnement des tissus.

L'IRM est une technique qui utilise un rayonnement non ionisant, permet d'avoir une forte résolution spatiale (25-100 μm), temporelle et un bon contraste des tissus mous.⁹⁶ La technique n'est pas limitée et peut fournir des informations sur le fonctionnement de certains organes.⁹⁷ Elle est également utilisée pour le diagnostic des maladies⁹⁸ et le suivi dans la délivrance de certains médicaments.⁹⁹

II.1.4. Imagerie nucléaire

L'imagerie nucléaire est une technique d'imagerie utilisée en médecine nucléaire. Elle est basée sur la désintégration des éléments radioactifs contenus dans des sondes radionucléides injectées au patient afin d'avoir des images sur la structure et la fonction de l'intérieur du corps. Les différents types d'imagerie nucléaire utilisés actuellement sont classés en deux catégories :

- La tomographie à émission de positrons (TEP ou PET en anglais « Positron Emission Tomography »).
- Tomographie d'émission monophotonique (TEMP ou SPECT en anglais « Single Positron Emission Computed Tomography »).

Ces deux technologies permettent de détecter des rayons γ émis par les radionucléides dans les tissus vivants. Les radio-traceurs peuvent être détectés rapidement et en temps réel. La technologie TEP est conçue pour détecter indirectement les isotopes émetteurs de positron β^+ quand ils rencontrent

les tissus alors que la TEMP détecte directement les rayons γ de faible énergie émis lors de la désintégration des radio-traceurs.¹⁰⁰

Les agents de contraste les plus utilisés en TEP sont des éléments radioactifs tels que le fluor (^{18}F , demi-vie $T_{1/2} = 110$ min), le cuivre (^{64}Cu , demi-vie $T_{1/2} = 12,2$ h) et l'iode (^{124}I , demi-vie $T_{1/2} = 4,2$ jours) alors qu'en TEMP ceux utilisés sont le technétium ($^{99\text{m}}\text{Tc}$, demi-vie $T_{1/2} = 6$ h), l'iode (^{123}I , demi-vie $T_{1/2} = 13,2$ h) et l'indium (^{111}In , demi-vie $T_{1/2} = 2,8$ jours).¹⁰⁰

La tomographie TEP a une grande sensibilité, une bonne résolution temporelle comparativement à la TEMP et à l'IRM. Sa résolution spatiale est meilleure que celle de la TEMP bien qu'étant inférieure à celle de l'IRM, l'échographie et de l'imagerie de fluorescence.

En plus des risques liés à l'exposition des rayonnements, l'un des inconvénients de la TEP est la nécessité d'avoir une source cyclotron pour produire les isotopes. Les isotopes de la TEMP ont des demi-vies relativement longues et sont accessibles. Un autre défi auquel la TEP est confrontée est la difficulté de couplage chimique entre radionucléides et protéines ou avec les nanoparticules. Récemment, une approche a été proposée par l'introduction de la chimie dite « click chemistry » et l'utilisation de molécules conjuguées.¹⁰¹

II.1.5. Imagerie de fluorescence

L'imagerie de fluorescence est une méthode d'imagerie très puissante utilisée chez les petits animaux en raison de sa sensibilité, de la rapidité d'acquisition et du temps de traitement du signal. Cela permet ainsi une imagerie en temps réel.

L'imagerie par fluorescence *in vivo*, utilise des fluorophores émettant dans le domaine du visible (450-650 nm), mais reste limitée en raison de l'absorption importante, de la diffusion des photons émis et de l'auto-fluorescence des tissus. Elle utilise aussi des fluorophores émettant dans le proche infrarouge (650-900 nm) avec une plus grande sensibilité due à une meilleure transmission et détection de la lumière émise dans un domaine de concentration allant du 10^{-12} à 10^{-15} M.¹⁰²

Bien qu'il existe plusieurs systèmes d'imagerie optique conçus pour la souris dans le NIR, la grande limitation de cette technique chez l'homme réside dans la limitation de la profondeur de pénétration du signal de photons émis. La tomographie 3D de fluorescence moléculaire et la microscopie intravitale sont explorées pour l'étude des processus moléculaires chez les animaux. La microscopie intravitale est très sensible dans une petite zone pour l'imagerie moléculaire et les processus cellulaires dans les tissus vivants avec une très bonne résolution (1-10 μm).¹⁰³ Récemment, une nouvelle plateforme d'imagerie installée au département de médecine de Beth (Israël) et basée sur la fluorescence assistée a été conçue pour une acquisition en chirurgie en temps réel dans le NIR pour imager les processus cliniques translationnels.¹⁰⁴ Assurément, ces récents développements cliniques nous ont beaucoup intéressés car ils offrent des possibilités d'applications très importantes pour les NPs que nous avons développées au cours de cette thèse.

II.1.6. Imagerie multimodale

Les sondes d'imagerie multimodale contiennent généralement deux ou plusieurs composés d'imagerie complémentaires qui permettent leur détection et leur localisation par des technologies d'imagerie complémentaires. En combinant les avantages des différentes techniques d'imagerie, les NPs ont le potentiel multimodal pour s'affranchir des limitations de sensibilité et de résolution qu'une approche d'imagerie unique pourrait avoir.

Les avantages de ces sondes, ainsi que leurs limites ont récemment été étudiés.¹⁰¹ L'utilisation de plusieurs modalités d'imagerie est souvent nécessaire pour des sondes moléculaires qui sont généralement considérées comme des sondes confinant fortement la lumière et désignées par le terme anglais «hot spots». Avec peu d'informations sur la localisation anatomique précise et la physiologie de l'organe, la quantification de la concentration de la sonde *in vivo*, dans une région définie ou un volume d'intérêt reste un défi. Les techniques d'imagerie TEP et TEMP combinées avec la tomodensitométrie (TDM) offrent la possibilité d'intégrer des images TEP/TEMP avec une haute sensibilité et résolution. Il a également été démontré que l'intégration de la TEP et l'IRM permet d'avoir une bonne résolution spatiale en IRM et une haute sensibilité en TEP.¹⁰⁵

Au cours de ces dernières années, plusieurs groupes ont mis en évidence le potentiel des sondes multimodales en combinant l'IRM/TEP¹⁰⁶, l'IRM et la fluorescence¹⁰⁷ et l'IRM/TEP et la fluorescence¹⁰⁸ pour l'imagerie *in vivo* des zones inflammées.

I.2. CONCLUSION

Nous avons mis en exergue l'importance de l'imagerie médicale dans le diagnostic et la compréhension de certaines pathologies. Les différentes modalités d'imagerie (IRM, échographie, imagerie nucléaire) employant des sondes nanoparticulaires sont aussi bien applicables chez les animaux que chez l'homme. Cependant, il convient de noter qu'actuellement, seuls les animaux font l'objet d'études en imagerie optique. Mais, les récents développements laissent augurer un passage sur l'homme dans les prochaines années notamment en chirurgie assistée par imagerie NIR (proche Infra rouge).

L'IRM est dotée d'une forte résolution, n'a pas de limite et permet de diagnostiquer précocement des pathologies ou de suivre la délivrance de certains médicaments dans le corps. L'imagerie de fluorescence quant à elle, possède une forte sensibilité, est rapide, facile à mettre en œuvre, moins chère et est utilisée dans la compréhension de la biodistribution des NPs et de leur comportement *in vivo*. L'association des deux modalités d'imagerie permet de tirer profit de leurs avantages.

La tomodensitométrie est l'une des méthodes d'imagerie médicale les plus utilisées dans les hôpitaux en raison de son faible coût, son efficacité et de sa disponibilité.

En prenant en compte toutes ces considérations, il nous a semblé judicieux de nous intéresser aux NPs d'oxyde et d'oxysulfure de lanthanides (Gd_2O_3 , Gd_2O_2S , Dy_2O_3 , Dy_2O_2S , Ho_2O_3 et Ho_2O_2S) dopés avec un centre luminescent (Eu^{3+} , Yb^{3+} , Er^{3+} ...). En effet, la durée de vie de luminescence de ces NPs est beaucoup plus longue (quelques millisecondes) que celle des autres luminophores (QDs et colorants organiques) permettant ainsi de s'affranchir de l'autofluorescence des milieux biologiques et du phénomène de photoblanchiment. De plus, elles sont aussi bien excitables en UV-visible, en NIR que par rayons X. Ces NPs possèdent ainsi un fort potentiel pour le marquage cellulaire.

L'ion Gd^{3+} possède des longs temps de relaxation électronique ce qui influe sur les temps de relaxation T1 et T2.¹⁰⁹ Alors que les ions Ho^{3+} et Dy^{3+} sont caractérisés par de courts temps de relaxation électronique ce qui influe leur temps de relaxation T2.¹¹⁰ Ces composés paramagnétiques ont tous de forts potentiels pour être utilisés comme agent de contraste pour l'IRM.

Notre premier objectif a été de synthétiser, à partir de sels de nitrates de ces terres rares, puis caractériser des NPs de Gd_2O_3 , Gd_2O_2S , Dy_2O_3 , Dy_2O_2S , Ho_2O_3 et Ho_2O_2S dopés par des terres rares (Eu^{3+} , Er^{3+} , Yb^{3+}).

Le deuxième objectif a été de greffer à la surface de ces NPs un groupe fonctionnel (silice aminée ou silice mésoporeuse) pour la rendre plus réactive. Ensuite, des molécules biologiques ont été greffées pour servir de clé de reconnaissance biologique. Pour mieux comprendre l'interaction de ces nanoplateformes avec les milieux biologiques, des tests de cytotoxicité et d'imagerie cellulaire *in vitro* ont été effectués.

Le 3^{ème} objectif de ce travail a été d'utiliser nos nanoplateformes versatiles synthétisées pour associer ces deux techniques d'imagerie (l'IRM et l'imagerie de fluorescence). Nous explorerons également les possibilités d'utilisation de nos particules en tomographie X.

*CHAPITRE III : SYNTHÈSE ET
CARACTÉRISATIONS DE
NANOPARTICULES
LUMINESCENTES*

CONTENU

III.1. Synthèse et caractérisations des NPs luminescentes à base de Ln_2O_3 ($\text{Ln} = \text{Gd}, \text{Dy}$ et Ho).	34
III.1. 1. Synthèse et caractérisations des NPs de $\text{Gd}_2\text{O}_3 : \text{Eu}^{3+}$	35
III.1.1.1. Principe et méthode	35
III.1.1.2. Résultats et discussions	36
III.1.1.2.1. Caractérisations	36
III.1.1.2.2. Contrôle de la taille des particules	38
III.1.1.2.3. Propriétés optiques des particules	42
III.1. 2. Synthèse et caractérisations des NPs de $\text{Ho}_2\text{O}_3 : \text{Eu}^{3+}$ et $\text{Dy}_2\text{O}_3 : \text{Eu}^{3+}$	44
III.1. 3. NPs à base de Ln_2O_3 ($\text{Ln} = \text{Gd}, \text{Dy}$ et Ho) pour l' « upconversion »	45
III.1.3.1. Le phénomène d' « upconversion »	46
III.1.3.2. Émission des NPs de $\text{Gd}_2\text{O}_3 : \text{Er} ; \text{Yb}$	52
III.1.3.2.1. Sous excitation NIR	52
III.1.3.2.2. Sous excitation UV	55
III.1.3.3. Émission des NPs de Ln_2O_3 ($\text{Ln} = \text{Dy}$ et Ho): $\text{Er} ; \text{Yb}$	56
III.1.3.4. Conclusion	57
III.2. Synthèse et caractérisation des NPs luminescentes à base de $\text{Ln}_2\text{O}_2\text{S}$ ($\text{Ln} = \text{Gd}, \text{Dy}$ et Ho).	57
III.2.1. Structure cristalline des oxysulfures de lanthanides $\text{Ln}_2\text{O}_2\text{S}$	57
III.2.2. Synthèse et caractérisation des NPs de $\text{Gd}_2\text{O}_2\text{S} : \text{Eu}^{3+}$	58
III.2.2.1. Principe et méthode	58
III.2.2.2. Résultats et discussions	60
III.2.3. Synthèse et caractérisation des NPs de $\text{Ho}_2\text{O}_2\text{S} : \text{Eu}^{3+}$ et $\text{Dy}_2\text{O}_2\text{S} : \text{Eu}^{3+}$	65
III.2.4. Synthèse et caractérisation des NPs à base de $\text{Gd}_2\text{O}_2\text{S}$ pour l' « upconversion » : $\text{Gd}_2\text{O}_2\text{S} : \text{Er} ; \text{Yb}$	66
III.2.4.1. Sous excitation NIR	66
III.2.4.2. Sous excitation UV	68
III.2.5. Émission des NPs de $\text{Ln}_2\text{O}_2\text{S}$ ($\text{Ln} = \text{Ho}, \text{Dy}$): $\text{Er} ; \text{Yb}$	69
III.3. Conclusion	70

Dans ce chapitre, nous décrivons le protocole de synthèse de NPs de Gd_2O_3 , Ho_2O_3 , Dy_2O_3 , Gd_2O_2S , Ho_2O_2S et Dy_2O_2S dopées avec un centre luminescent ainsi que leurs caractérisations. Une étude bibliographique complémentaire au chapitre I sera présentée pour chaque catégorie de NPs. Ensuite, les résultats obtenus seront présentés et discutés.

III.1. Synthèse et caractérisations des NPs luminescentes à base de Ln_2O_3 ($Ln = Gd, Dy$ et Ho)

Comme nous l'avons évoqué dans le chapitre I, la synthèse de NPs destinées à des applications en imagerie et thérapie médicale impose le contrôle de nombreuses caractéristiques physico-chimiques telles que la structure cristalline et la morphologie des particules. Les procédés de chimie douce permettant de préserver la texture, la morphologie et la structure sont, par conséquent, bien adaptés pour l'élaboration de ces NPs.¹¹¹ L'homogénéité des particules obtenues, le contrôle des différentes étapes de germination et de croissance des cristallites issus du liquide sont les principaux avantages de ces procédés de synthèse.

Dans la littérature, il existe plusieurs méthodes dites de chimie douce permettant l'élaboration de NPs d'oxyde de lanthanides. Nous pouvons énumérer les réactions sol-gel¹¹², les synthèses par combustion¹¹³, les réactions chimiques en micro-émulsion¹¹⁴ ou encore les synthèses par voie polyol.¹¹⁵ La formation de particules sphériques de taille sub-micronique, à partir d'une solution aqueuse de sels de Ln^{3+} à température modérée (600-700°C) par spray pyrolyse a été développée par plusieurs groupes de recherche, dont le nôtre.¹¹⁶ Après un traitement thermique à 1000°C, des microparticules sphériques d'oxyde cubique cristallisé ont été obtenues. Il faut également ajouter la méthode de coprécipitation basée sur la précipitation en phase aqueuse d'hydroxyde suivie d'un séchage. Par des traitements thermiques appropriés et contrôlés, les particules sont ensuite décomposées en oxyde de lanthanides luminescent. Selon les conditions d'élaboration, la morphologie (taille et forme) de l'hydroxyde et par conséquent celle de l'oxyde change. Ainsi des nanocristaux de $Y_2O_3:Er^{3+}$ cubiques de dimension 10-45 nm ont été obtenus¹¹⁷ alors que des particules en forme de bâtonnets¹¹⁸ ou de nanotubes¹¹⁹ ont été obtenues par voie hydrothermale. Matijevic et al.⁵⁵ ont rapporté pour la 1^{ère} fois la synthèse de NPs sphériques et monodisperses d'oxyde de lanthanides par la précipitation en milieu aqueux de carbonates de terres rares avec l'urée utilisée comme agent précipitant. Cette méthode a été utilisée récemment par notre équipe pour synthétiser des NPs de $Gd_2O_3:Eu^{3+}$ sphériques et monodisperses de diamètre ≈ 160 nm.⁶²

Compte tenu des critères souhaitables pour des systèmes destinés à la thérapie et /ou à l'imagerie médicale précités au chapitre I, il nous a semblé judicieux d'optimiser cette dernière méthode afin d'avoir des NPs de $Gd_2O_3:Eu^{3+}$ sphériques et monodisperses de diamètre ≤ 100 nm.

III.1. 1. Synthèse et caractérisations des NPs de $Gd_2O_3 : Eu^{3+}$

III.1.1.1. Principe et méthode

Les NPs de $Gd_2O_3 : Eu^{3+}$ sont synthétisées par la méthode dite de coprécipitation rapportée par Matijevic et al.⁵⁵ dont le principe général est présenté dans la figure III.1.

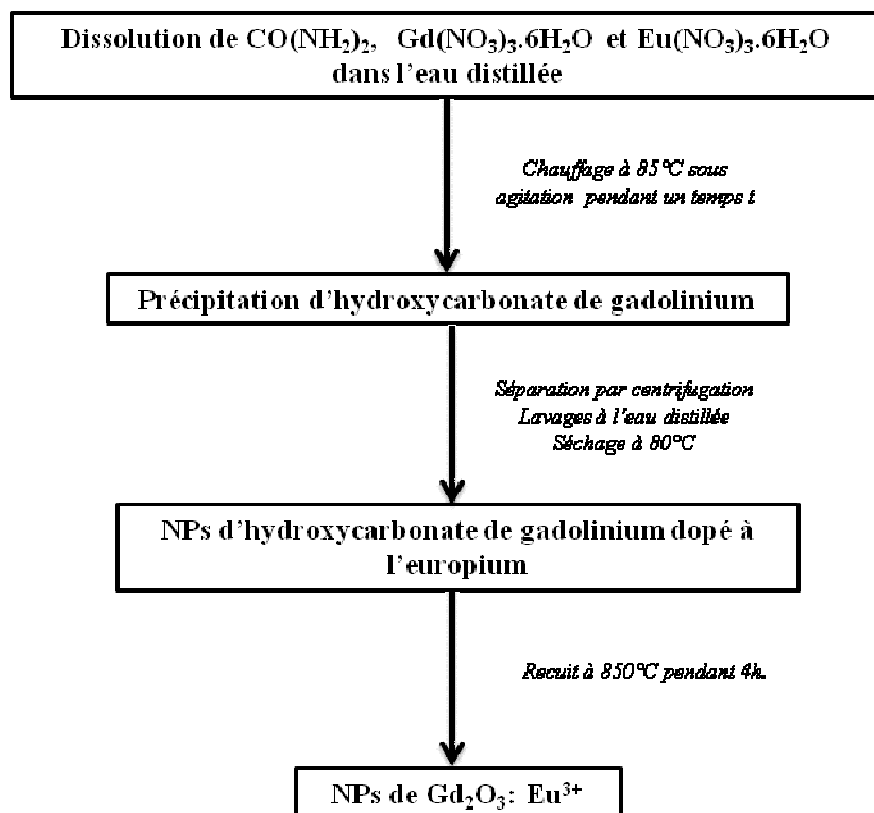
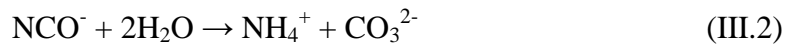
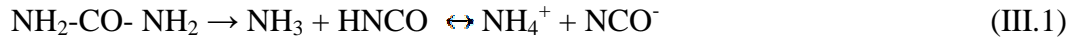


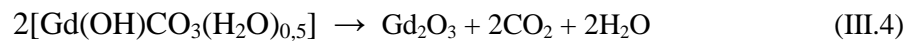
Figure III.1. Schéma représentatif de l'élaboration des NPs de $Gd_2O_3 : Eu^{3+}$.

L'urée et les nitrates de gadolinium et d'euporium sont dissous dans l'eau distillée. Le mélange est chauffé à $85^\circ C$ et agité pendant 110 min et il y a apparition d'un trouble. Les concentrations optimales utilisées sont celles proposées par Matijevic⁵⁵ : $[Gd^{3+}] = 5,6 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ et $[urée] = 0,5 \text{ mol.L}^{-1}$ avec $\frac{[Eu^{3+}]}{([Gd^{3+}] + [Eu^{3+}])} = 5 \text{ mol.}\%$.

Au cours de cette réaction de précipitation, l'agent précipitant (l'urée), se décompose en formant des cyanates d'ammonium (équation (III.1)). Puis en solution neutre, les ions cyanates sont convertis en carbonates d'ammonium (équation (III.2)). Parallèlement, les nitrates de lanthanide sont lentement hydrolysés en milieu aqueux. On peut alors y observer la précipitation de l'hydroxycarbonate de gadolinium (équation (III.3)).



Les NPs d'hydroxycarbonate de gadolinium sont alors séparées par centrifugation (pendant 30 mn à 4500 tr/min), lavées et séchées à 80°C durant une nuit. Ensuite, un recuit sous air à 850°C pendant 4h a été effectué pour obtenir l'oxyde de gadolinium dopé à l'euprimum : $\text{Gd}_2\text{O}_3 : \text{Eu}^{3+}$. La conversion des NPs d'hydroxycarbonate en oxyde se fait selon l'équation de la réaction suivante :



III.1.1.2. Résultats et discussions

III.1.1.2.1. Caractérisations

L'analyse radiocristallographique du précipité séché avant et après recuit nous a permis de tracer les diffractogrammes présentés dans la figure III.2.

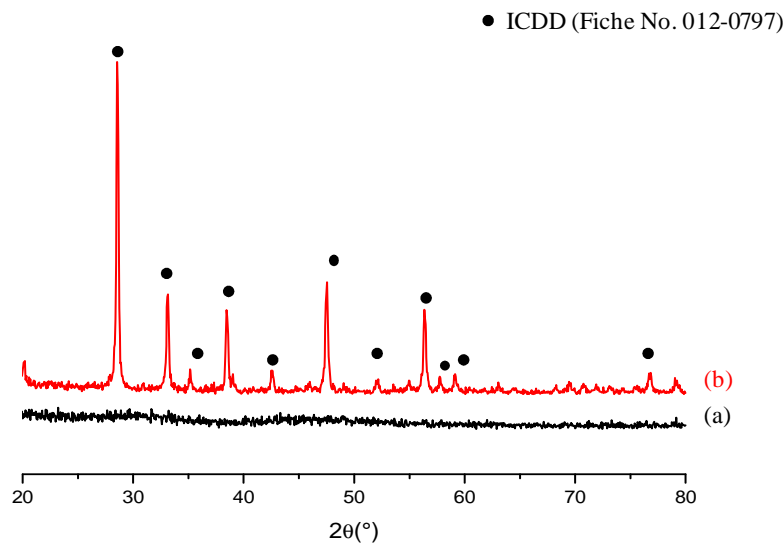


Figure III.2. Diffractogrammes du précipité séché : (a) avant recuit et (b) après recuit sous air à 850°C pendant 4h.

Avant recuit (figure III.2.a), aucune raie de diffraction RX n'a été détectée ; ce qui indique que le composé obtenu après séchage est amorphe. Lorsque la poudre a été recuite sous air à 850°C

pendant 4h (figure III.2.b), le diffractogramme présente des raies fines et bien définies indiquant une bonne cristallisation du composé. L'indexation de ces raies dans la base de données ICDD (International Centre for Diffraction Data) nous a permis d'identifier la fiche No : 012-0797 correspondant à la phase cubique de l'oxyde de gadolinium (C- Gd_2O_3). Ces résultats montrent bien que le composé obtenu après recuit est de l'oxyde de gadolinium.

L'analyse par spectroscopie infrarouge de la poudre séchée avant recuit (figure III.3.a) présente des bandes intenses à : 1404 et 1515 cm^{-1} caractéristiques des modes de vibration des liaisons C—O des carbonates ainsi qu'à 1080 , 842 et 693 cm^{-1} caractéristiques des modes de déformation des liaisons C—O des carbonates. Ce spectre présente également une bande large centrée à 3412 cm^{-1} et un épaulement à 1646 cm^{-1} tous deux attribués aux vibrations des liaisons hydroxyles O—H des molécules d'eau adsorbées à la surface des particules. Ces résultats concordent avec ceux obtenus lors des récents travaux de notre équipe,⁶² ce qui nous a permis de conclure que la phase amorphe obtenue est de l'hydroxycarbonate de gadolinium dopé à l'euporium : $Gd(OH)CO_3 \cdot H_2O : Eu^{3+}$. Après le recuit (figure III.3.b), l'intensité de ces bandes a fortement diminué et il y a apparition de deux nouvelles bandes à 543 et 443 cm^{-1} correspondant respectivement aux elongations asymétrique et symétrique de la liaison Gd—O.¹²⁰ Ces résultats confirment ainsi la transformation de $Gd(OH)CO_3 \cdot H_2O : Eu^{3+}$ en $Gd_2O_3 : Eu^{3+}$.

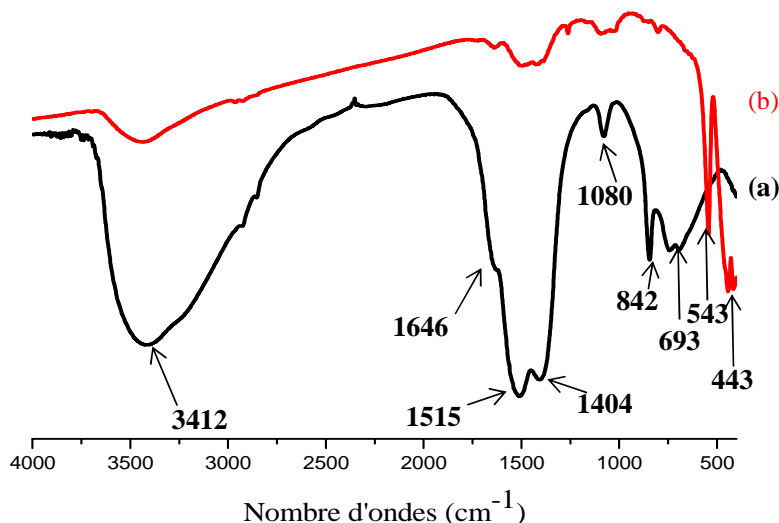


Figure III.3. Spectres IR du précipité séché : (a) avant recuit et (b) après recuit sous air à $850^{\circ}C$ pendant 4h.

Afin d'étudier les caractéristiques morphologiques de nos particules, des observations en microscopie électronique à transmission (MET) ont été effectuées. Les images MET des particules de $Gd_2O_3 : Eu^{3+}$ (figure III.4), montrent des particules sphériques, monodisperses en taille et

nanométriques avec un diamètre moyen de 240 nm (écart type = 10 nm). Ces résultats montrent qu'après le traitement thermique, les particules sont bien denses et ne s'agglomèrent pas.

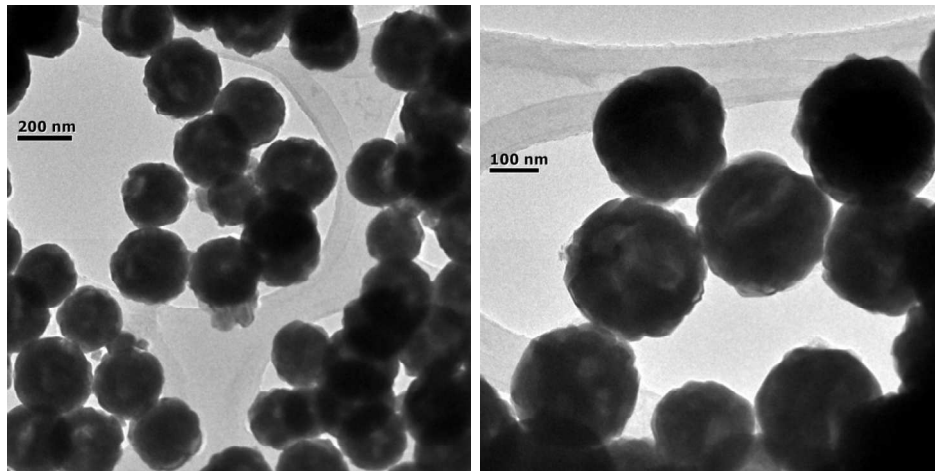


Figure III.4. Images MET des particules de $\text{Gd}_2\text{O}_3:\text{Eu}^{3+}$ obtenues après recuit.

La taille de ces particules étant un peu grande pour les critères souhaitables pour des systèmes destinés à la thérapie et/ou à l'imagerie médicale précités au chapitre I, nous avons étudié quelques paramètres dans le but de diminuer la taille de ces particules tout en conservant leur forme et leurs propriétés. Contrôler la taille de ces particules revient alors à contrôler la réaction de précipitation.

La voie de synthèse choisie étant la coprécipitation, les différents paramètres nécessaires au contrôle de cette réaction sont notamment : la concentration en précurseurs ($[\text{Gd}^{3+}]$, $[\text{urée}]$), la durée et la température de réaction ; puis enfin la nature du solvant utilisé. Des travaux ont été déjà effectués par Matijevic et *al.*⁵⁵ et au sein de notre équipe⁶² sur la cinétique de cette réaction en contrôlant des paramètres tels que la concentration en précurseurs, la durée de réaction sans pour autant diminuer significativement la taille de ces particules. Il nous a semblé alors judicieux d'étudier l'effet de la nature du solvant utilisé et de la durée de la réaction sur la taille de ces particules.

III.1.1.2.2. Contrôle de la taille des particules

Influence de la nature du solvant

La nature du solvant a été changée en remplaçant l'eau par un mélange eau-éthanol (eau-EtOH) dans la méthode d'élaboration de ces particules présentée en III.1.1.1. Pour ce faire, différentes teneurs volumiques en éthanol ont été utilisées et la durée de réaction est fixée à 100 min.

Les résultats obtenus par analyse radiocristallographique et par spectroscopie IR sont identiques, quelle que soit la composition du solvant. Donc ces résultats ne seront pas rapportés ici.

Les images MET des NPs de $\text{Gd}_2\text{O}_3:\text{Eu}^{3+}$ obtenues en fonction de la teneur volumique en éthanol sont présentées dans la figure III.5. Après recuit (850°C , 4 h), les NPs sont bien sphériques, monodisperses en taille et avec un diamètre allant de 240 nm (écart type = 10 nm) pour le solvant contenant 0% vol EtOH à 107 nm (écart type = 9 nm) pour le solvant contenant 20% vol EtOH. Pour des teneurs supérieures à 20% vol EtOH, les particules sont plus petites mais non monodisperses et s'agglomèrent après le recuit.

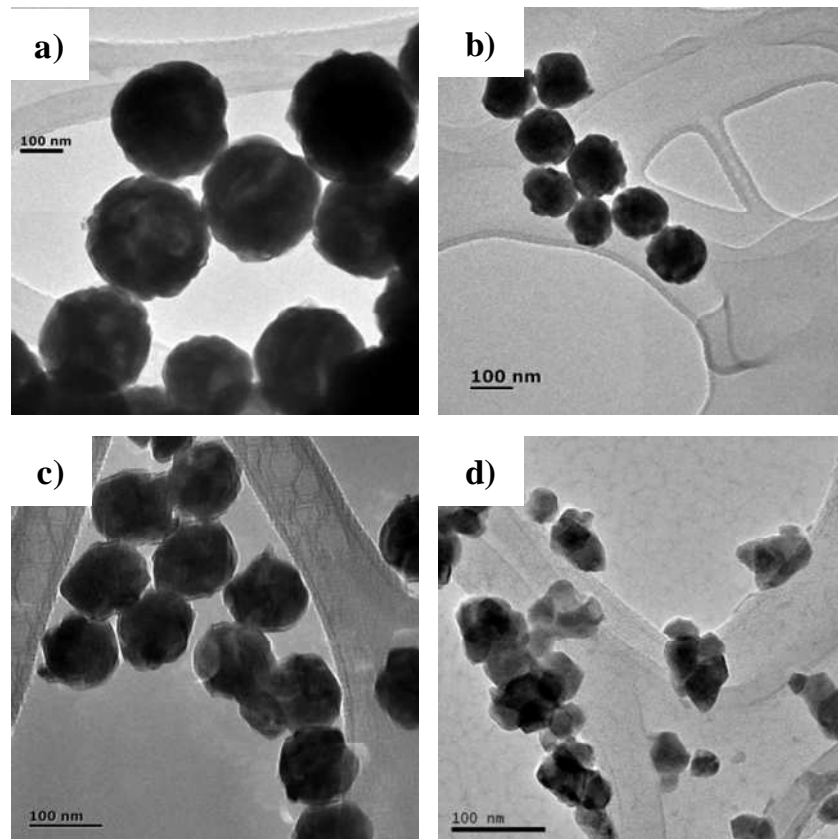


Figure III.5. Images MET des particules de $\text{Gd}_2\text{O}_3:\text{Eu}^{3+}$ obtenues à partir d'eau contenant : a) 0 vol%, b) 10 vol%, c) 20 vol% et d) 30 vol% en EtOH.

Le tableau III.1 présente la relation entre la constante diélectrique du solvant et la taille des NPs de $\text{Gd}_2\text{O}_3:\text{Eu}^{3+}$.

Lorsque la constante diélectrique du solvant diminue de 60,58 à 50,81 ; la taille des particules décroît significativement de 240 à 107 nm. Pour des valeurs de $\xi > 50,81$; la taille des particules est inférieure à 50 nm. Ces résultats concordent avec ceux rapportés par Yoo et *al.*¹²¹ concernant l'influence de la constante diélectrique du solvant sur la taille des particules de carbonate et d'oxyde d'yttrium.

Cette même variation a été récemment rapportée par Gaspar et *al.*¹²² au cours de leurs travaux sur la synthèse des particules de carbonate et d'oxyde de gadolinium dans des mélanges de solvants

tels que : eau-EtOH, et eau-Éthylène glycol. Aussi, ont-ils montré que les ions nitrates issus de la dissolution des précurseurs stabilisent la formation de particules de petite taille.

Tableau III.1. Relation entre de la constante diélectrique ξ du mélange eau-EtOH à 80°C ¹²³ et la tailles des NPs de Gd₂O₃: Eu³⁺.

Eau : EtOH (% , v/v)	Constante diélectrique (ξ)	Diamètre moyen des particules par TEM (nm)	Déviat ion standard (nm)
100 : 0	60,58	240	10
90 : 10	55,70	139	11
80 : 20	50,81	107	9
70 : 30	45,88	<50	—

Évolution de la taille des particules et du pH du milieu réactionnel lors de la précipitation

L'étude de la taille des particules lors de la précipitation d'hydroxycarbonate de gadolinium a été effectuée avec le mélange eau-EtOH (80-20% vol) par DLS (Dynamic Light Scattering). Un prélèvement de 2 mL du mélange a été effectué à des intervalles de temps réguliers et la valeur du pH a été mesurée. La figure III.6 présente l'évolution du diamètre hydrodynamique des particules et du pH au cours du temps.

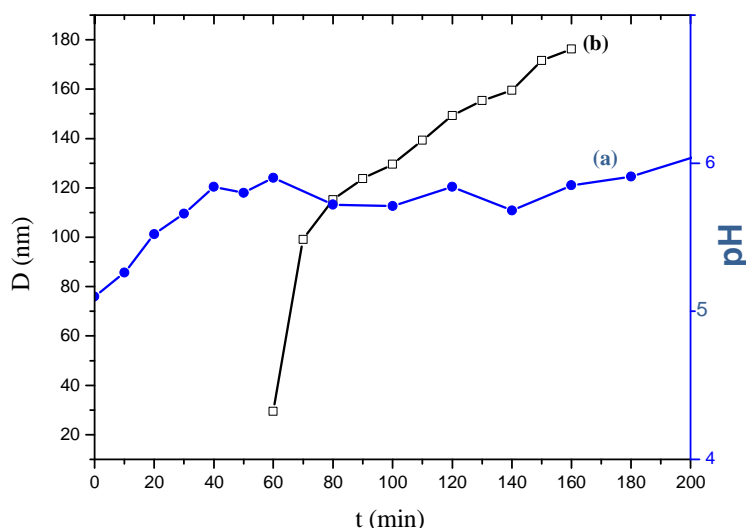


Figure III.6. Graphe montrant l'évolution : (a) du pH et (b) la taille des particules d'hydroxycarbonate de gadolinium au cours du temps.

Au cours de la 1^{ère} heure de réaction, le pH du mélange augmente de 5 à 6 à cause de la décomposition de l'urée qui conduit à la formation de groupes carbonates basiques. Avant pH = 6,

aucune particule n'est détectée en DLS. Après 1h, la concentration en carbonates devient suffisante : il y a précipitation et la taille des particules atteint 30 nm. Lorsque la réaction se poursuit, la taille des particules augmente progressivement à 180 nm alors que la valeur du pH est quasiment constante. Enfin, le pH augmente au-delà de 6 après 200 min.

Etude de l'influence de la durée de réaction sur la taille des particules et le rendement

L'influence de la durée de réaction sur la taille des particules a été aussi étudiée. Pour ce faire, différents temps de réaction ont été utilisés. La poudre obtenue a été recuite à 850°C sous air pendant 4h. Le tableau III.2 résume les différents rendements de réaction calculés par rapport à l'oxyde de gadolinium en fonction de la durée de réaction. Les images MET des particules correspondant à chaque durée de réaction sont présentées sur la figure III.7.

Nous remarquons que la taille des NPs augmente lorsque la durée de réaction augmente. Les NPs restent toujours sphériques lorsque le rendement de réaction est proche de 100% contrairement aux résultats obtenus quand le solvant utilisé est de l'eau pure.⁶²

Les tailles mesurées en MET sont plus petites que celles rapportées en DLS. En effet, la DLS mesure le diamètre hydrodynamique et de plus lors de la transformation de l'hydroxycarbonate en oxyde, la taille des particules décroît. Toutefois, il y a une parfaite concordance entre ces deux séries de mesures effectuées.

En somme, un contrôle approprié des paramètres expérimentaux de la réaction de précipitation nous a permis de préparer des NPs de $Gd_2O_3: Eu^{3+}$ sphériques et bien monodisperses en taille. Dans le but de synthétiser des NPs de taille voisine de 100 nm, les meilleures conditions expérimentales déterminées ici sont : un solvant contenant un mélange eau-EtOH (80% vol-20% vol), une température de réaction égale à 85°C et une durée de réaction de 100 min. Ces conditions nous ont permis de synthétiser des NPs de $Gd_2O_3: Eu^{3+}$ sphériques, monodisperses en taille et de diamètre égal à 107 nm (écart type = 9 nm). Nous utiliserons dans la suite de nos travaux ces conditions expérimentales.

Tableau III.2. Effet de la durée de réaction sur la taille des particules et le rendement.

Durée de réaction (min)	Rendement (%)	Diamètre moyen des particules par TEM (nm)	Déviati on standard (nm)
90	9,6	85	7
100	14,4	107	9
150	41,4	120	5
250	82	130	6

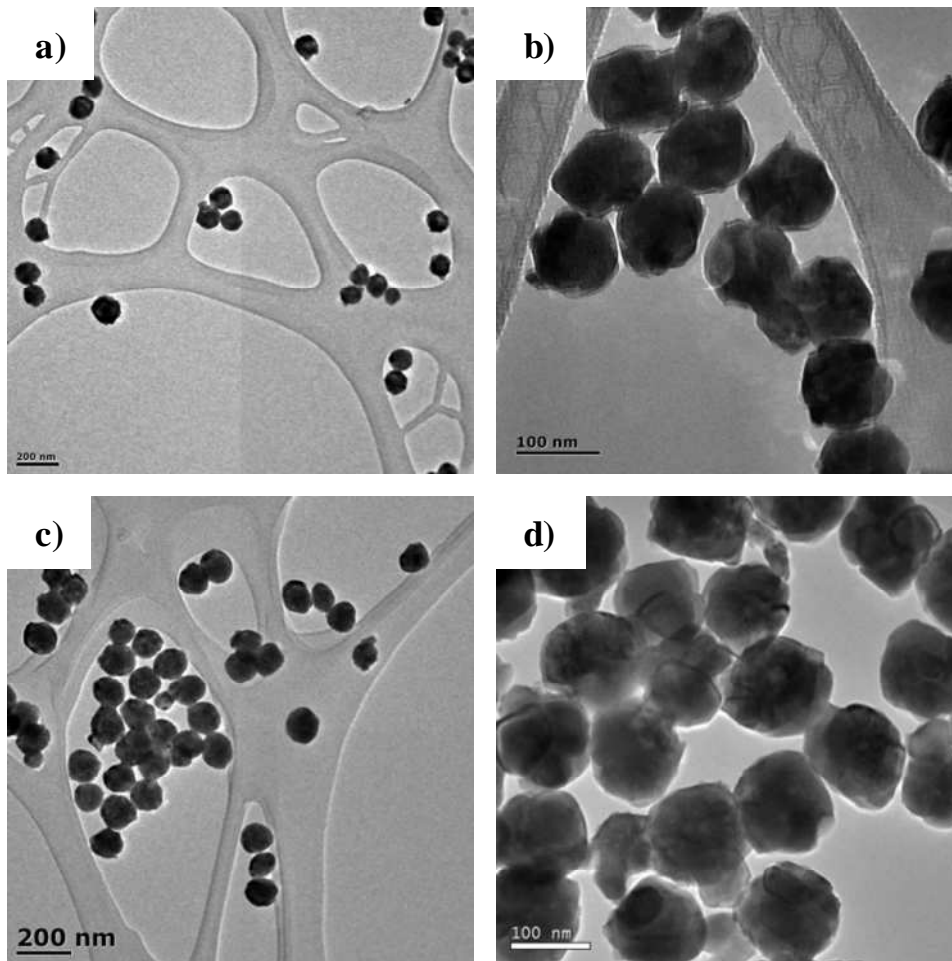


Figure III.7. Images MET des NPs de $\text{Gd}_2\text{O}_3:\text{Eu}^{3+}$ (recuit sous air à 850°C , 4 h) obtenues à partir d'un solvant contenant 20 % vol EtOH après : (a) 90 min, (b) 100 min, (c) 150 min et (d) 250 min de temps de réaction.

III.1.1.2.3. Propriétés optiques des particules

Comme nous l'avons évoqué, l'oxyde de gadolinium dopé à l'euporium a été choisi, entre autres, pour ses propriétés optiques : matrice hôte transparente (gap d'énergie = 5,4 eV), émission intense dans le rouge sous excitation UV. En effet, les ions euporium ont une taille très proche de celle du Gd^{3+} , ce qui leur permet de s'intercaler aisément dans la matrice hôte par substitution aux ions gadolinium (sites C_2 et S_6).

Sous excitation UV, le spectre d'émission du précipité avant recuit (figure III.8.b) montre une luminescence très faible. Cela est dû à la présence de nombreuses liaisons O—H au sein de la matrice diminuant ainsi l'intensité lumineuse (transformation de l'énergie émise en énergie vibratoire).¹²⁴ Après recuit à 850°C , la proportion des liaisons O—H diminue drastiquement, ce qui accroît l'intensité lumineuse. Le spectre d'émission sous excitation à $\lambda = 254 \text{ nm}$ (figure III.8.a) montre les bandes

correspondant aux transitions ${}^5D_0 \rightarrow {}^7F_J$ ($J = 0, 1, 2, 3$ et 4) dont la plus intense est à 612 nm. C'est cette bande qui confère au matériau une luminescence rouge, caractéristique de la transition dipolaire électrique ${}^5D_0 \rightarrow {}^7F_2$ des ions Eu^{3+} en symétrie C_2 , soit les $3/4$ des ions Eu^{3+} . Dans la littérature, plusieurs travaux ont été effectués sur la luminescence de l' Eu^{3+} dans des matrices cubiques telles que $\text{Y}_2\text{O}_3:\text{Eu}^{3+}$, $\text{Gd}_2\text{O}_3:\text{Eu}^{3+}$ et Lu_2O_3 .¹²⁵ Les positions spectrales des raies d'émission sont donc bien connues et la plupart des raies d'émission sont attribuables au site C_2 . Seules deux transitions ${}^5D_0 \rightarrow {}^7F_1$ attribuables au site S_6 sont présentes, mais plus faibles.

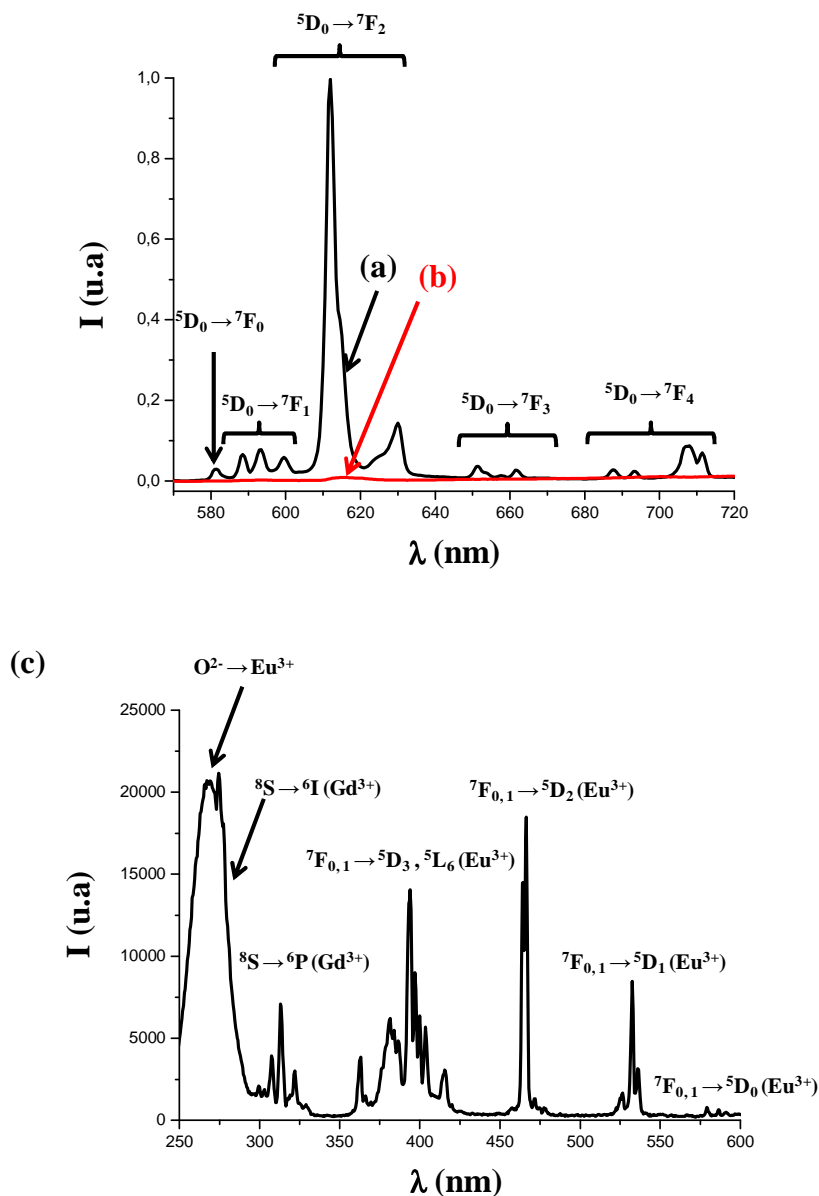


Figure III.8. Spectres d'émission à $\lambda_{\text{exc}} = 254$ nm : (a) $\text{Gd}_2\text{O}_3:\text{Eu}^{3+}$ (recuit sous air à 850°C , 4 h), (b) poudre avant recuit ($\text{Gd}(\text{OH})\text{CO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}:\text{Eu}^{3+}$) et (c) spectre d'excitation de $\text{Gd}_2\text{O}_3:\text{Eu}^{3+}$ observé à 612 nm (recuit sous air à 850°C , 4 h).

Le spectre d'excitation, observé à 612 nm (Figure III.8.b) peut être décomposé en trois zones, correspondant chacune à un mode d'excitation différent. Dans la zone 350-550 nm, ce sont les transitions entre les niveaux 4f de l'ion Eu^{3+} , correspondant à l'excitation directe de l'ion qui apparaissent. Les transitions ${}^7\text{F}_{0,1} \rightarrow {}^5\text{D}_{J=0,1,3}$; ${}^5\text{L}_6$ peuvent être observées. Dans la zone de 250-275 nm, l'émission se fait via l'excitation dans la bande de transfert de charge (CT). Enfin, entre 275 et 340 nm, les fines raies qui apparaissent au pied de la bande de transfert de charge correspondent aux absorptions du gadolinium.

III.1. 2. Synthèse et caractérisations des NPs de $\text{Ho}_2\text{O}_3 : \text{Eu}^{3+}$ et $\text{Dy}_2\text{O}_3 : \text{Eu}^{3+}$

Nous avons dédié ce paragraphe à la synthèse des NPs de $\text{Ho}_2\text{O}_3 : \text{Eu}^{3+}$ et $\text{Dy}_2\text{O}_3 : \text{Eu}^{3+}$. L'holmium et le dysprosium ayant également des propriétés paramagnétiques, nous avons préparé ces matériaux selon la méthode décrite au paragraphe III.1 afin d'évaluer leurs propriétés de luminescence.

Les diffractogrammes RX présentés sur la figure III.9 sont ceux des matériaux préparés. L'indexation de ces raies dans la base de données ICDD, nous a permis d'identifier la fiche No : 044-1268 correspondant à la phase cubique de l'oxyde d'holmium : Ho_2O_3 (figure III.9.a) et la fiche No : 022-0612 correspondant à la phase cubique de l'oxyde de dysprosium : Dy_2O_3 (figure III.9.b).

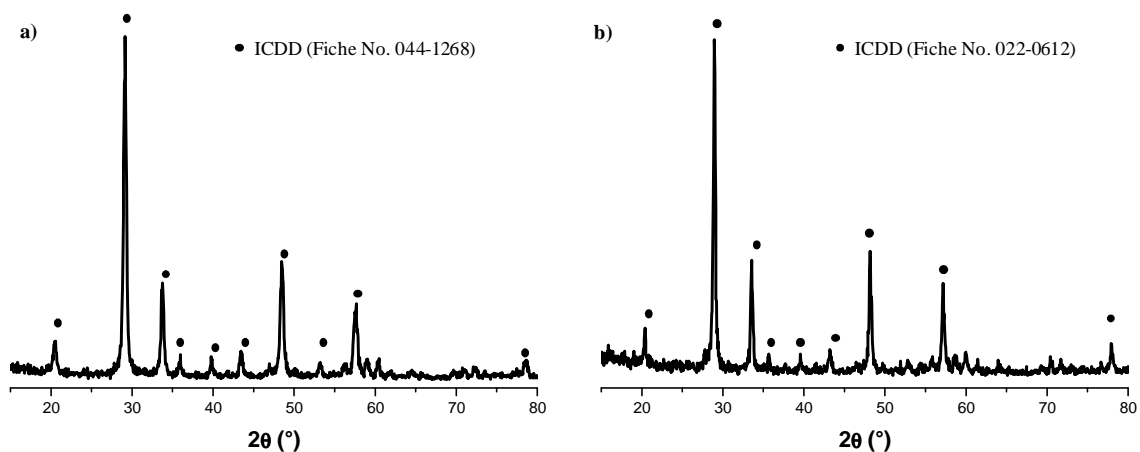


Figure III.9. Diffractogrammes RX des NPs de : (a) $\text{Ho}_2\text{O}_3 : \text{Eu}^{3+}$ et (b) $\text{Dy}_2\text{O}_3 : \text{Eu}^{3+}$ obtenues après recuit sous air à 700°C pendant 4h.

Les images MET des NPs de $\text{Ho}_2\text{O}_3: \text{Eu}^{3+}$ et $\text{Dy}_2\text{O}_3: \text{Eu}^{3+}$ obtenues sont présentées sur la figure III.10. Les particules sont sphériques, monodisperses en taille et de diamètre égal à 51 nm (écart type = 3 nm) pour les NPs de $\text{Ho}_2\text{O}_3: \text{Eu}^{3+}$ (figure III.10.a-b) et 90 nm (écart type = 11 nm) pour les NPs de $\text{Dy}_2\text{O}_3: \text{Eu}^{3+}$ (figure III.10.c-d).

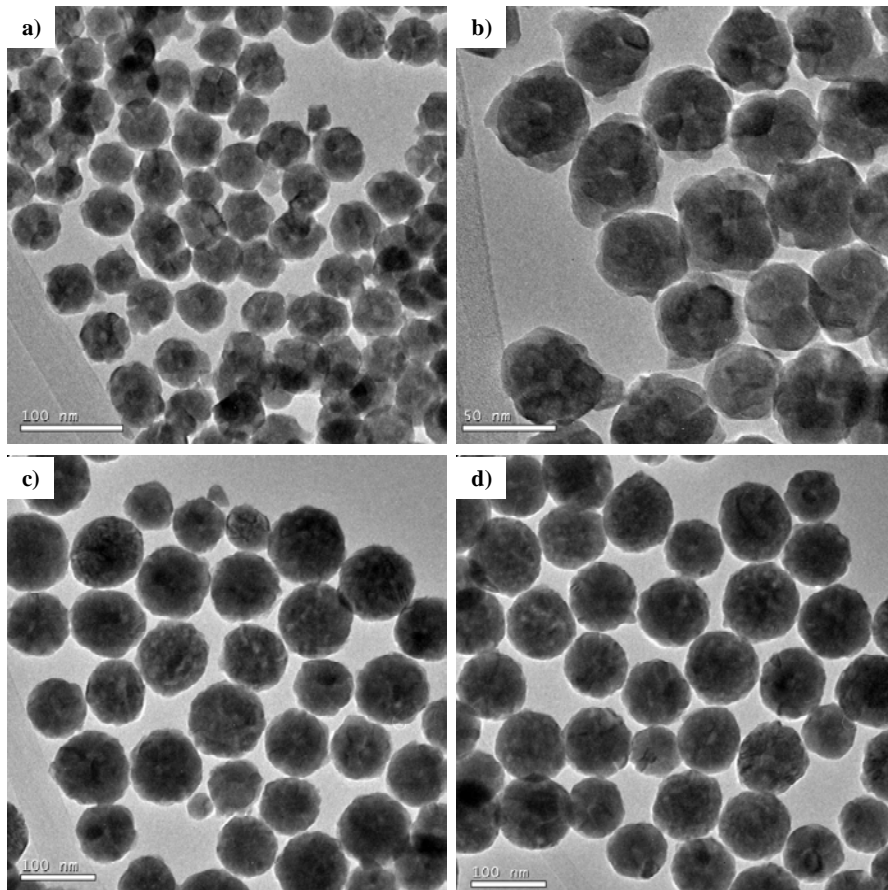


Figure III.10. Images MET des NPs de : (a-b) $\text{Ho}_2\text{O}_3: \text{Eu}^{3+}$ et (c-d) $\text{Dy}_2\text{O}_3: \text{Eu}^{3+}$ obtenues après recuit sous air à 700°C pendant 4h.

Les propriétés de luminescence des NPs de $\text{Ho}_2\text{O}_3: \text{Eu}^{3+}$ et $\text{Dy}_2\text{O}_3: \text{Eu}^{3+}$ ont également été explorées. Nous avons constaté que la luminescence de ces NPs est très faible lorsqu'elles sont excitées à 254 nm. Elles ne sont donc pas utilisables pour l'imagerie de fluorescence.

III.1. 3. NPs à base de Ln_2O_3 (Ln = Gd, Dy et Ho) pour l'« up-conversion »

Dans ce paragraphe, nous nous intéresserons au co-dopage Yb/Er dont les propriétés optiques présentent un grand intérêt technologique. Sous certaines conditions, le couple d'ions Yb/Er donne lieu à un processus appelé « up-conversion » dans lequel deux photons IR sont absorbés pour donner

un photon émis dans le visible.¹²⁶ Plusieurs mécanismes donnent lieu à un tel phénomène. Mais, le mécanisme le plus fréquent est que deux ions Yb^{3+} absorbent chacun un photon IR pour ensuite transférer tous deux leur énergie à un ion Er^{3+} qui se désexcite en émettant un photon dans le visible. Un tel dopage des NPs est particulièrement intéressant dans le domaine du marquage biologique par rapport aux systèmes conventionnels (chromophores organiques, quantum dots). En effet, la plupart des tissus biologiques possèdent une fenêtre spectrale de transparence (dite fenêtre thérapeutique) située entre le rouge et le proche infrarouge (600 nm-1,2 μm)¹²⁷. L'excitation et l'émission dans cette fenêtre permettent alors une pénétration plus profonde de la lumière dans le milieu biologique favorisant une imagerie profonde (quelques cm) *in vivo*. De plus, dans cette fenêtre spectrale, l'autofluorescence des milieux biologiques est très faible ainsi que les phénomènes de diffusion autorisant la collecte d'un signal possédant un bon rapport signal/ bruit¹²⁸. D'un point de vue pratique, l'excitation est souvent effectuée à 980 nm en raison de la facilité d'utilisation des lasers fonctionnant à cette longueur d'onde.

III.1.3.1. Le phénomène d' « up-conversion »

Le processus d' « up-conversion » fait appel à plusieurs phénomènes d'efficacité différente (transferts d'énergie, relaxation croisée, effet coopératif, ...) mais résulte principalement de deux mécanismes :

- ✓ Soit d'une addition de photons par transferts d'énergie, appelée APTE (ou ETU pour *Energy Transfer Up-conversion*). Deux ions se trouvent dans un état excité d'énergie $h\nu$. L'un d'eux se désexcite et donne son énergie au deuxième qui passe dans un état excité d'énergie $2 h\nu$ (Figure III.11.a).
- ✓ Soit d'une absorption dans l'état excité, appelée AEE (ou ESA pour *Excited State Absorption*). Un ion dans l'état excité d'énergie $h\nu$ est porté dans un état excité d'énergie $2 h\nu$. Dans ce cas, il n'y a donc pas de transferts d'énergie (Figure III.11.b).

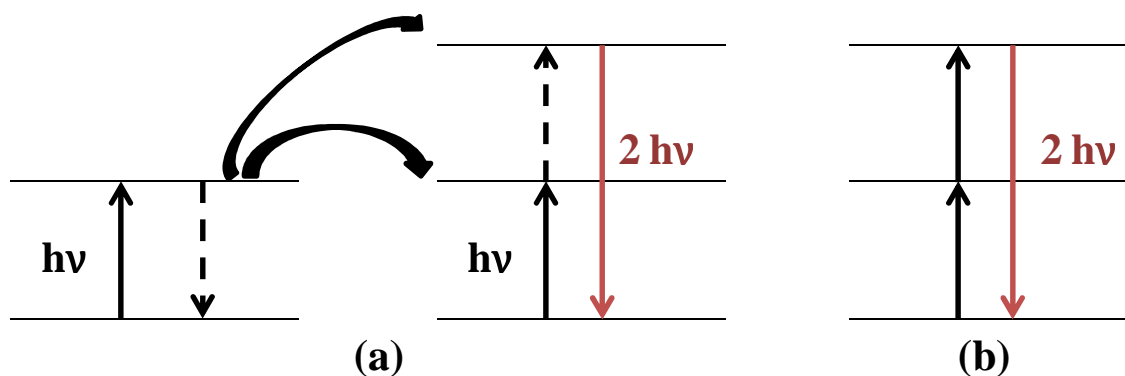


Figure III.11. (a) Addition de photons par transferts d'énergie : APTE et (b) absorption dans l'état excité : AEE.

Pollnau et al.¹²⁹, en considérant l'APTE et l'AEE, ont alors proposé un modèle permettant d'explicitier la dépendance de l'intensité issue d'« up-conversion » avec la puissance d'excitation P encore appelée puissance de pompage¹²⁹. Le modèle le plus simple permettant d'observer le mécanisme d'« up-conversion » est un système à 3 niveaux présenté à la figure III.12. Le système est pompé par absorption du niveau fondamental 0 vers le niveau 1 puis vers 2 selon le mécanisme APTE ou AEE d'« up-conversion ». Les populations N_1 et N_2 des niveaux d'énergie 1 et 2 suivent les équations suivantes :

❖ Dans le cas de l'APTE

$$\frac{dN_1}{dt} = \rho_p \sigma_0 N_0 - 2W_1 N_1^2 - k_1 N_1 \quad \text{et} \quad \frac{dN_2}{dt} = W_1 N_1^2 - k_2 N_2 \quad (\text{III.5})$$

❖ Dans le cas de l'AEE

$$\frac{dN_1}{dt} = \rho_p \sigma_0 N_0 - \rho_p \sigma_1 N_1 - k_1 N_1 \quad \text{et} \quad \frac{dN_2}{dt} = \rho_p \sigma_1 N_1 - k_2 N_2 \quad (\text{III.6})$$

Avec ρ_p constante de pompage qui dépend de la longueur d'onde d'excitation λ_p et de la puissance de pompage P, $\rho_p \approx \lambda_p P$.

σ_i section efficace d'absorption du niveau i

W_1 constante de transfert d'énergie dans le processus APTE

k_i taux de recombinaison du niveau i.

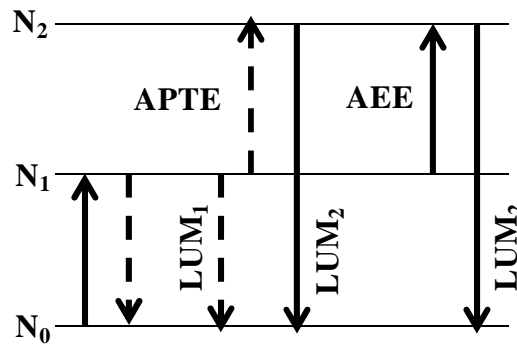


Figure III.12. Schéma d'un système à 3 niveaux mis en jeu lors du phénomène d'« up-conversion » avec des ions identiques, uniquement avec l'ion Er^{3+} .

À l'état quasi-stationnaire ($\frac{dN_1}{dt} = 0$ et $\frac{dN_2}{dt} = 0$), selon le processus APTE ou AEE, cela conduit aux relations suivantes :

❖ Dans le cas de l'APTE

$$W_1 N_1^2 = k_2 N_2$$

$$\rho_p \sigma_0 N_0 = 2 W_1 N_1^2 + k_1 N_1$$

$$\rightarrow N_1^2 \approx N_2 \quad (III.7)$$

❖ Dans le cas de l'AEE

$$\rho_p \sigma_1 N_1 = k_2 N_2$$

$$\rho_p \sigma_0 N_0 = \rho_p \sigma_1 N_1 + k_1 N_1$$

$$\rightarrow N_2 \approx P N_1 \quad (III.8)$$

Si les probabilités des mécanismes d'« up-conversion » (W_1 ou σ_1) sont faibles par rapport à la probabilité de désexcitation propre (k_1), **il s'en suit, d'après les équations (III.7) et (III.8), que les populations des niveaux 1 et 2 varient avec la puissance, quelque soit le mécanisme d'« up-conversion »**. Nous en déduisons les relations suivantes :

$$N_1 \approx P$$

$$N_2 \approx P^2 \quad (III.9)$$

Si au contraire, les mécanismes d'« up-conversion » sont majoritaires, la probabilité de désexcitation propre du niveau 1 devient négligeable. Nous en déduisons les relations suivantes :

❖ Dans le cas de l'APTE

$$N_1 \approx \sqrt{P}$$

$$N_2 \approx P \quad (III.10)$$

❖ Dans le cas de l'AEE

$$N_1 \approx \text{constante}$$

$$N_2 \approx P \quad (III.11)$$

Ces deux cas extrêmes montrent qu'avec l'augmentation de la puissance de pompage induisant une domination d'« up-conversion », la variation de l'intensité lumineuse d'« up-conversion » passe de la forme quadratique (P^2) à la forme linéaire (P) ; alors que la variation de l'intensité lumineuse issue d'une excitation directe passe de la forme linéaire à une forme non linéaire.

Pour une faible efficacité d'« up-conversion », l'intensité émise issue d'un processus à n photons I_n dépend de la puissance de pompage P selon :

$$I_n \approx P^n \rightarrow \text{Log}[I_n] \approx n \text{Log}[P] \quad (III.12)$$

Dans le cas du co-dopage $\text{Er}^{3+}/\text{Yb}^{3+}$ sous excitation IR (980 nm), la figure III.13 montre les mécanismes d'émission lors d'un processus d'« up-conversion ».

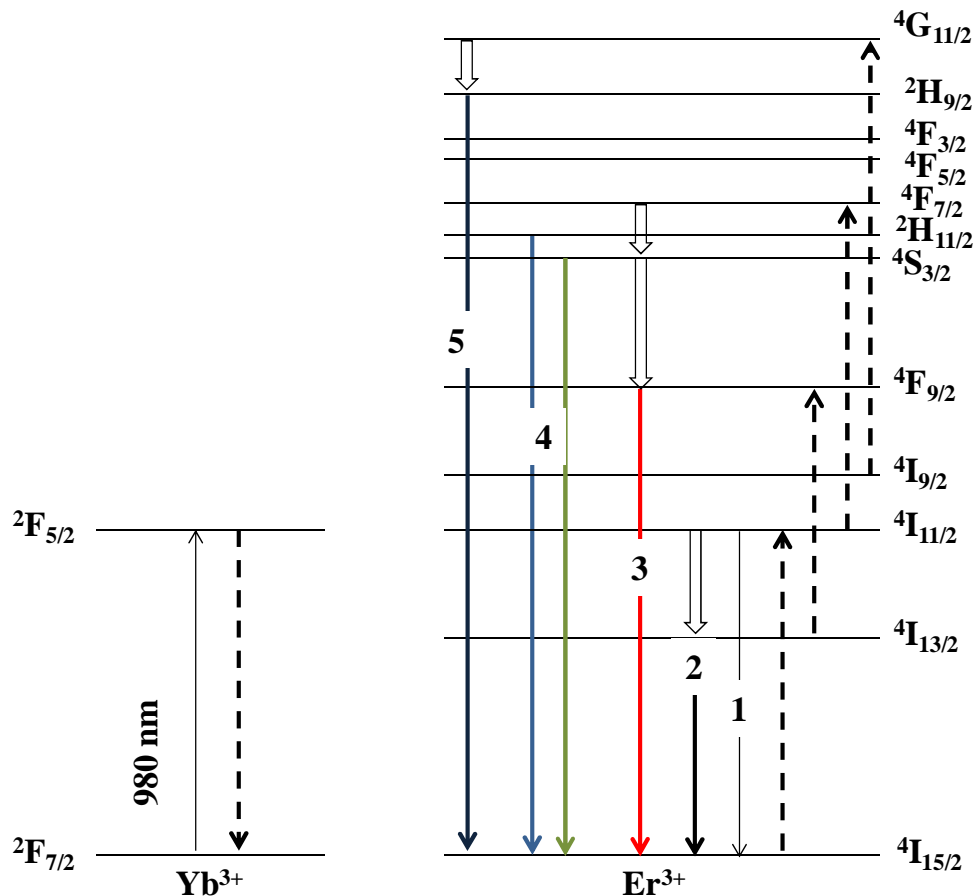


Figure III.13. Schéma du mécanisme d'émission pour un co-dopage $\text{Yb}^{3+}/\text{Er}^{3+}$ dans l'IR ($\sim 1,5 \mu\text{m}$) et dans le visible ($\sim 665 \text{ nm}$, $\sim 550 \text{ nm}$, $\sim 525 \text{ nm}$, $\sim 410 \text{ nm}$) sous excitation dans le NIR.

Un premier photon IR est absorbé par Yb^{3+} qui ainsi passe de son état fondamental (${}^2\text{F}_{7/2}$) à son état excité (${}^2\text{F}_{5/2}$). À ce stade, deux cas de figure sont possibles :

- ✓ L'ion Yb^{3+} se désexcite de façon radiative ou non vers son état fondamental (transition ${}^2\text{F}_{5/2} \rightarrow {}^2\text{F}_{7/2}$)
- ✓ L'ion Yb^{3+} transfère son énergie à un ion Er^{3+} qui ainsi passe de son état fondamental ${}^4\text{I}_{15/2}$ à son état excité ${}^4\text{I}_{11/2}$. Si le niveau d'énergie ${}^4\text{I}_{11/2}$ est déjà peuplé, une absorption ${}^4\text{I}_{11/2} \rightarrow {}^4\text{F}_{7/2}$ depuis l'état excité peut avoir lieu.

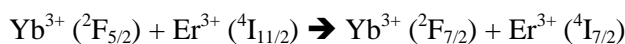
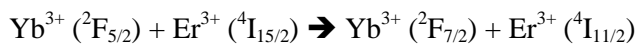
Si l'ion Er^{3+} passe à l'état excité ${}^4\text{I}_{11/2}$, trois processus sont possibles:

- ❖ L'ion Er^{3+} retourne à son état fondamental ${}^4\text{I}_{15/2}$ de façon radiative ou non (transition ${}^4\text{I}_{11/2} \rightarrow {}^4\text{I}_{15/2}$ vers 990 nm , voie 1).
- ❖ L'ion Er^{3+} se désexcite de façon non radiative vers le niveau ${}^4\text{I}_{13/2}$ par relaxation multiphonon. À partir de ce niveau, il y a de nouveau deux possibilités :
 - L'ion Er^{3+} retourne à son état fondamental ${}^4\text{I}_{15/2}$ de façon radiative ou non (transition ${}^4\text{I}_{13/2} \rightarrow {}^4\text{I}_{15/2}$ vers $1,5 \mu\text{m}$, voie 2).

- Il y a de nouveau un transfert d'énergie depuis Yb^{3+} ($^2\text{F}_{5/2}$) et l'ion Er^{3+} passe à l'état excité $^4\text{F}_{9/2}$ pour ensuite revenir à son état fondamental de manière radiative ou non (transition $^4\text{F}_{9/2} \rightarrow ^4\text{I}_{15/2}$ vers 665 nm, voie 3).
- ❖ L'ion Er^{3+} ($^4\text{I}_{11/2}$) réabsorbe l'énergie transférée par l'ion Yb^{3+} ($^2\text{F}_{5/2}$) et passe à l'état excité $^4\text{F}_{7/2}$. Il se désexcite par relaxation multiphonon vers les niveaux $^2\text{H}_{11/2}$ et $^4\text{S}_{3/2}$ et vers le niveau $^4\text{F}_{9/2}$.
- A partir des niveaux $^2\text{H}_{11/2}$ et $^4\text{S}_{3/2}$, il se désexcite de façon radiative ou non vers son niveau fondamental (transitions $^2\text{H}_{11/2} \rightarrow ^4\text{I}_{15/2}$ et $^4\text{S}_{3/2} \rightarrow ^4\text{I}_{15/2}$ vers 525 nm et 550 nm respectivement, voie 4).
- A partir du niveau $^4\text{F}_{9/2}$, l'ion Er^{3+} peut :
 - ✓ absorber pour une troisième fois l'énergie transférée par un ion Yb^{3+} et atteindre le niveau $^4\text{G}_{11/2}$. Après relaxation multiphonon vers le niveau $^2\text{H}_{9/2}$, il se désexcite de façon radiative ou non vers son niveau fondamental (transition $^2\text{H}_{9/2} \rightarrow ^4\text{I}_{15/2}$ vers 410 nm, voie 5).
 - ✓ se désexciter de façon radiative ou non vers son niveau fondamental (transition vers $^4\text{F}_{9/2} \rightarrow ^4\text{I}_{15/2}$ 665 nm, voie 3).

Il convient également de noter que l'ion Er^{3+} a une section efficace d'absorption faible dans l'IR et lorsque le matériau est co-dopé par l' Yb^{3+} (de section efficace d'absorption 5 fois plus élevée à 980 nm), des transferts d'énergie $\text{Yb}^{3+} \rightarrow \text{Er}^{3+}$ ont lieu. Par conséquent, les ions Yb^{3+} jouent le rôle de sensibilisateurs et les ions Er^{3+} celui d'activateurs.

Tous les travaux publiés prouvent que le processus le plus probable résulte de deux transferts d'énergie successifs :



Il s'agit donc bien d'une addition de photons par transfert d'énergie (APTE).

Après excitation de l'ion Yb^{3+} ($^2\text{F}_{7/2} \rightarrow ^2\text{F}_{5/2}$) à 980 nm, on observe les émissions de l' Er^{3+} depuis les niveaux $^2\text{H}_{11/2}$, $^4\text{S}_{3/2}$ et $^4\text{F}_{9/2}$ respectivement avec des longueurs d'onde autour de 525, 550 et 665 nm. S'agissant d'un processus APTE à 2 photons, on peut s'aider du modèle simple à 3 niveaux décrit par la figure III.14.

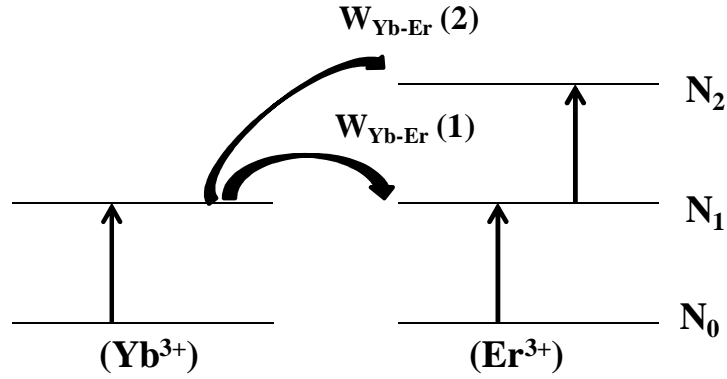


Figure III.14. Schéma simplifié des niveaux d'énergie et symboles utilisés dans le cas d'un co-dopage Yb-Er.

Avec :

$W_{Yb-Er}(1)$ la constante de transfert d'énergie de l'ion Yb vers l'ion Er sur le niveau (1)

$W_{Yb-Er}(2)$ la constante de transfert d'énergie de l'ion Yb vers l'ion Er sur le niveau (2)

$N_0(Yb)$ la concentration d'ion Yb à l'état fondamental (0)

Dans le cas de l'APTE, l'observation des émissions d'« up-conversion » est fonction de N_2 , le nombre d'ions Er^{3+} ayant atteint le niveau 2. En ne considérant que les phénomènes les plus probables : les 2 probabilités de transfert d'énergie ($W_{Yb-Er}(1)$ et $W_{Yb-Er}(2)$), nous avons :

$$\frac{dN_2}{dt} = N_1[\sigma(Yb)N_0(Yb)P] W_{Yb-Er}(2) - k_2N_2 \quad (III.13)$$

Avec k_2 la probabilité de désexcitation totale des ions du niveau (2).

N_1 est le nombre d'Er ayant atteint ce niveau après un premier transfert d'énergie vers le niveau (1) et s'exprime par :

$$N_1 = \sigma(Yb)N_0(Yb)P \quad (III.14)$$

À l'état quasi-stationnaire, l'équation (III.13) devient :

$$N_2 \approx P^2 \quad (III.15)$$

Nous retrouvons bien avec ce schéma la loi quadratique décrite précédemment dans le cas de 2 ions identiques :

$$I_2 \approx P^2 \rightarrow \text{Log}[I_2] \approx 2 \text{Log}[P]$$

Il existe une compétition entre le phénomène d'« up-conversion » et les phénomènes de relaxation. Pour observer un phénomène d'« up-conversion » efficace, la relaxation multiphonon doit

être faible à partir du niveau $^4I_{11/2}$. Plus la durée de vie de l'ion Er^{3+} à l'état excité est importante, plus la probabilité du second transfert est grande. Par conséquent, les matériaux considérés comme efficaces pour l'« up-conversion » sont généralement ceux pour lesquels moins de 5 phonons sont nécessaires pour combler la transition $^4I_{11/2} \rightarrow ^4I_{13/2}$. Gamelin *et al.*¹³⁰ distinguent ainsi deux types de matériaux, l'un ayant des phonons à haute énergie (moins de 5 phonons nécessaires : les fluorures et les oxydes) et l'autre des phonons à faible énergie (plus de 5 phonons nécessaires : les chlorures, les bromures et les iodures).

L'ion Yb^{3+} présentant une large bande d'absorption entre 920 et 1010 nm avec un maximum autour de 977 nm¹³¹, nous avons étudié le phénomène d'« up-conversion » de nos NPs de $Gd_2O_3: Er ; Yb$ excitées dans le NIR à 980 nm.

III.1.3.2. Émission des NPs de $Gd_2O_3: Er ; Yb$

L'analyse du phénomène d'« up-conversion » de nos NPs de $Gd_2O_3: Er ; Yb$ a été faite en étudiant l'influence de deux paramètres : le taux de dopage et la puissance d'excitation. Le choix du taux de dopage résulte de trois aspects¹³². Un taux de dopage en Er^{3+} trop élevé favorise la relaxation croisée entre ions $Er^{3+}(^5I_{15/2}) + Er^{3+}(^4S_{3/2}) \rightarrow Er^{3+}(^4I_{13/2}) + Er^{3+}(^4I_{9/2})$ nuisant ainsi à l'émission dans le visible. Le taux de dopage en Yb^{3+} doit être suffisamment élevé pour des transferts d'énergie d'excitation efficaces de l'ion Yb^{3+} vers Er^{3+} . Cependant, les taux de dopage ne doivent pas être trop élevés pour éviter la migration d'énergie entre ions actifs.

III.1.3.2.1. Sous excitation NIR

La figure III.15 présente le spectre d'émission des NPs de $Gd_2O_3: Er ; Yb$ (1 ; 8%.mol) sous excitation NIR ($\lambda_{exc} = 980$ nm et $P = 800$ mW). Lorsque les NPs sont excitées par un rayonnement NIR (980 nm), la luminescence par « up-conversion » est visible à l'œil nu avec une forte émission dans le rouge. Le spectre d'émission présente principalement des raies intenses centrées à 660 nm correspondant aux transitions $^4F_{9/2} \rightarrow ^4I_{15/2}$ de l'ion Er^{3+} . Les intensités des transitions $^2H_{11/2} \rightarrow ^4I_{15/2}$ et $^4S_{3/2} \rightarrow ^4I_{15/2}$ sont relativement faibles. La transition dans le violet ($^2H_{9/2} \rightarrow ^4I_{15/2}$) n'est en revanche pas visible.

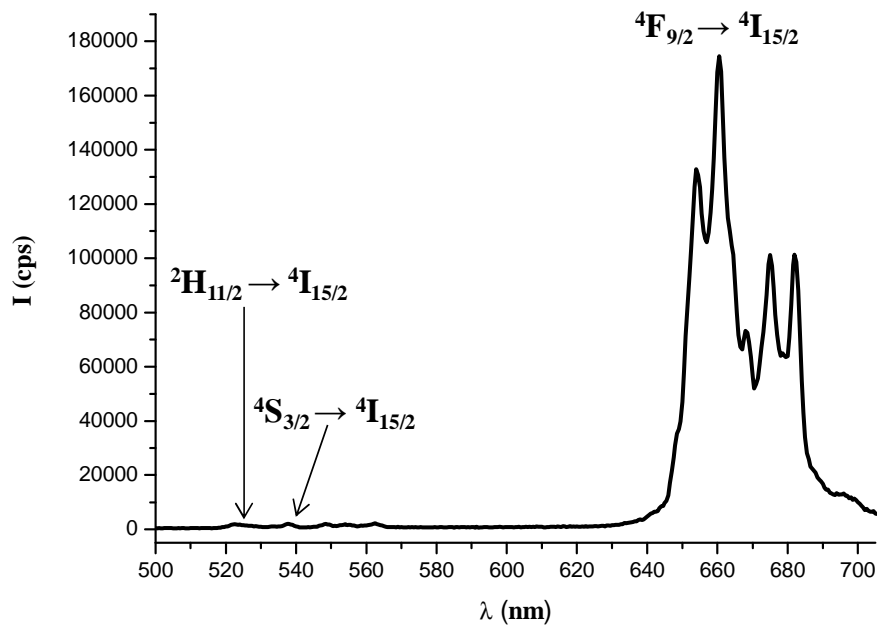


Figure III.15. Spectre d'émission de poudre de NPs de $Gd_2O_3: Er ; Yb (1 ; 8\%)$ sous une excitation ($\lambda_{exc} = 980 \text{ nm}$ et $P = 800 \text{ mW}$)

Cette dominance d'émission dans le rouge peut s'expliquer par l'existence d'une compétition entre la désexcitation non radiative des états $^4S_{3/2}$ et $^4F_{9/2}$. Ces résultats concordent avec ceux rapportés par Page *et al.*¹³³ dans le cas du matériau $Y_2O_3: Er ; Yb$. Cette dominance d'émission dans le rouge centrée sur 660 nm est favorable à notre application pour l'imagerie médicale *in vivo*.

Afin d'estimer le meilleur taux de dopage pour observer l'« up-conversion », différents matériaux $Gd_2O_3: Er ; Yb (x ; y)$ ont été préparés en variant le taux de dopage en Erbium (x) et celui en Ytterbium (y). Ces taux sont définis comme suit :

$$\frac{[Er^{3+}]}{([Gd^{3+}] + [Er^{3+}] + [Yb^{3+}])} = x \text{ et } \frac{[Yb^{3+}]}{([Gd^{3+}] + [Er^{3+}] + [Yb^{3+}])} = y$$

La figure III.16 présente la variation de l'intensité relative de la bande d'émission ($^4F_{9/2} \rightarrow ^4I_{15/2}$) en fonction du taux d'Erbium et d'Ytterbium des NPs de $Gd_2O_3: Er ; Yb$ à puissance d'excitation égale.

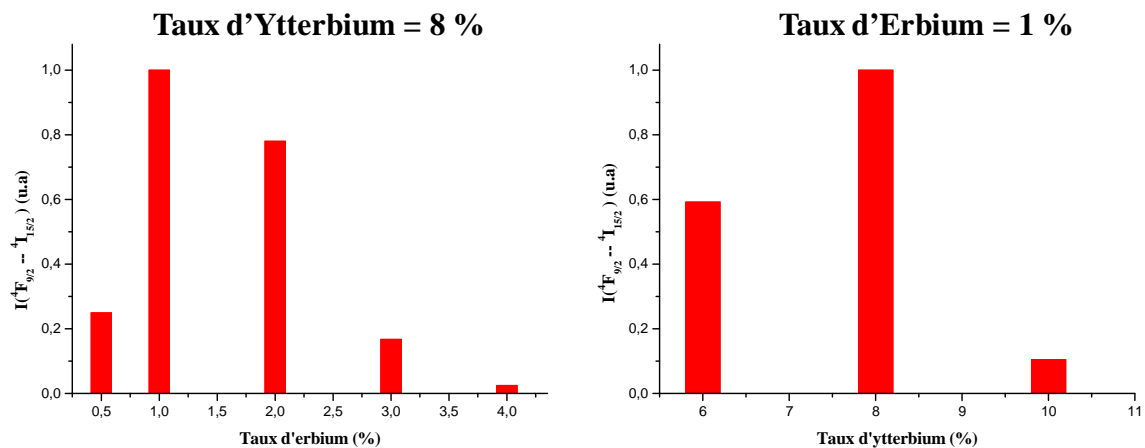


Figure III.16. Variation de l'intensité de la bande d'émission rouge ${}^4F_{9/2} \rightarrow {}^4I_{15/2}$ en fonction des taux d'erbium et d'ytterbium des NPs de $Gd_2O_3: Er; Yb$ sous une excitation NIR ($\lambda_{exc} = 980 \text{ nm}$ et $P = 800 \text{ mW}$)

Pour un taux d'Ytterbium fixe (8%), l'intensité relative de la bande d'émission (${}^4F_{9/2} \rightarrow {}^4I_{15/2}$) croît avec le taux d'Erbium jusqu'à 1% puis décroît pour des taux supérieurs à 1%. Lorsque le taux d'Erbium est fixé à 1%, l'optimum est obtenu pour un taux en Ytterbium égal à 8%. Ainsi, au-delà de 1% en ions Er^{3+} , des processus non radiatifs nuisent fortement aux mécanismes d' « up-conversion ». Ces résultats signifient donc que l'extinction par concentration (« quenching effect » en anglais) se situe vers 1% d'ions Er^{3+} quand le taux en Yb^{3+} vaut 8%. Au-delà de 1% en ions Er^{3+} , les processus non radiatifs deviennent majoritaires et des transferts d'énergie entre ions actifs ont lieu. Il peut s'agir de la relaxation croisée entre ions Er^{3+} mais également des transferts d'énergie de l'ion Er^{3+} vers Yb^{3+} . Le rapport molaire Yb/Er optimal vaut donc 8. Ce rapport déterminé est proche de celui (Yb/Er = 9) rapporté par Suyver *et al.*¹³⁴ pour le matériau $\beta\text{-NaYF}_4: Er; Yb$ (2 ; 18%.mol).

En tenant compte de ces résultats, le taux optimal des NPs de $Gd_2O_3: Er; Yb$ (1 ; 8%) sera retenu dans la suite de nos travaux.

Pour déterminer le nombre de photons NIR impliqués dans le processus d' « up-conversion » des NPs de $Gd_2O_3: Er; Yb$ (1 ; 8%), les intensités d'émission dans le visible de la transition ${}^4F_{9/2} \rightarrow {}^4I_{15/2}$ ont été enregistrées pour différentes puissances d'excitation à 980 nm (figure III.17).

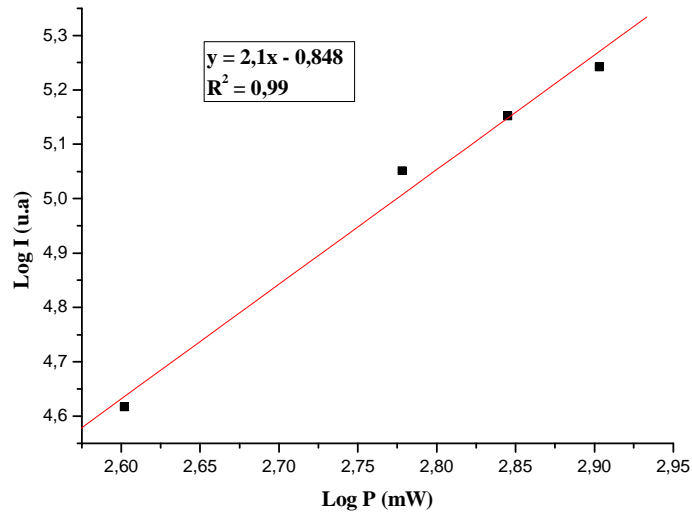


Figure III.17. Évolution de l'intensité de la transition ${}^4F_{9/2} \rightarrow {}^4I_{15/2}$ des NPs de $Gd_2O_3: Er ; Yb (1 ; 8\%)$ en fonction de la puissance d'excitation

Nous remarquons que l'émission varie globalement en fonction du carré de la puissance d'excitation. La luminescence des NPs de $Gd_2O_3: Er ; Yb$ suit donc bien un processus à 2 photons.

III.1.3.2.2. Sous excitation UV

Les propriétés d'émission des NPs de $Gd_2O_3: Er ; Yb (1 ; 8\%)$ ont été également observées sous excitation UV. Le spectre d'excitation observé à 660 nm (figure III.18.a) présente une bande centrée sur 400 nm (bande d'excitation directe de l'ion Er^{3+}) attribuable à la transition ${}^4I_{15/2} \rightarrow {}^4G_{11/2}$.

Lorsque ces NPs sont excitées à 400 nm (figure III.18.b), nous observons deux raies autour de 544 nm et 655 nm attribuables respectivement aux transitions ${}^4S_{3/2} \rightarrow {}^4I_{15/2}$ et ${}^4F_{9/2} \rightarrow {}^4I_{15/2}$ de l'ion Er^{3+} . Ces deux transitions sont majoritaires et la transition ${}^2H_{11/2} \rightarrow {}^4I_{15/2}$ n'est pas visible. Sous excitation UV, les NPs de $Gd_2O_3: Er ; Yb (1 ; 8\%)$ émettent aussi bien dans le vert (544 nm) que dans le rouge (655 nm). Cependant, cette luminescence est relativement faible et ne permet pas d'envisager l'utilisation de ces particules pour une application avec excitation UV.

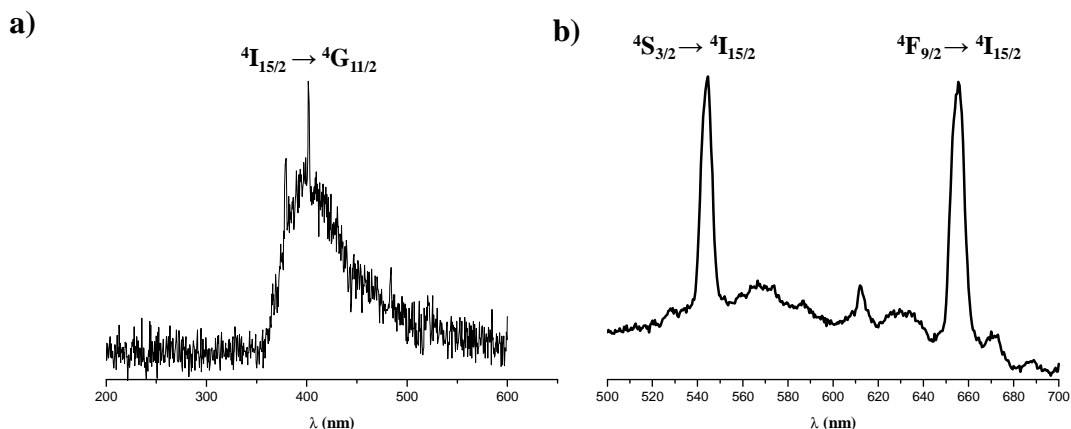


Figure III.18. Spectres : (a) d'excitation observé à 660 nm et (b) d'émission à $\lambda_{exc} = 400$ nm des NPs de $Gd_2O_3: Er; Yb$ (1 ; 8%)

III.1.3.3. Émission des NPs de Ln_2O_3 (Ln = Dy et Ho): Er ; Yb

La figure III.19 présente les spectres d'émission des NPs de $Dy_2O_3: Er; Yb$ (1 ; 8%.mol) et $Ho_2O_3: Er; Yb$ (1 ; 8%.mol) sous excitation NIR ($\lambda_{exc} = 980$ nm et $P = 1500$ mW).

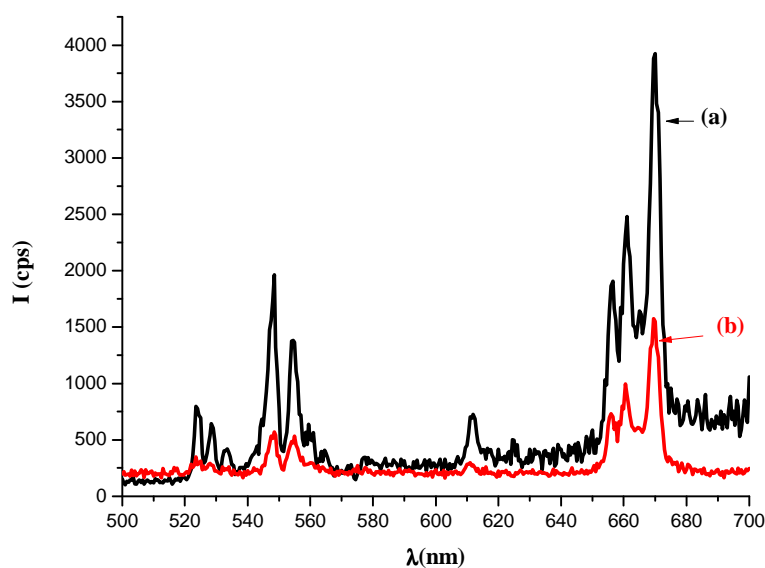


Figure III.19. Spectres d'émission des NPs de: (a) $Dy_2O_3: Er; Yb$ (1 ; 8%.mol) et (b) $Ho_2O_3: Er; Yb$ (1 ; 8%.mol) sous excitation NIR ($\lambda_{exc} = 980$ nm et $P = 1500$ mW).

Les spectres d'émission présentent les différentes transitions de l'ion Er^{3+} observées dans le cas de Gd_2O_3 . À puissance égale, l'intensité de luminescence de l'oxyde de dysprosium est le double de celle obtenue avec l'oxyde d'holmium. Toutefois, il convient de remarquer qu'il a fallu augmenter

la puissance d'excitation jusqu'à 1500 mW avant d'avoir une intensité de l'ordre de 4000 cps (**45 fois plus faible que celle de l'oxyde de gadolinium à 800 mW**). La luminescence de ces deux matériaux reste donc relativement faible en « up-conversion ».

III.1.3.4. Conclusion

Le protocole de synthèse de NPs de Gd_2O_3 optimisé au paragraphe III.1, nous a permis de préparer des NPs de $Gd_2O_3: Er; Yb$ excitables aussi bien en UV que dans le NIR.

Sous excitation laser (980 nm), l'émission des NPs est constituée majoritairement d'une bande intense dans le rouge (autour de 660 nm). L'intensité de l'émission visible varie bien comme le carré de la puissance de l'excitation proche infrarouge (processus à 2 photons). Les études faites ont montré que ce phénomène était le plus efficace pour un dopage de 8% en ions Yb^{3+} et 1% en ions Er^{3+} . Dans les matériaux $Dy_2O_3: Er; Yb$ et $Ho_2O_3: Er; Yb$, la luminescence reste relativement faible en « up-conversion ».

Ces résultats sont donc fortement encourageants en ce qui concerne l'élaboration de NPs à « up-conversion ». Jusqu'à ce jour, la majorité des études sur le sujet se sont portées sur l'élaboration de nanocristaux $\beta-NaYF_4: Yb; Er$ et à leur fonctionnalisation. Nos NPs de $Gd_2O_3: Er; Yb$ synthétisées sont donc de bonnes candidates pour le marquage biologique.

III.2. Synthèse et caractérisation des NPs luminescentes à base de Ln_2O_2S

III.2.1. Structure cristalline des oxysulfures de lanthanides Ln_2O_2S

Les différents types d'oxysulfures de terres rares qui existent sont : Ln_2O_2S , $Ln_2O_2S_2$ et Ln_2OS_2 . La structure Ln_2O_2S est une structure en couches, de type Sillen, et consiste en un empilement de feuillets constitués, d'une part, par la terre rare et l'oxygène, et d'autre part, par plusieurs couches d'atomes de soufre. Les oxysulfures sont formés par intercroissance de couches $[Ln_2O_2]^{2+}$ et de monocouches d'ions S^{2-} , comme le montre la figure III.20. Les oxysulfures cristallisent dans le groupe d'espace $P\bar{3}m1$.¹³⁵

Les paramètres de la maille trigonale pour Gd_2O_2S , Ho_2O_2S et Dy_2O_2S sont regroupés dans le tableau III.3. Leur structure est isomorphe de l'oxyde hexagonal $\alpha-Ln_2O_3$, qui est la forme basse température pour $Ln = La-Nd$. Dans cette structure, la terre rare se situe dans un site de coordinence 7, formé par 3 atomes de Soufre et 4 atomes d'Oxygène. L'environnement peut se décrire comme un antiprisme triangulaire monocappé (Figure III.17.b). La symétrie ponctuelle est C_{3v} , un atome d'oxygène se trouvant sur l'axe C_3 .¹³⁶

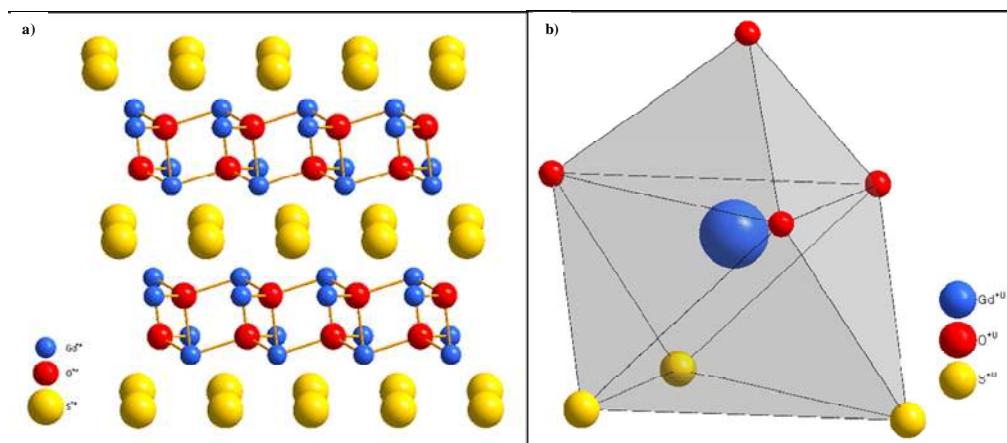


Figure III.20. Représentation de : (a) la structure Ln₂O₂S et (b) des polyèdres de coordination présents dans cette structure (d’après la référence 136).

Tableau III.3. Différents paramètres des oxysulfures Ln₂O₂S.

	Groupe d’espace	Paramètres de la maille (Å)	Angle (degrés)
Gd₂O₂S (ICDD Fiche No: 026-1422)	P3m1	a = b = 3,852 c = 6,667	α = β = 90 γ = 120
Ho₂O₂S (ICDD Fiche No: 025-1143)	P3m1	a = b = 3,779 c = 6,569	α = β = 90 γ = 120
Dy₂O₂S (ICDD Fiche No: 026-0592)	P3m1	a = b = 3,801 c = 6,596	α = β = 90 γ = 120

III.2.2. Synthèse et caractérisation des NPs de Gd₂O₂S :Eu³⁺

III.2.2.1. Principe et méthode

Les NPs de Gd₂O₂S :Eu³⁺ ont été synthétisées par sulfuration de NPs d’hydroxycarbonate de gadolinium. Le montage utilisé est celui décrit dans la référence 136 avec quelques modifications. Dans notre cas, le sulfure d’hydrogène (H₂S) a été utilisé comme gaz sulfurant. En effet, il permet de mieux contrôler la quantité de soufre et d’éviter les impuretés (carbone) qu’on pourrait avoir en utilisant du CS₂. De plus, l’H₂S pose moins de problème de sécurité que le CS₂ qui est explosif. En revanche, l’H₂S est un gaz corrosif et facilement liquéfiable à froid ce qui a induit beaucoup de

problèmes dans la réalisation technologique de la « ligne d'H₂S ». Nous tenons à remercier ici Mr David NEUMEYER, assistant ingénieur au CEMES, pour le temps qu'il a consacré pour résoudre ce problème avec nous. Il convient également de rapporter ici que notre laboratoire est l'un des rares laboratoires en France à disposer d'un tel montage expérimental.

La figure III.21 représente le schéma du montage utilisé. La solution de nitrate de plomb Pb(NO₃)₂ placée à la 2^{ème} extrémité du tube sert à piéger l'excès d' H₂S n'ayant pas réagi par formation du sulfure de plomb : PbS.

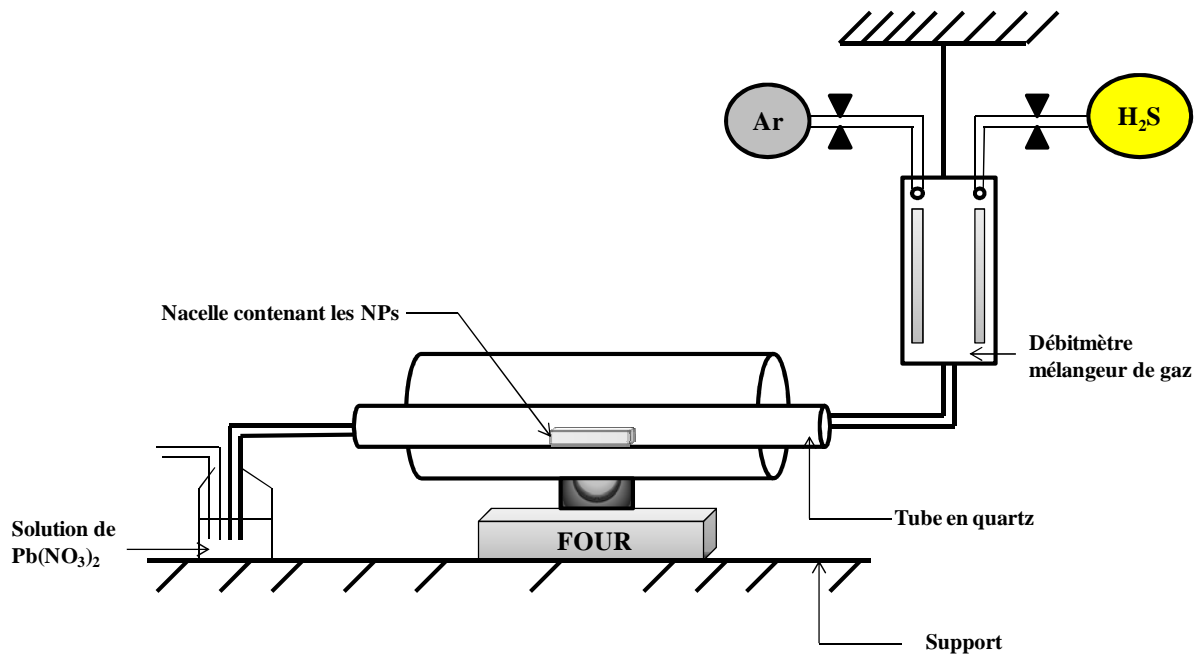


Figure III.21. Schéma du montage de sulfuration

Les NPs de Gd(OH)CO₃.H₂O: Eu³⁺ obtenues dans les conditions optimales déterminées au paragraphe III.1.1.2.2 sont mises dans une nacelle en silice qui est placée dans le tube en quartz du four à sulfuration. Après un balayage sous gaz inerte (Argon) pendant 30 min, la sulfuration est effectuée suivant le cycle de sulfuration optimisé et représenté sur la figure III.22.

- La température dans le four est montée jusqu'à 750°C sous un mélange Ar-H₂S (83 vol.%-17 vol%).
- Le palier est maintenu à 750°C pendant 90 min sous un mélange Ar-H₂S (83 vol.%-17 vol%).

Le gaz sulfurant : H₂S est arrêté et un recuit sous argon est effectué en augmentant la température à 850°C

- Le 2^{ème} palier est maintenu à 850°C pendant 4 heures.
- Un refroidissement sous Ar jusqu'à la température ambiante.

La vitesse de chauffe du four au cours de tout le cycle est fixée à 10°C/min.

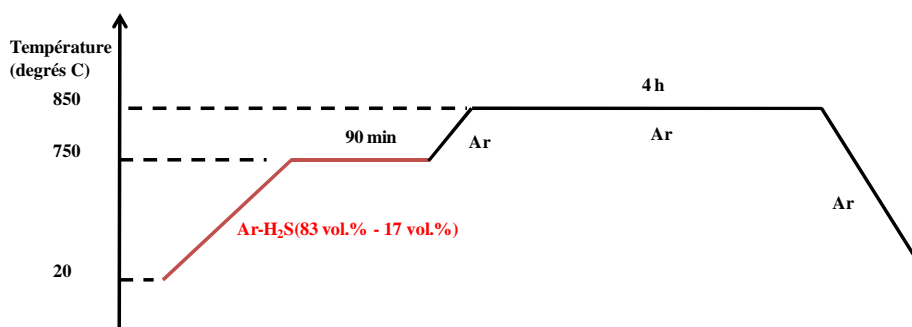


Figure III.22. Cycle de sulfuration

III.2.2.2. Résultats et discussions

Caractérisations

L'analyse radiocristallographique (figure III.23-a) de la poudre obtenue après sulfuration montre des raies intenses et bien définies, caractéristiques d'une bonne cristallisation. L'indexation de ces raies dans la base de données ICDD nous a permis d'identifier la fiche No : 026-1422 correspondant à la phase hexagonale de l'oxysulfure de gadolinium : Gd_2O_2S . Ces résultats montrent bien la conversion de la poudre amorphe en Gd_2O_2S .

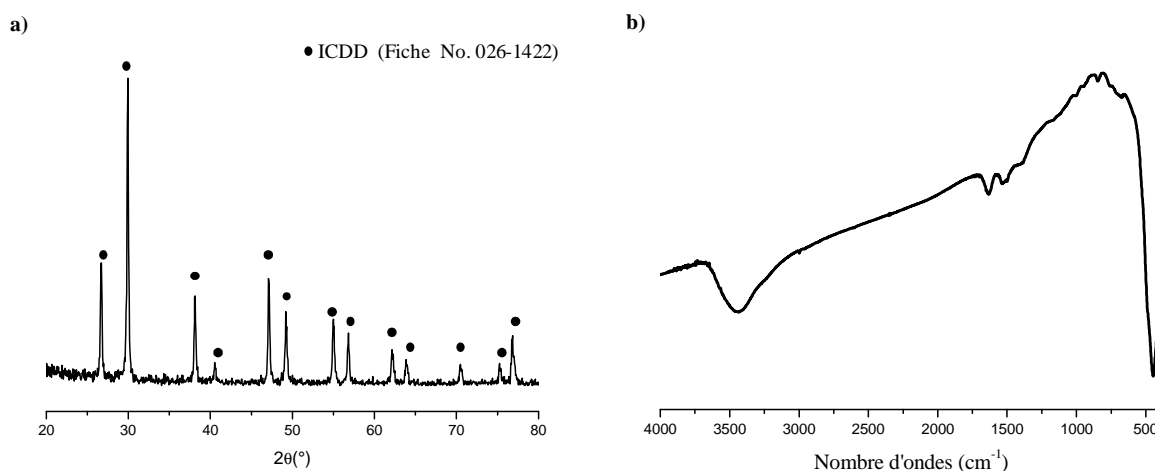


Figure III.23. (a) Diffractogramme et (b) Spectre IR de NPs après sulfuration

La figure III.23-b présente le spectre IR de ces NPs après sulfuration. Ce spectre présente essentiellement une bande intense à 447 cm^{-1} , caractéristique de la vibration $Gd-O$ et $Gd-S$.¹³⁷ Les bandes moins intenses observées à : 1515 et 1404 cm^{-1} sont attribuables aux vibrations des liaisons

C—O provenant de la décomposition incomplète des carbonates, 1646 et 3412 cm^{-1} sont attribuables aux vibrations des liaisons H—O provenant de l'adsorption d'eau de l'atmosphère. Ces résultats confortent la formation de NPs de $\text{Gd}_2\text{O}_2\text{S}:\text{Eu}^{3+}$.

L'observation en MET des NPs obtenues après sulfuration (figure III.24) montre des NPs sphériques, monodisperses en taille et de diamètre moyen égal à 60 nm. Rappelons que les NPs initiales de $\text{Gd}(\text{OH})\text{CO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}:\text{Eu}^{3+}$ ayant servies à la sulfuration avaient un diamètre moyen de 90 nm. Ce traitement de sulfuration s'accompagne alors d'une forte densification des particules sans pour autant générer d'agglomération.

À notre connaissance, c'est la 1^{ère} fois que des NPs de $\text{Gd}_2\text{O}_2\text{S}:\text{Eu}^{3+}$ sphériques, et monodisperses de taille nanométrique sont synthétisées par coprécipitation suivie d'une sulfuration. **Ceci nous a amené au dépôt d'un brevet¹³⁸ pour ce nouveau matériau.**

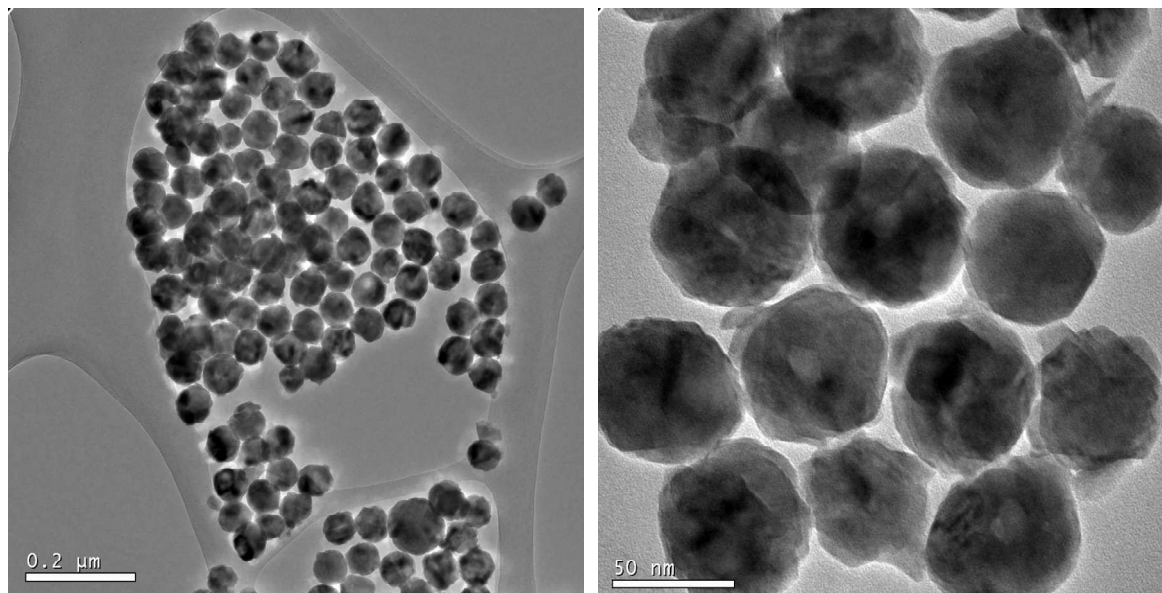


Figure III.24. Images MET de NPs de $\text{Gd}_2\text{O}_2\text{S}:\text{Eu}^{3+}$

Propriétés optiques

Afin d'aborder les propriétés optiques de ce nanomatériau, nous nous sommes intéressés à l'étude de la luminescence des NPs de $\text{Gd}_2\text{O}_2\text{S}:\text{Eu}^{3+}$. La figure III.25 présente les spectres : d'émission et d'excitation des NPs de $\text{Gd}_2\text{O}_2\text{S}:\text{Eu}^{3+}$. Le spectre d'émission (figure III.25.a) enregistré après excitation à 363 nm présente des bandes correspondant aux transitions $^5\text{D}_0 \rightarrow ^7\text{F}_J$ ($J = 0, 1, 2, 3$ et 4) dont la plus intense est à 624 nm. Cette bande confère au matériau une luminescence rouge et est caractéristique de la transition dipolaire électrique $^5\text{D}_0 \rightarrow ^7\text{F}_2$ des ions Eu^{3+} en symétrie C_{3v} .

Le spectre d'excitation (figure III.25.b) observé à 624 nm peut être décomposé en 3 zones correspondant chacune à un mode d'excitation différent. Dans la zone 390-500 nm, ce sont les

transitions entre les niveaux 4f de l'ion Eu^{3+} , correspondant à l'excitation directe de l'ion qui apparaissent.

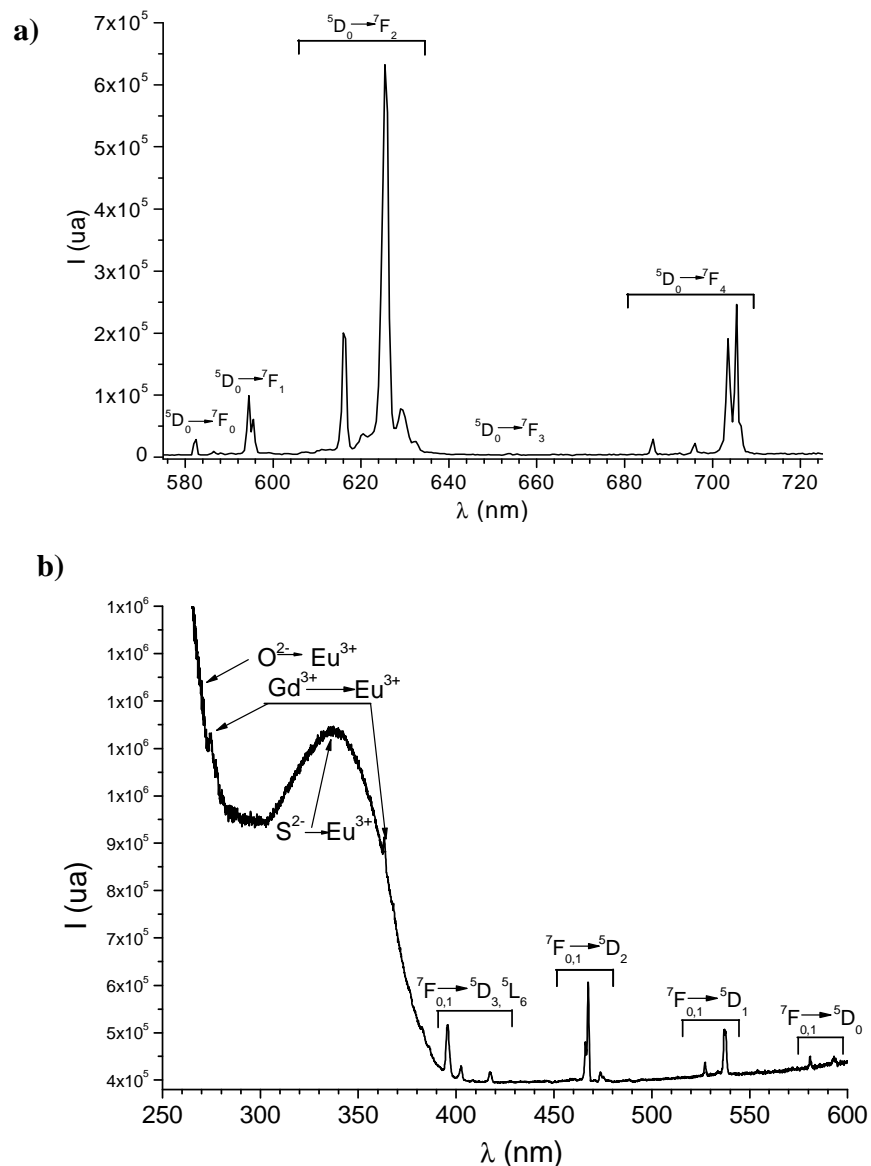


Figure III.25. Spectres : a) d'émission à $\lambda_{\text{exc}} = 363 \text{ nm}$ et b) d'excitation observé à 624 nm ; des NPs de $\text{Gd}_2\text{O}_2\text{S}:\text{Eu}^{3+}$

Dans la zone de $390\text{-}270 \text{ nm}$, l'émission se fait via l'excitation dans la bande de transfert de charge $\text{S}^{2-} \rightarrow \text{Eu}^{3+}$ centrée à 355 nm . **L'intérêt majeur de ce matériau réside dans cette large bande de transfert de charge située dans le proche UV contrairement à l'oxyde $\text{Gd}_2\text{O}_3:\text{Eu}^{3+}$.** En effet, l'excitation d'un nanomarqueur dans l'UV lointain ($<330 \text{ nm}$) ne présente que peu d'intérêts en biologie, car totalement incompatible avec la technologie des microscopes à épifluorescence commerciaux. Certes, une excitation directement dans une bande d'absorption de la terre rare est toujours possible. Cependant, le faible coefficient d'absorption de ces bandes nécessite l'utilisation de laser de puissance couteux qui existe sur les microscopes dédiés à ces expérimentations mais pas sur le

microscope du « biologiste ordinaire ». En revanche, les lampes à mercure qui équipent souvent les microscopes commerciaux présentent une bande large centrée sur 365 nm totalement adaptée avec ce nouveau nanomarqueur : $\text{Gd}_2\text{O}_2\text{S}:\text{Eu}^{3+}$. Telle est l'une des contributions majeures de ce travail de thèse.¹³⁹

Enfin, en dessous de 270 nm la bande de transfert de charge $\text{O}^{2-} \rightarrow \text{Eu}^{3+}$ a été détectée. Les fines raies qui apparaissent au pied de la bande de transfert de charge correspondent aux absorptions du gadolinium.

Il existe une relation entre l'intensité de la bande d'émission (${}^5\text{D}_0 \rightarrow {}^7\text{F}_2$) de l' Eu^{3+} et la concentration $[\text{Eu}^{3+}]$. Dans les matériaux luminescents, l'intensité de cette bande augmente avec le nombre de centres activateurs à faibles concentrations alors qu'à fortes concentrations un phénomène d'atténuation (quenching) de l'intensité lumineuse est observé. Dans la littérature, différentes valeurs de la concentration $[\text{Eu}^{3+}]$ pour une intensité maximale d'émission ont été rapportées pour les oxysulfures de lanthanides. À titre d'exemples, sous excitation à 330 nm, la valeur maximale de l'intensité de la bande d'émission (${}^5\text{D}_0 \rightarrow {}^7\text{F}_2$) est obtenue pour $[\text{Eu}^{3+}] = 0,5 \text{ mol.}\%$ pour des microparticules de $\text{La}_2\text{O}_2\text{S}:\text{Eu}^{3+}$ ¹⁴⁰ alors qu'elle a été rapportée d'autres parts pour le même matériau à $[\text{Eu}^{3+}] = 10 \text{ mol.}\%$ pour des microparticules et $[\text{Eu}^{3+}] = 20 \text{ mol.}\%$ dans les nanocristaux de $\text{La}_2\text{O}_2\text{S}:\text{Eu}^{3+}$.¹⁴¹

Il nous a semblé alors nécessaire d'étudier l'influence de la concentration en ions Eu^{3+} sur l'intensité de la bande d'émission (${}^5\text{D}_0 \rightarrow {}^7\text{F}_2$) de nos NPs de $\text{Gd}_2\text{O}_2\text{S}:\text{Eu}^{3+}$. Pour ce faire, des échantillons ayant différents teneurs en europium : $\frac{[\text{Eu}^{3+}]}{([\text{Gd}^{3+}] + [\text{Eu}^{3+}])} = x \text{ mol.}\%$ (avec x variant de 0,5 à 9) ont été préparés. Afin de travailler dans des conditions proches de celles des applications pour le marquage biologique, les spectres d'émission de nos NPs ont été enregistrés à $\lambda_{\text{exc}} = 363 \text{ nm}$ en suspension dans l'eau à une concentration de 3,75 mg/mL.

La figure III.26 présente l'évolution de l'intensité de la bande d'émission en fonction de la teneur en Eu^{3+} . Pour des teneurs inférieures à 5 mol.%, l'intensité lumineuse augmente avec le nombre de centres luminescents (Eu^{3+}) alors qu'elle décroît significativement pour des teneurs supérieures à 5 mol.%. Cette diminution de l'intensité luminescence est due aux interactions dipôle – dipôle et dipôle – quadripôle des centres luminescents (Eu^{3+}).¹⁴² L'intensité optimale est obtenue pour une teneur en europium égale à 5 mol.%. Cette valeur déterminée est différente de celle rapportée précédemment dans la littérature. Ces différences observées proviendraient des modes de synthèse des matériaux et/ou des conditions de mesures expérimentales. La composition optimale : $\text{Gd}_2\text{O}_2\text{S}:\text{Eu}^{3+}$ (5 mol.%) déterminée ici pour nos particules sera alors utilisée dans la suite de nos travaux.

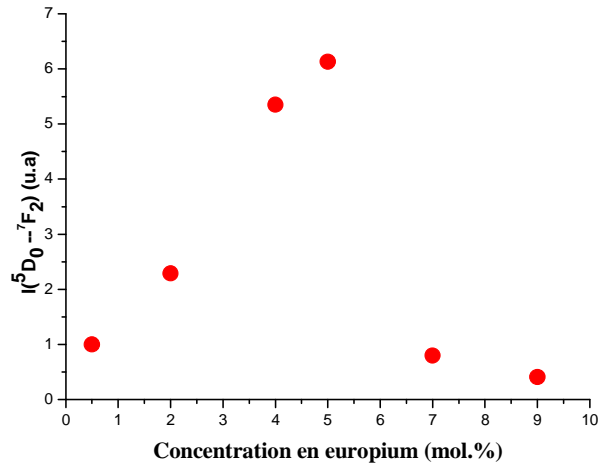


Figure III.26. Graphe montrant l'évolution de l'intensité de la bande d'émission ($^5D_0 \rightarrow ^7F_2$) en fonction de la teneur en europium exprimée en $\frac{[Eu^{3+}]}{([Gd^{3+}] + [Eu^{3+}])} = x \text{ mol. \%}$ des NPs de $Gd_2O_2S :Eu^{3+}$

L'étude sous excitation X des propriétés de luminescence des NPs de $Gd_2O_2S :Eu^{3+}$ a été également faite. La figure III.27 montre le spectre d'émission des NPs de $Gd_2O_2S :Eu^{3+}$ sous excitation X. Toutes les transitions $^5D_0 \rightarrow ^7F_J$ ($J = 0, 1, 2, 3$ et 4) de l' Eu^{3+} observées sous excitation UV sont présentes et la bande d'émission la plus intense est également centrée à 624 nm.

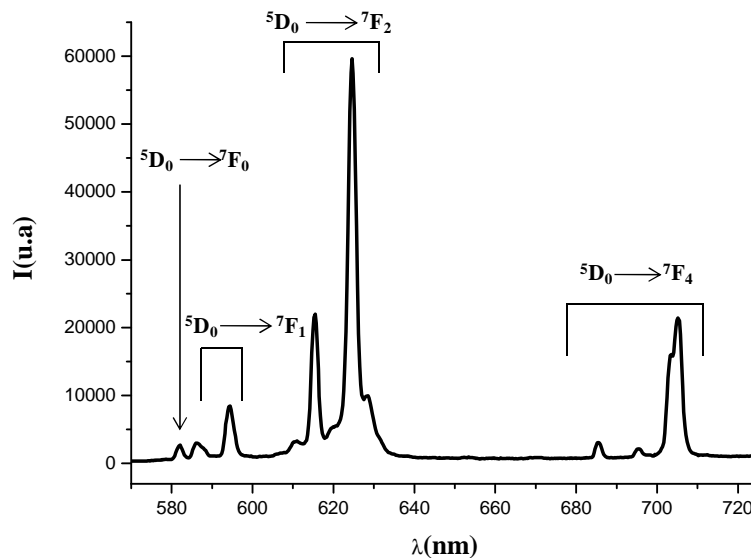


Figure III.27. Spectre d'émission des NPs de $Gd_2O_2S :Eu^{3+}$ sous excitation X

Ces résultats montrent que les NPs de $Gd_2O_2S :Eu^{3+}$ synthétisées par précipitation suivie d'une sulfuration sont de bonnes candidates pour des applications en marquage biologique, imagerie et en

PhotoThérapie activée par rayons X. Ce dernier aspect qui, dépasse ma thèse, est encore totalement confidentiel à l'heure où j'écris ces lignes et ne sera pas développé dans ce document.

III.2.3. Synthèse et caractérisation des NPs de $\text{Ho}_2\text{O}_2\text{S} : \text{Eu}^{3+}$ et $\text{Dy}_2\text{O}_2\text{S} : \text{Eu}^{3+}$

Comme nous avons synthétisé des NPs de $\text{Ho}_2\text{O}_3 : \text{Eu}^{3+}$ et $\text{Dy}_2\text{O}_3 : \text{Eu}^{3+}$ au paragraphe III.1.2, les NPs d'oxysulfure correspondantes ont été également préparées par la même méthode décrite au paragraphe III.2.2 afin d'être testées comme marqueurs luminescents.

La figure III.28 montre les diffractogrammes des matériaux préparés. L'indexation de ces raies dans la base de données ICDD, nous a permis d'identifier la fiche No : 025-1143 correspondant à la phase hexagonale de l'oxysulfure d'holmium : $\text{Ho}_2\text{O}_2\text{S}$ (figure III.28.a) et la fiche No : 026-0592 correspondant à la phase hexagonale de l'oxysulfure de dysprosium : $\text{Dy}_2\text{O}_2\text{S}$ (figure III.28.b).

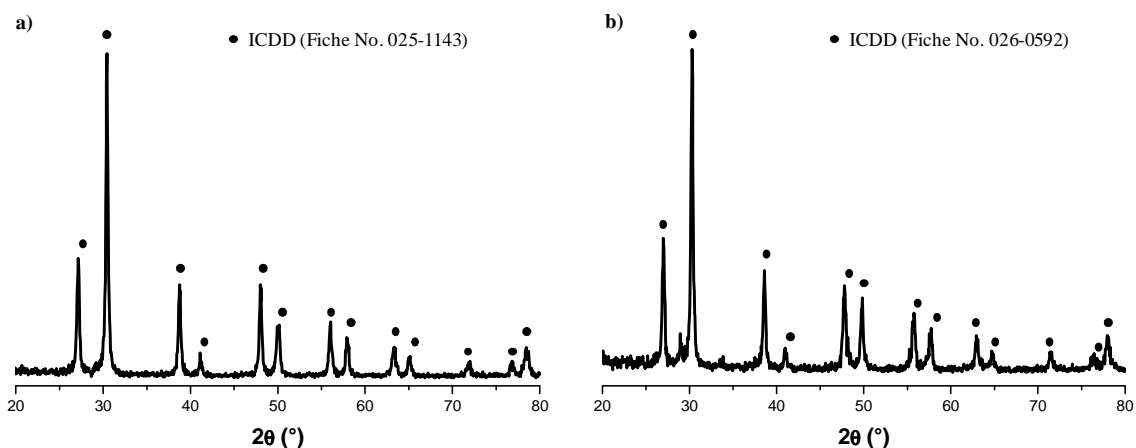


Figure III.28. Diffractogrammes des NPs de : (a) $\text{Ho}_2\text{O}_2\text{S} : \text{Eu}^{3+}$ et (b) $\text{Dy}_2\text{O}_2\text{S} : \text{Eu}^{3+}$.

Les images MET des NPs de $\text{Ho}_2\text{O}_2\text{S} : \text{Eu}^{3+}$ et $\text{Dy}_2\text{O}_2\text{S} : \text{Eu}^{3+}$ obtenues sont présentées dans la figure III.26. Les particules sont sphériques, monodisperses en taille et de diamètre égal à 53 nm (écart type = 3 nm) pour $\text{Ho}_2\text{O}_2\text{S} : \text{Eu}^{3+}$ (figure III.29.a-b) et 170 nm (écart type = 18 nm) pour $\text{Dy}_2\text{O}_2\text{S} : \text{Eu}^{3+}$ (figure III.29.c-d).

Comme nous l'avons remarqué dans le cas des oxydes, les NPs de $\text{Ho}_2\text{O}_2\text{S} : \text{Eu}^{3+}$ et $\text{Dy}_2\text{O}_2\text{S} : \text{Eu}^{3+}$ ne sont pas du tout luminescentes sous excitation à 363 nm.

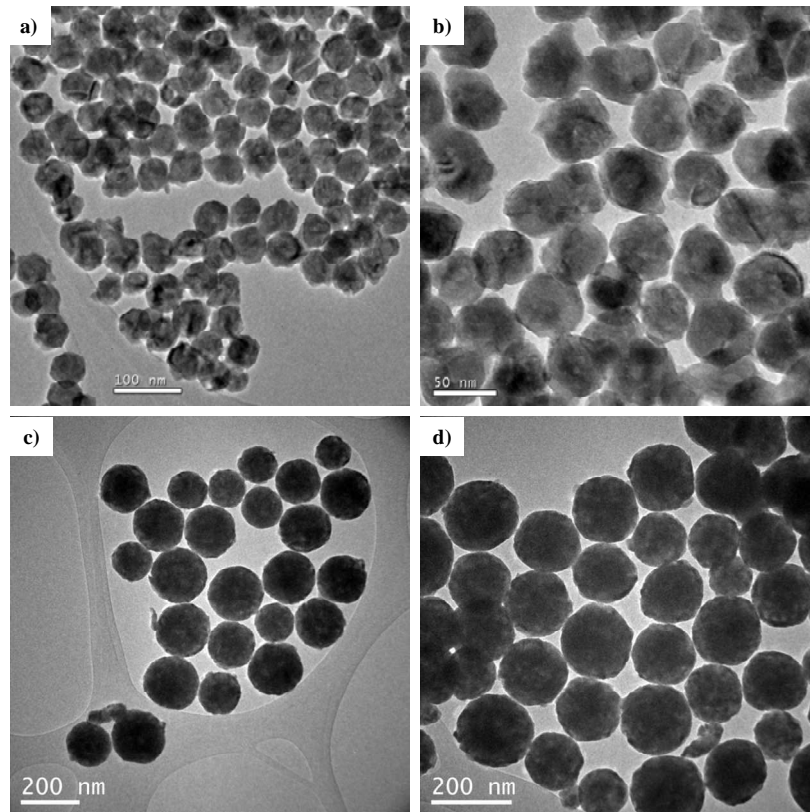


Figure III.29. Images MET des NPs de : (a-b) $\text{Ho}_2\text{O}_2\text{S} : \text{Eu}^{3+}$ et (c-d) $\text{Dy}_2\text{O}_2\text{S} : \text{Eu}^{3+}$.

III.2.4. NPs à base de $\text{Gd}_2\text{O}_2\text{S}$ pour l' « up-conversion »

Les NPs de $\text{Gd}_2\text{O}_2\text{S} : \text{Er} ; \text{Yb}$ ont été synthétisées par le procédé décrit au paragraphe III.2.1 et l'étude du phénomène d' « up-conversion » a été faite sur les NPs de $\text{Gd}_2\text{O}_2\text{S} : \text{Er} ; \text{Yb}$ (1 ; 8%) comme pour les NPs d'oxyde de gadolinium.

III.2.4.1. Sous excitation NIR

La figure III.30 présente le spectre d'émission des NPs de $\text{Gd}_2\text{O}_2\text{S} : \text{Er} ; \text{Yb}$ (1 ; 8%) sous excitation NIR ($\lambda_{\text{exc}} = 980 \text{ nm}$ et $P = 800 \text{ mW}$). Lorsque les NPs sont excitées par un rayonnement NIR (980 nm), la luminescence par « up-conversion » est visible à l'œil nu avec une forte émission de couleur jaune verdâtre. Le spectre d'émission présente plusieurs raies autour de 530 nm, 550 nm et 670 nm correspondant respectivement aux transitions ${}^2\text{H}_{11/2} \rightarrow {}^4\text{I}_{15/2}$, ${}^4\text{S}_{3/2} \rightarrow {}^4\text{I}_{15/2}$ et ${}^4\text{F}_{9/2} \rightarrow {}^4\text{I}_{15/2}$ de l'ion Er^{3+} . Les transitions ${}^2\text{H}_{11/2} \rightarrow {}^4\text{I}_{15/2}$ et ${}^4\text{S}_{3/2} \rightarrow {}^4\text{I}_{15/2}$ sont bien visibles, contrairement à ce que nous avons observé dans le cas de l'oxyde $\text{Gd}_2\text{O}_3 : \text{Er} ; \text{Yb}$ (1 ; 8%). Ces résultats permettent d'expliquer l'émission de couleur jaune verdâtre observée. En effet, l'émission dans le vert étant plus importante que celle observée dans le cas de l'oxyde $\text{Gd}_2\text{O}_3 : \text{Er} ; \text{Yb}$ (1 ; 8%); la combinaison des couleurs : rouge

et vert engendre une couleur intermédiaire. Néanmoins, l'émission dans le rouge profond (≈ 670 nm) reste dominante.

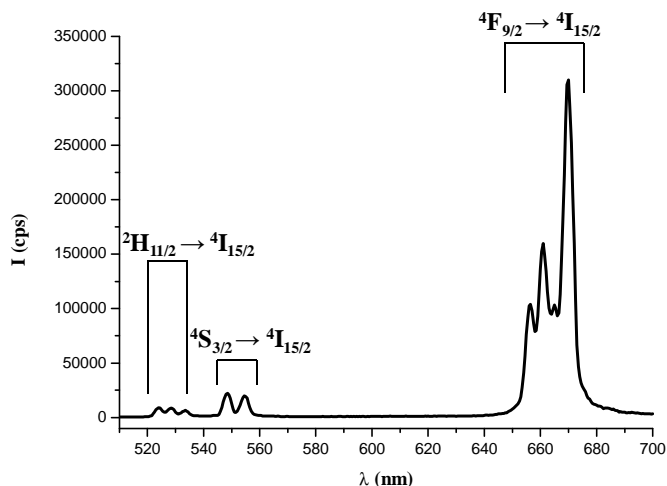


Figure III.30. Spectre d'émission de poudre de NPs de $Gd_2O_2S : Er ; Yb (1 ; 8\%)$ sous une excitation ($\lambda_{exc} = 980$ nm et $P = 800$ mW)

Le nombre de photons NIR impliqués dans le processus d' « up-conversion » des NPs de $Gd_2O_2S : Er ; Yb (1 ; 8\%)$ a été également déterminé. Les intensités d'émission dans le visible des transitions $^4S_{3/2} \rightarrow ^4I_{15/2}$ et $^4F_{9/2} \rightarrow ^4I_{15/2}$ ont été enregistrées pour différentes puissances d'excitation à 980 nm (figure III.31). Pour les transitions dans le vert et rouge, l'émission varie globalement comme le carré de l'excitation. La luminescence des NPs de $Gd_2O_2S : Er ; Yb (1 ; 8\%)$ se fait donc bien par un processus à 2 photons comme nous l'avons montré dans le cas de l'oxyde $Gd_2O_3 : Er ; Yb (1 ; 8\%)$.

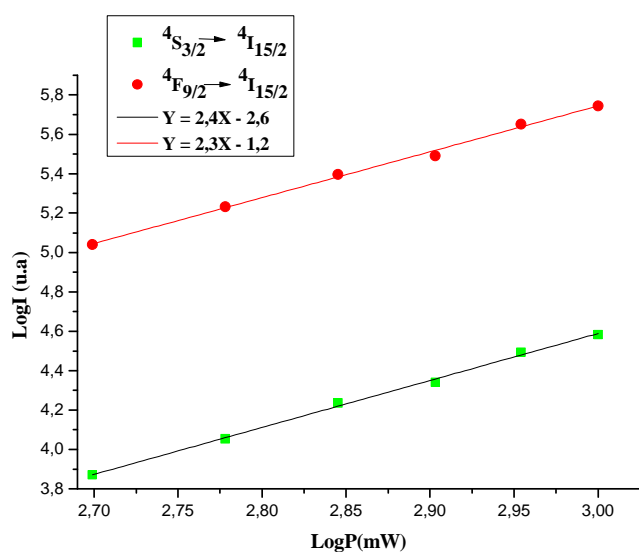


Figure III.31. Évolution des intensités des transitions $^4S_{3/2} \rightarrow ^4I_{15/2}$ et $^4F_{9/2} \rightarrow ^4I_{15/2}$ des NPs de $Gd_2O_2S : Er ; Yb (1 ; 8\%)$ en fonction de la puissance d'excitation

La figure III.32 montre la comparaison des spectres d'émission des NPs de $Gd_2O_2S: Er; Yb$ (1 ; 8%) et $Gd_2O_3: Er; Yb$ (1 ; 8%). Nous remarquons bien qu'à puissance d'excitation égale, l'intensité de luminescence est plus importante que celle des oxydes. Dans le cas des oxysulfures, le maximum d'intensité est à 670 nm contrairement à l'oxyde où il est à 660 nm. Donc les NPs d'oxysulfure sont plus intéressantes pour des applications en imagerie *in vivo* en raison de leur forte luminescence et leur longueur d'onde d'émission qui se situe dans le « domaine de transparence » des tissus biologiques (650-1200 nm).

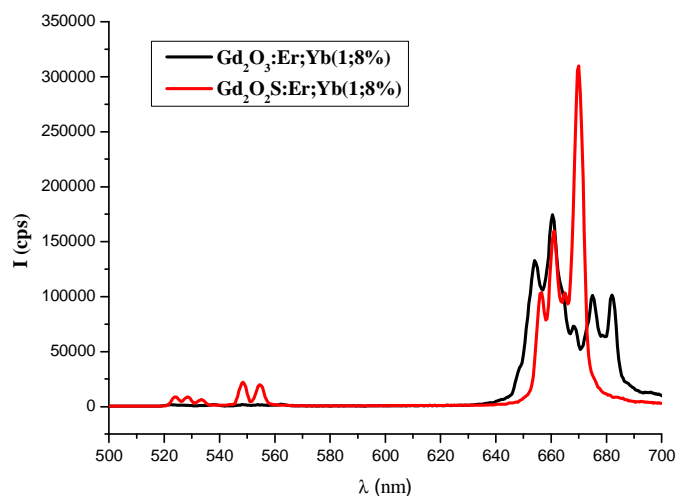


Figure III.32. Comparaison des spectres d'émission des matériaux à puissance d'excitation égale.

III.2.4.2. Sous excitation UV

Les propriétés d'émission des NPs de $Gd_2O_2S: Er; Yb$ (1 ; 8%) ont été observées sous excitation UV. Le spectre d'excitation observé à 670 nm (figure III.33.a) présente une bande d'excitation centrée sur 380 nm (bande d'excitation directe de l'ion Er^{3+}) attribuable à la transition $^4I_{15/2} \rightarrow ^4G_{11/2}$.

Sous excitation à 380 nm (figure III.33.b), nous observons plusieurs raies autour de 530 nm, 550 nm et 670 nm correspondant respectivement aux transitions $^2H_{11/2} \rightarrow ^4I_{15/2}$, $^4S_{3/2} \rightarrow ^4I_{15/2}$ et $^4F_{9/2} \rightarrow ^4I_{15/2}$ de l'ion Er^{3+} .

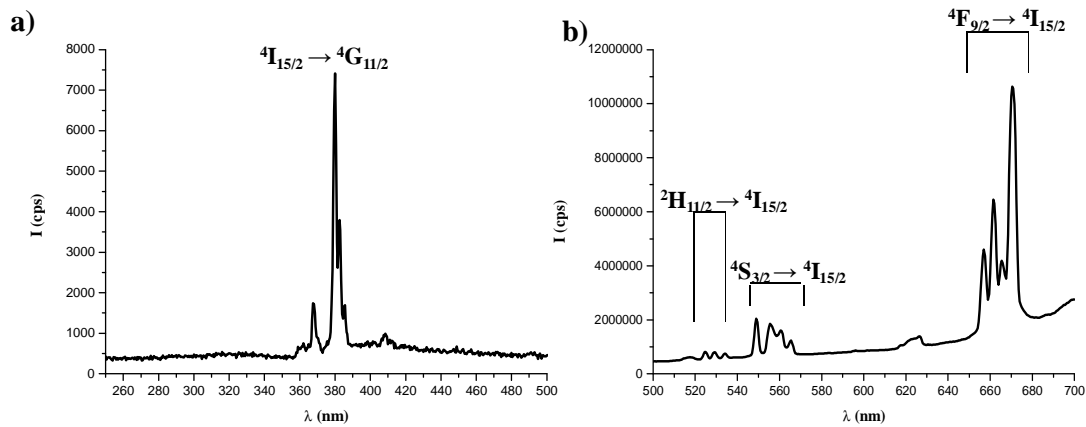


Figure III.33. Spectres : (a) d'excitation observé à 670 nm et (b) d'émission à $\lambda_{exc} = 380$ nm des NPs de $Gd_2O_2S : Er ; Yb (1 ; 8\%)$

III.2.5. Émission des NPs de $Gd_2O_2S (Ln = Dy \text{ et } Ho) : Er ; Yb$

La figure III.34 présente les spectres d'émission des NPs de $Dy_2O_2S : Er ; Yb (1 ; 8\% .mol)$ et $Ho_2O_2S : Er ; Yb (1 ; 8\% .mol)$ sous excitation NIR ($\lambda_{exc} = 980$ nm et $P = 1500$ mW).

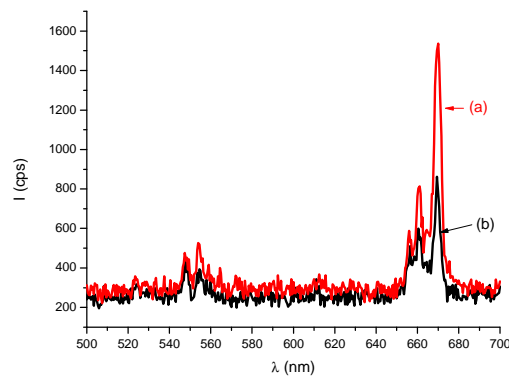


Figure III.34. Spectres d'émission des NPs de: (a) $Ho_2O_2S : Er ; Yb (1 ; 8\% .mol)$ et (b) $Dy_2O_2S : Er ; Yb (1 ; 8\% .mol)$ sous excitation NIR ($\lambda_{exc} = 980$ nm et $P = 1500$ mW).

Les spectres d'émission présentent les différentes transitions de l'ion Er^{3+} observées dans le cas de Ho_2O_3 et Dy_2O_3 . La luminescence de ces deux matériaux reste toujours relativement faible comme nous l'avons observé dans le cas des oxydes correspondants. Cela pourrait s'expliquer par un couplage entre l'ion Er^{3+} et les niveaux électroniques du dysprosium ou de l'holmium.

III.3. Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons optimisé un procédé de synthèse de différentes NPs luminescentes de Ln_2O_3 et $\text{Ln}_2\text{O}_2\text{S}$ ($\text{Ln} = \text{Gd}, \text{Dy}$ et Ho), sphériques et monodisperses en taille. Le diamètre des NPs obtenues est compris entre 50 nm et 170 nm.

Si les NPs de $\text{Gd}_2\text{O}_2\text{S}:\text{Eu}^{3+}$ et $\text{Gd}_2\text{O}_3:\text{Eu}^{3+}$ sont fortement luminescentes sous excitation UV, les NPs de $\text{Ln}_2\text{O}_3:\text{Eu}^{3+}$ et $\text{Ln}_2\text{O}_2\text{S}:\text{Eu}^{3+}$ ($\text{Ln} = \text{Dy}$ et Ho) quant à elles ; ont révélé une faible luminescence sous excitation UV.

Les NPs de $\text{Gd}_2\text{O}_3:\text{Er}; \text{Yb}$ et $\text{Gd}_2\text{O}_2\text{S}:\text{Er}; \text{Yb}$ sont aussi bien excitables en UV (400 et 380 nm) que dans le NIR (980 nm). Ce qui fait d'elles **des NPs très versatiles** utilisables aussi bien pour l'imagerie *in vivo* qu'*in vitro*. Les études faites ont montré que ce phénomène était le plus efficace pour un dopage de 8% en ions Yb^{3+} et 1% en ions Er^{3+} . Sous excitation laser (980 nm), l'émission des NPs est constituée majoritairement d'une bande intense dans le rouge (autour de 660 nm pour l'oxyde et 670 nm pour l'oxysulfure). L'intensité de l'émission visible varie bien comme le carré de la puissance de l'excitation proche infrarouge (processus à 2 photons). Par ailleurs, les résultats obtenus avec le dysprosium et l'holmium montrent une luminescence toujours relativement faible.

Ces résultats sont donc fortement encourageants en ce qui concerne l'élaboration de NPs à « up-conversion ». À ce jour, la majorité des études sur le sujet se sont portées sur l'élaboration de nanocristaux $\beta\text{-NaYF}_4:\text{Yb}; \text{Er}$ et à leur fonctionnalisation. Nos NPs de $\text{Gd}_2\text{O}_2\text{S}:\text{Er}; \text{Yb}$ sont plus intéressantes pour des applications en imagerie *in vivo* en raison de leur forte luminescence et leur longueur d'onde d'émission qui se situe dans le « domaine de transparence » des tissus biologiques (650-1200 nm).

Ainsi, nous utiliserons les NPs synthétisées ici ($\text{Gd}_2\text{O}_2\text{S}:\text{Eu}^{3+}$, $\text{Dy}_2\text{O}_2\text{S}:\text{Eu}^{3+}$ et $\text{Ho}_2\text{O}_2\text{S}:\text{Eu}^{3+}$) pour les différentes applications (marquage biologique, imagerie par résonance magnétique nucléaire et en tomographie par rayons X) visées dans les chapitres à venir.

CHAPITRE IV :
FONCTIONNALISATION DE
SURFACE

CONTENU

IV.1. Rappel bibliographique.....	74
IV.2. Revêtement des NPs par une couche de silice aminée ou mésoporeuse.....	76
IV.1.1. Principe et méthode.....	76
IV.1.2. Résultats et discussions.....	77
IV.3. Revêtement des NPs par une couche de silice mésoporeuse.....	81
IV.2.1. Principe et méthode.....	81
IV.2.2. Résultats et discussions.....	82
IV.4. Conclusion.....	84

Comme nous l'avons évoqué dans le chapitre I, il est nécessaire de modifier chimiquement la surface des NPs afin de la rendre plus réactive vis-à-vis des récepteurs biologiques mais aussi pour augmenter la durée de vie de ces NPs dans le compartiment sanguin. Dans ce chapitre, nous ferons dans une 1^{ère} partie un rappel bibliographique sur quelques procédés permettant de modifier la surface des NPs puis dans une 2^{ème} partie seront présentés et discutés les résultats obtenus pour les procédés de revêtement retenus.

IV.1. Rappel bibliographique

Dans la littérature, un grand nombre de procédés permettent de modifier chimiquement la surface des particules en solution. Le plus répandu consiste en une polymérisation inorganique par voie sol-gel de divers précurseurs (organo)alcoxysilanes ($R_xSi(OR')_{4-x}$ avec $x=0,1,2$) qui aboutit à la formation d'une couche de polysiloxane couvrante. Différents matériaux nanométriques ont été étudiés. Par exemple, Gelamos et *al.*¹⁴³ ont montré la possibilité de conjuguer la protéine BSA (Bovine Serum Albumin) avec des particules de $Y_2O_2S:Er,Yb$ amino-fonctionnalisées. Les particules de $Y_2O_2S:Er,Yb$ ont été recouvertes par une couche de silice aminée formée par voie sol-gel par condensation du tétraéthylorthosilicate (TEOS) et d'un organoalcoxysilane fonctionnalisé (3-aminopropyl-triéthoxysilane (APTS)). La réaction de condensation a été effectuée dans un mélange eau/éthanol à pH=10 à 30°C pendant 24 h.

Wang et *al.*¹⁴⁴ ont synthétisé des NPs de $NaYF_4:Yb,Er$ pour applications en imagerie cellulaire et en immuno-marquage (procédé permettant de localiser dans les tissus un antigène spécifique à un anticorps greffé sur les particules luminescentes). Pour rendre réactive la surface des NPs de $NaYF_4:Yb,Er$, une couche de silice aminée (5 nm d'épaisseur) a été formée par voie sol-gel à leur surface par condensation du TEOS et du 3-aminopropyl-triméthoxysilane (APTMS) en milieu basique et dans un mélange eau/propanol à 35°C pendant 5 h. Sur ces mêmes particules, Lu et *al.*¹⁴⁵ ont montré la possibilité de recouvrir leur surface d'une couche de silice aminée (30 nm d'épaisseur) par voie sol-gel. La couche de silice aminée a été également formée par condensation du TEOS et du 3-aminopropyl-triméthoxysilane (APTMS) en milieu basique et dans un mélange eau/propanol à 40°C pendant 4h.

Plusieurs groupes de recherche ont également effectués des travaux sur la formation d'une couche de silice mésoporeuse autour des particules. C'est le cas de Gorelikov et *al.*¹⁴⁶ qui, au cours de leurs travaux, ont montré la possibilité d'enrober des NPs d'or d'une couche de silice mésoporeuse. Des nano bâtonnets d'or dont la surface est couverte du bromure de cetyltriméthylammine (CTAB) ont été enrobés d'une couche de silice mésoporeuse (15 nm d'épaisseur) formée par condensation du TEOS et des molécules de CTAB. Le CTAB a servi non seulement de surfactant pour stabiliser les

NPs en phase aqueuse mais aussi de « template » pour la formation de la couche de silice mésoporeuse. Cette couche de silice est assez poreuse pour permettre l'interaction entre la NP du cœur et son environnement. Elle peut également servir de plateforme pour le greffage ultérieur d'autres molécules.

Qian et al.¹⁴⁷ ont synthétisé des NPs de NaYF₄:Yb,Er enrobées d'une double couche (12 nm d'épaisseur) : de silice et de silice mésoporeuse pour applications en imagerie et en Thérapie PhotoDynamique (PDT). La 1^{ère} couche (couche de silice) est formée par réaction d'hydrolyse du TEOS à la surface des particules pendant 2 jours alors que la 2^{ème} couche (couche de silice mésoporeuse) est formée par condensation du TEOS et d'un surfactant : octadécyltriméthoxysilane (C18TMS). La réaction de formation de la couche de silice mésoporeuse a été faite en milieu basique pendant 6 h. Le surfactant est éliminé par calcination des particules obtenues à 500°C (1°C/ min) pendant 7h. Il a été montré une bonne incorporation du photosensibilisateur dans les mésopores de la couche de silice autour des particules ce qui a permis une bonne interaction entre la particule et le photosensibilisateur lors de la PDT.

D'autres parts, Kim et al.¹⁴⁸ ont synthétisé des NPs de Fe₃O₄ enrobées d'une couche de silice mésoporeuse pour la résonance magnétique et l'imagerie de fluorescence. La couche de silice mésoporeuse est également formée par condensation entre le TEOS et le CTAB. Le CTAB est éliminé par chauffage sous reflux d'éthanol à pH=1,4. Ces particules « core-shell » peuvent être aussi utilisées pour la délivrance de médicaments. La couche poreuse externe pouvant servir de réservoir au médicament.

En tenant compte des résultats trouvés dans la littérature, nous avons envisagé la fonctionnalisation des nanoparticules d'oxysulfure de gadolinium dopé à l'euporium par enrobage des particules d'une couche de silice aminée par hydrolyse-condensation de tétraéthylorthosilicate (TEOS) et d'organoalcoxysilane fonctionnalisé (3-aminopropyltriméthoxysilane (APTMS)) d'une part, et d'autre part par enrobage d'une couche de silice mésoporeuse par hydrolyse-condensation du TEOS et d'un surfactant : le CTAB. Le tableau IV.1 récapitule les précurseurs retenus pour l'enrobage de nos NPs.

Tableau IV.1. Récapitulatif des précurseurs retenus pour l'enrobage de NPs luminescentes

TEOS (Tétraéthylorthosilicate)	$\text{Si}(\text{OC}_2\text{H}_5)_4$
APTMS (3-aminopropyltriméthoxysilane)	$\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_3\text{-Si}(\text{OCH}_3)_3$
CTAB (Bromure de cetyltriméthylamine)	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{15}\text{N}(\text{Br})(\text{CH}_3)_3$

L'utilisation d'APTMS permet d'introduire dans la couche de polysiloxane des groupements amines réactifs qui serviront ultérieurement de sites de couplage. Le surfactant CTAB sert de « template » pour la formation de la couche de silice mésoporeuse.

IV.2. Revêtement des NPs par une couche de silice aminée

IV.2.1. Principe et méthode

Les nanoparticules d'oxysulfure de gadolinium dopé par des ions europium ont été synthétisées selon la méthode optimisée au chapitre III. Pour l'optimisation du protocole d'enrobage, des NPs de $Gd_2O_2S :Eu^{3+}$ sphériques, monodisperses en taille et de diamètre moyen égal à 94 nm (écart-type de 10 nm) ont été utilisées. Le procédé d'enrobage utilisé est une adaptation des travaux de Stöber *et al.*⁶⁸

Deux précurseurs ont été choisis selon deux critères principaux : leur réactivité et les groupements accessibles pour la fonctionnalisation. Un mélange de deux types de précurseurs du polysiloxane est utilisé pour l'enrobage :

- L'APTMS, après hydrolyse et la formation de polysiloxane autour des particules, permet d'envisager un greffage par l'apport de groupements actifs ($-NH_2$) en surface.
- Le TEOS, très réactif, permet de réticuler la couche protectrice initiée et de la rendre plus compacte.

L'optimisation du procédé est basée sur le rapport APTMS/TEOS, le contrôle de la quantité d'eau ou de base ajoutée lors de l'hydrolyse et la température de chauffage.¹⁴⁹

Environ 30 mg de NPs de $Gd_2O_2S :Eu^{3+}$ sont dispersées aux ultrasons dans 80 mL de propan-1-ol pendant 2 h. Ensuite 8,94 mL d'ammoniaque (28 % .mass), 7,5 mL d'eau distillée et différents volumes $V = (0,025, 0,05 \text{ et } 0,1 \text{ mL})$ de TEOS sont ajoutés à la suspension de particules. Le mélange est maintenu à $40^\circ C$ dans un bain d'huile sous agitation. Après 2 h de réaction, 0,1 mL d'APTMS est rajouté au mélange et la réaction est complétée sous agitation pendant 1h. Les NPs obtenues sont séparées par centrifugation (3500 trs/min pendant 10 min) et séchées à $80^\circ C$ durant 12h. Les NPs de $Gd_2O_2S :Eu^{3+}$ enrobées dans une couche de silice aminée : $Gd_2O_2S :Eu^{3+}@SiO_2\text{-APTMS}$ sont alors obtenues. La figure IV.1 schématise la réaction générale d'enrobage des nanoparticules dans une couche de silice aminée.

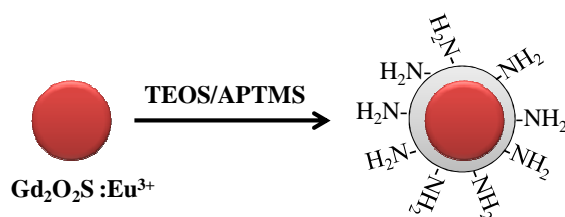


Figure IV.1. Principe général d'enrobage de NPs de $Gd_2O_2S :Eu^{3+}$ par une couche de silice aminée

Nous ferons remarquer ici que l'APTMS est ajouté 2 h après le TEOS de telle manière à former en premier lieu une couche dense protectrice de silice pure avant d'ajouter les fonctions amines à la surface.

IV.2.2. Résultats et discussions

Les images MET des NPs de $Gd_2O_3:Eu^{3+}@SiO_2$ -APTMS présentées sur la figure IV.2 montrent pour $V_{(TEOS)} = 0,1$ mL, la présence de NPs de $Gd_2O_3:Eu^{3+}$ co-encapsulées par une couche de silice aminée d'épaisseur ≈ 30 nm et quelques agrégats de particules de silice par endroits (figure IV.a-b).

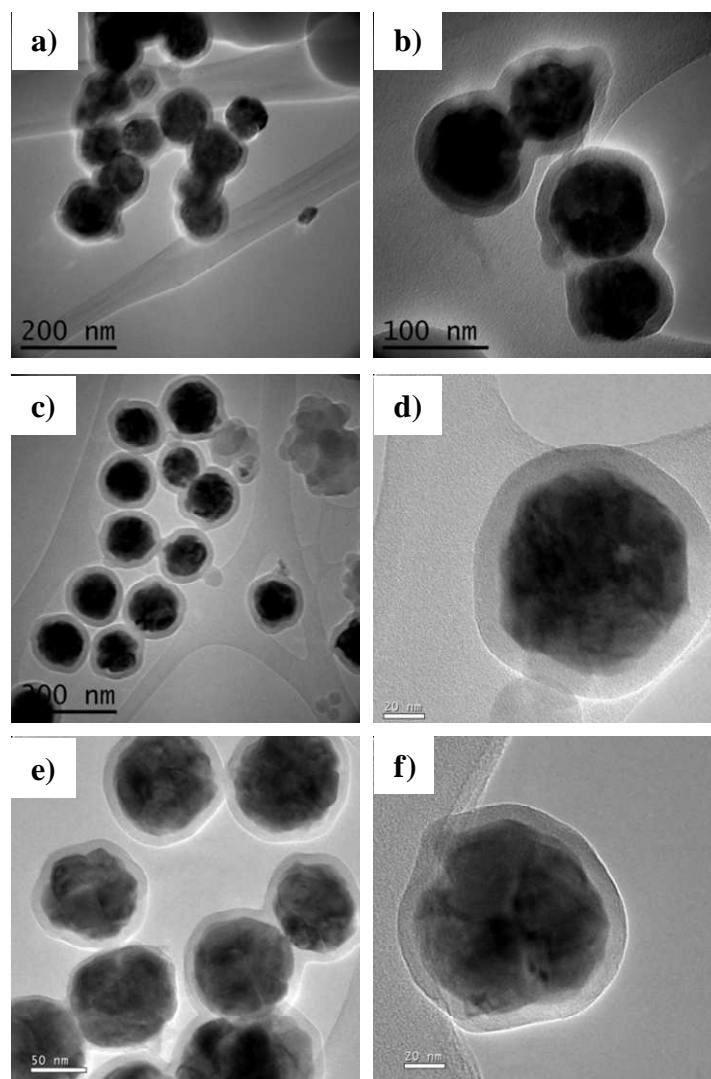


Figure IV.2. Images MET de $Gd_2O_3:Eu^{3+}@SiO_2$ -APTMS avec $V_{(TEOS)} = 0,1$ mL (a-b), 0,05 mL (c-d) et 0,025 mL (e-f)

Lorsque le volume de TEOS $V_{(TEOS)}$ décroît de 0,1 à 0,025 mL, les particules sont couvertes d'une couche de silice aminée dont l'épaisseur varie respectivement de 30 à 10 nm (figure IV.2.a-f). A $V_{(TEOS)} = 0,025$ mL, le revêtement est bien régulier et il n'y a pas d'agrégats de particules. Ces résultats montrent bien que l'épaisseur de la couche de silice peut être contrôlée par changement de quelques paramètres expérimentaux tels que la quantité de TEOS. Le tableau IV.2 résume les observations effectuées en fonction du rapport entre la quantité d'APTMS et de TEOS utilisé. Le meilleur revêtement est obtenu pour $N_{APTMS}/N_{TEOS} = 5$. Ces conditions seront utilisées dans la suite de nos travaux.

Tableau IV.2. Récapitulatif des précurseurs retenus pour l'enrobage de NPs lumineuses

$V_{TEOS}(mL)$	N_{TEOS} (mol/mol de Gd_2O_2S)	N_{APTMS} (mol/mol de Gd_2O_2S)	N_{APTMS}/N_{TEOS}	Observations
0,1	5,65	7,23	1,28	Présence d'agglomérats Epaisseur = 30 nm
0,05	2,83	7,23	2,55	Pas d'agglomérats. Bon revêtement Epaisseur = 18 nm
0,025	1,41	7,23	5,13	Pas d'agglomérats. Bon revêtement Epaisseur = 10 nm

La figure IV.3 présente les spectres IR des NPs de $Gd_2O_2S :Eu^{3+}$ avant et après le revêtement par une couche de silice aminée.

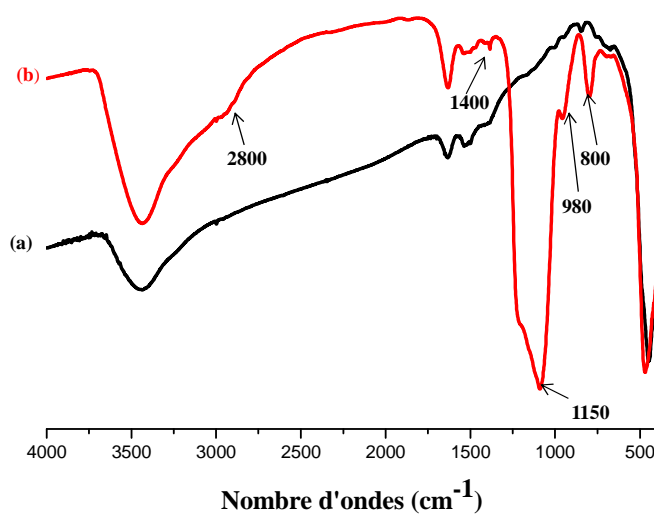


Figure IV.3. Spectres IR de NPs de $Gd_2O_2S :Eu^{3+}$: (a) avant et (b) après ; revêtement de silice aminée

Après revêtement (figure IV.3.b), il y a apparition de 2 nouvelles bandes : la 1^{ère} intense centrée à 1150 cm⁻¹ et la 2^{ème} moins intense à 800 cm⁻¹ attribuables toutes deux aux vibrations du réseau Si—O—Si. Il y a également la présence d'un épaulement à 980 cm⁻¹ attribuable aux vibrations Si—OH ainsi que de faibles bandes caractéristiques entre 2700-3000 cm⁻¹ et 1400-1450 cm⁻¹, attribuables aux vibrations C—H de la couche d' « amino-silane ».

Quantification du nombre de groupes (—NH₂) à la surface des NPs de Gd₂O₃:Eu³⁺@SiO₂-APTMS

Le nombre de groupes (—NH₂) réactifs à la surface des NPs de Gd₂O₃:Eu³⁺@SiO₂-APTMS est un paramètre fondamental pour un greffage ultérieur de molécules biologiques. Il a été déterminé par réaction de couplage entre les NPs et la Fluoroscéine Isothiocyanate (FITC). Cette molécule est un colorant organique (excitable à 490 nm/émission à 525 nm) ayant une grande affinité avec les fonctions amines sur lesquelles la réaction de couplage se fait mole à mole (figure IV.4). Le protocole de dosage utilisé est une adaptation de ceux utilisés par Nichkova et *al.*¹⁵⁰ et dans les références 136,¹⁵¹.

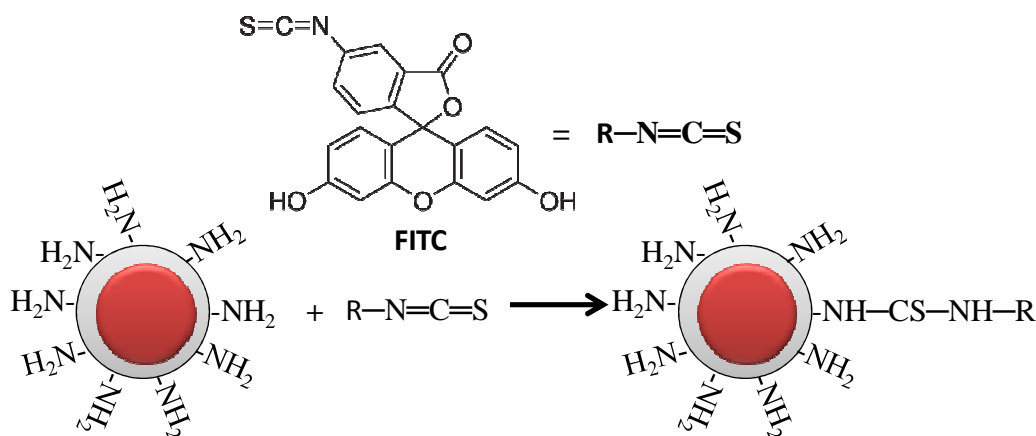


Figure IV.4. Réaction de couplage entre le FITC et les groupements actifs NH₂ à la surface des NPs.

Environ 3 mg de NPs de Gd₂O₃:Eu³⁺@SiO₂-APTMS sont mises en suspension dans du DMF à une concentration de 1 mg/mL, puis un volume de 10 µL de triéthylamine (TEA) à 0,1 mol.L⁻¹ et 300 µL d'une solution de FITC (1,4*10⁻² mol.L⁻¹) sont rajoutés. La TEA est une base faible permettant de rendre légèrement basique le milieu afin que les fonctions amines présentes à la surface des particules se déprotonnent pour former NH₂ et non NH₃⁺ qui est non réactif vis-à-vis du FITC. Le mélange est agité à température ambiante à l'abri de la lumière pendant 3 h. Les particules sont ensuite séparées par centrifugation et lavées à l'éthanol (4 fois) pour éliminer l'excès de FITC. Ensuite les

particules couplées avec le FITC sont remises en suspension dans de l'éthanol à une concentration de 0,5 mg/mL.

L'intensité de fluorescence du FITC couplé avec les NPs de $Gd_2O_2S :Eu^{3+} @SiO_2-APTMS$ et celle des ions europium au sein de ces NPs ont été mesurées sous excitation UV-visible à 393 nm. En effet, à cette longueur d'onde d'excitation, nous excitons simultanément le FITC (émission à 525 nm) et légèrement les ions Eu^{3+} (émission à 625 nm) servant d'étalon interne (figure IV.5).

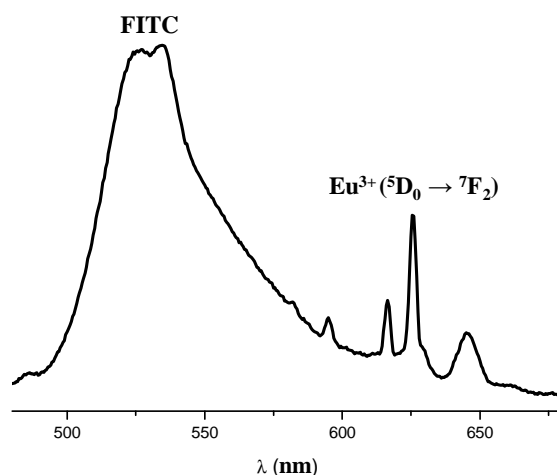


Figure IV.5. Spectre d'émission des NPs de $Gd_2O_2S :Eu^{3+} @SiO_2-APTMS$ couplées avec le FITC sous excitation à 393 nm.

Une droite d'étalonnage du FITC dans de l'éthanol contenant la même quantité de particules nues : $Gd_2O_2S :Eu^{3+}$ (tenant compte ainsi de l'effet d'atténuation sur la luminescence du FITC créé par la présence des NPs de $Gd_2O_2S :Eu^{3+}$ en solution) ; a été utilisée pour déterminer la quantité de FITC greffé à la surface des particules. L'évolution du rapport d'intensité lumineuse $I(FITC)/I(Eu^{3+})$ en fonction de $[FITC]$ est une droite reportée sur la figure IV.6, dont l'équation permet de déterminer la concentration de FITC donc d'amines accessibles dans l'échantillon analysé.

Pour des particules de 70 nm de diamètre ($Gd_2O_2S :Eu^{3+}$ de 50 nm de diamètre et revêtues d'une couche de $SiO_2-APTMS$ ayant 10 nm d'épaisseur), la quantité de fonctions (NH_2) accessibles déterminée est de $7,6 * 10^{-7}$ mol de $(NH_2)/g$ de particules ou $2,88 * 10^{-4}$ mole de $(NH_2)/mol$ de particules ou 600 molécules de $(NH_2)/particule$ ou encore $0,04$ molécule de $(NH_2)/nm^2$ si on assimile la masse molaire de $Gd_2O_2S :Eu^{3+}@SiO_2-APTMS$ à la masse molaire de $Gd_2O_2S :Eu^{3+}$. Ces résultats confortent la présence de fonctions (NH_2) à la surface des NPs. Toutefois ces concentrations varient dans la littérature selon le mode de revêtement utilisé, le type de particules, ... ; la quantité de (NH_2) dosée à la surface varie énormément dans la littérature. C'est le cas par exemple des particules de $Y_2O_2S:Er,Yb$ amino-fonctionnalisées avec $3,9 * 10^{-4}$ mol de $(NH_2)/g$ de particules¹⁴³ et des particules de

Gd₂O₃:Eu amino-fonctionnalisées avec 3,5*10⁻⁸ mol de (NH₂)/g de particules.¹⁵⁰ Lechevallier et *al.*¹⁵¹ ont également quantifié les NH₂ accessibles à la surface des NPs Re₂O₃:Eu³⁺@APTES (Re = Y, Gd). Au cours de ces travaux, les NPs utilisées ont un diamètre de 150 nm et le revêtement de couche de silice aminée a été effectué uniquement par condensation de l'APTES et non d'un mélange TEOS/APTMS comme nous l'avons fait ici. Les résultats rapportés montrent un taux d'amines accessibles de l'ordre de 0,4 molécule de (NH₂)/nm² contre 0,04 molécule de (NH₂)/nm² calculé ici. Ces différences peuvent s'expliquer par le mode de revêtement utilisé.

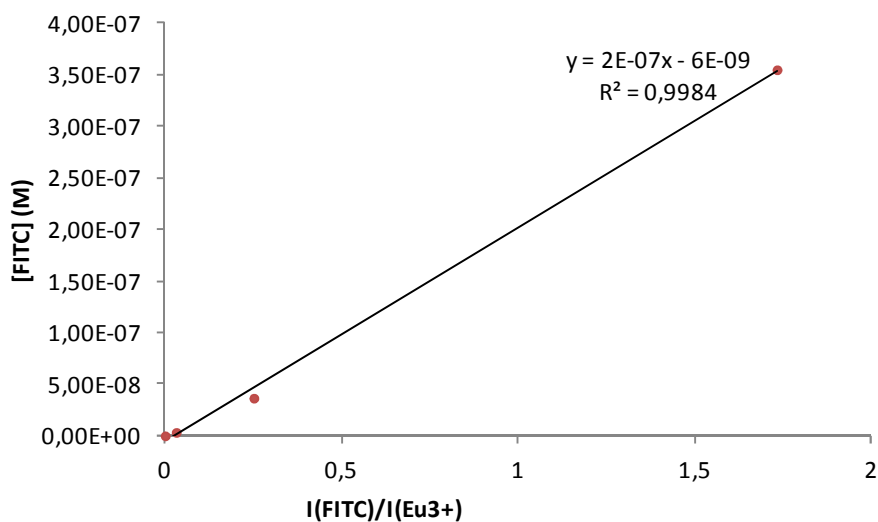


Figure IV.6. Courbe d'étalonnage représentant l'évolution de [FITC] en fonction du rapport d'intensité I(FITC)/I(Eu³⁺) suite à une excitation à 393 nm.

IV.3. Revêtement des NPs par une couche de silice mésoporeuse

IV.3.1. Principe et méthode

Pour le revêtement des NPs avec la couche de silice mésoporeuse, la quantité de TEOS optimisée dans le paragraphe IV.2 a été utilisée.

Environ 30 mg de NPs de Gd₂O₂S:Eu³⁺ sont dispersées aux ultrasons dans 80 mL de propan-1-ol pendant 2 h. Ensuite 8,94 mL de solution d'ammoniac (28 %.mass), 7,5 mL d'eau distillée et un volume V = 0,025 mL de TEOS et 100 mg de CTAB sont ajoutés à la suspension de particules. Le mélange est maintenu à 40°C dans un bain d'huile sous agitation pendant 6 h. Les NPs obtenues sont séparées par centrifugation (3500 trs/min pendant 10 min) et séchées à 80°C durant 24 h. L'excès de CTAB a été éliminé par calcination sous air des particules obtenues à 500°C (1°C/min) pendant 7 h. Les NPs de Gd₂O₂S:Eu³⁺ enrobées dans une couche de silice mésoporeuse : Gd₂O₂S:Eu³⁺@mSiO₂

sont alors obtenues. La figure IV.7 schématise la réaction générale d'enrobage des nanoparticules dans une couche de silice mésoporeuse.

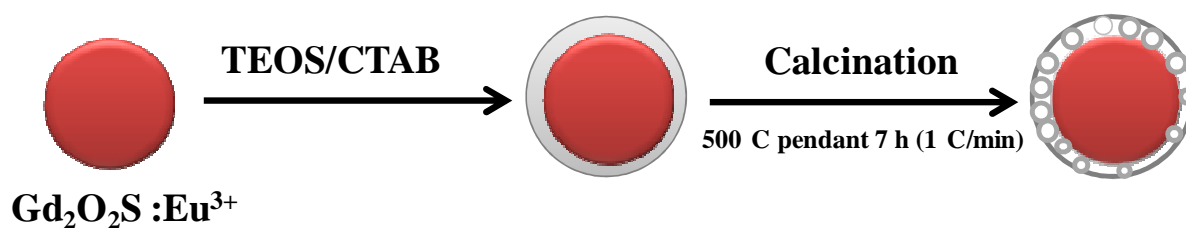


Figure IV.7. Schéma montrant la formation de NPs de $\text{Gd}_2\text{O}_2\text{S}:\text{Eu}^{3+} @\text{mSiO}_2$

IV.3.2. Résultats et discussions

Les images MET des NPs de $\text{Gd}_2\text{O}_2\text{S}:\text{Eu}^{3+} @\text{mSiO}_2$ présentées sur la figure IV.8 montrent des NPs de $\text{Gd}_2\text{O}_2\text{S}:\text{Eu}^{3+}$ enrobées par une couche de silice mésoporeuse d'épaisseur ≈ 15 nm.

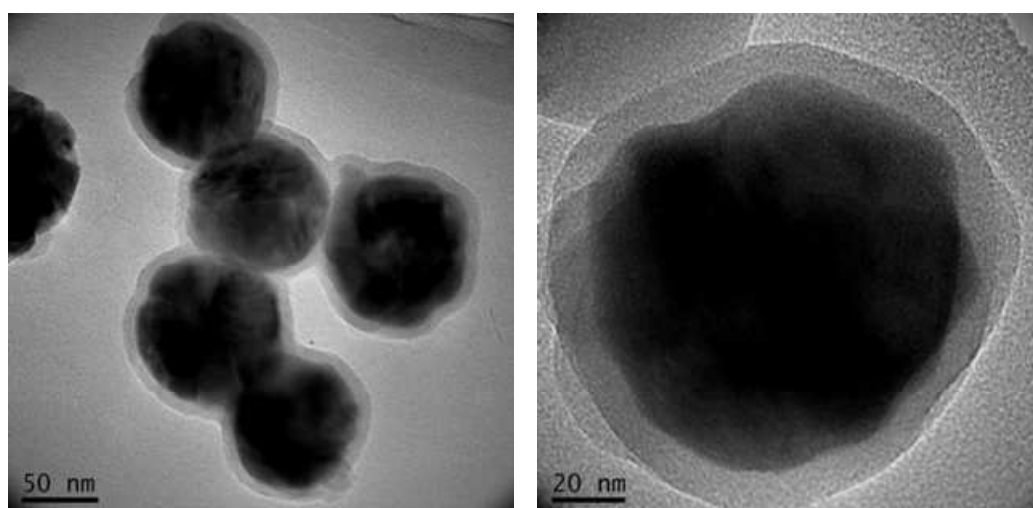


Figure IV.8. Images MET de NPs de $\text{Gd}_2\text{O}_2\text{S}:\text{Eu}^{3+} @\text{mSiO}_2$

La figure IV.9 présente les spectres IR des NPs de $\text{Gd}_2\text{O}_2\text{S}:\text{Eu}^{3+}$ avant et après le revêtement par une couche de silice mésoporeuse. Toutes les bandes identifiées dans le cas de $\text{Gd}_2\text{O}_2\text{S}:\text{Eu}^{3+} @\text{SiO}_2\text{-APTMS}$ (paragraphe IV.2.1) sont détectables sauf les faibles bandes entre $2700\text{-}3000\text{ cm}^{-1}$ et $1400\text{-}1450\text{ cm}^{-1}$ attribuables aux vibrations C—H qui ne sont pas ici détectables. Cela indique qu'il n'y a plus de traces d'éléments organiques après l'élimination du CTAB.

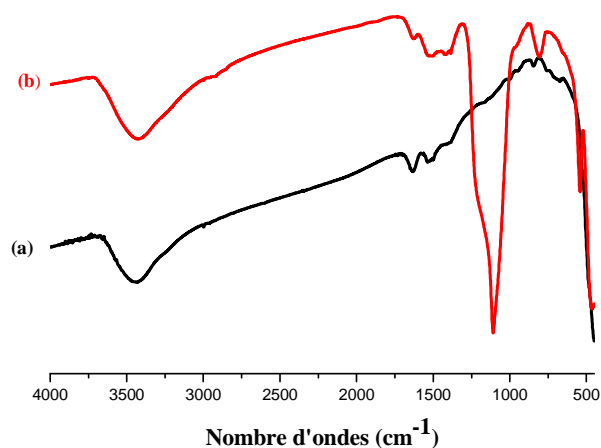


Figure IV.9. Spectres IR de NPs de $Gd_2O_2S:Eu^{3+}$: (a) avant et (b) après ; revêtement de silice mésoporeuse

Propriétés optiques des NPs après revêtement

Les spectres d'émission des NPs avant et après les 2 modes de revêtement (couche de silice aminée et couche de silice mésoporeuse) ont été reportés sur la figure IV.10. Toutes les mesures ont été effectuées sous excitation UV-visible à 363 nm avec des suspensions de particules de même concentration (3,75 mg/mL).

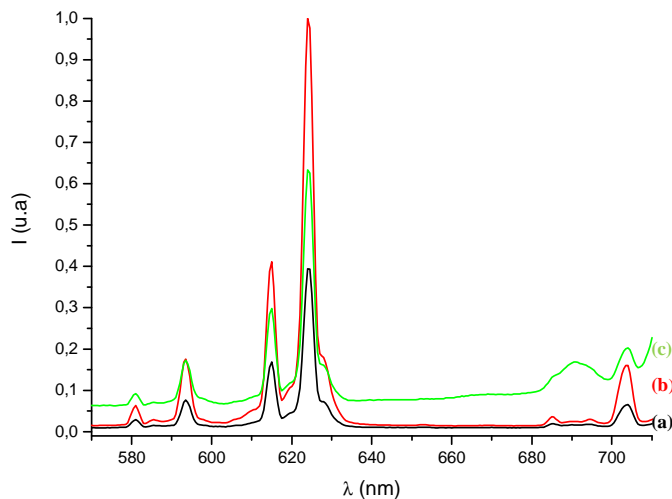


Figure IV.10. Spectres d'émission de NPs de : (a) $Gd_2O_2S:Eu^{3+}$: (b) $Gd_2O_2S:Eu^{3+}@mSiO_2$ et (c) $Gd_2O_2S:Eu^{3+}@SiO_2$ -APTMS sous excitation à 363 nm

Les spectres d'émission montrent la présence de toutes les bandes de transition de l'ion Eu^{3+} observées dans les NPs avant revêtement. Ces résultats montrent que le centre luminescent n'a subi aucune dégradation après le procédé de revêtement.

Dans le cas du revêtement par une couche de silice aminée (figure IV.10-c), nous observons un fond continu important ; au niveau de la ligne de base d'émission qui proviendrait de la couche d'« amino-silane ».

Pour les NPs revêtues d'une couche de silice mésoporeuse (figure IV-b), il n'y a pas de fond continu et toutes les transitions de l' Eu^{3+} sont significativement plus importantes (3 fois) que celles observées dans les NPs « nues ». Cette exaltation de luminescence pourrait s'expliquer par la calcination à 500°C effectuée pour éliminer le CTAB réduisant ainsi les désexcitations non radiatives des ions Eu^{3+} à la surface des NPs et par substitution des liaisons $\text{Eu}-\text{OH}$ par des liaisons $\text{Eu}-\text{O}-\text{Si}$.

Ces résultats confirment que le revêtement des particules par une couche de silice aminée ou par une couche de silice mésoporeuse préserve voire même améliore significativement leurs propriétés de luminescence.

IV.4. Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons optimisé un procédé adapté de la littérature pour l'enrobage des NPs de $\text{Gd}_2\text{O}_2\text{S}:\text{Eu}^{3+}$ d'une couche de silice d'épaisseur et de composition contrôlables. Le revêtement préserve et améliore significativement les propriétés luminescentes des NPs.

Les NPs de $\text{Gd}_2\text{O}_2\text{S}:\text{Eu}^{3+}@\text{SiO}_2\text{-APTMS}$ synthétisées constituent des nanoplateformes sur lesquelles peuvent se greffer des molécules biologiques ou pourront servir de sondes luminescentes et/ou d'agent de contraste en IRM.

Les nanoplateformes de $\text{Gd}_2\text{O}_2\text{S}:\text{Eu}^{3+}@\text{mSiO}_2$ synthétisées pourraient être utilisées dans les systèmes de délivrance des médicaments vers les organes cibles : la couche de silice mésoporeuse agissant comme réservoir de principe actif et le cœur $\text{Gd}_2\text{O}_2\text{S}:\text{Eu}^{3+}$ permettant le suivi *in vivo* de la nanoplateforme.

Le chapitre suivant sera consacré au développement de quelques applications de ces nouvelles nanoplateformes ainsi « designées ».

CHAPITRE V : APPLICATIONS BIOMÉDICALES

CONTENU

V.1. Étude de la cytotoxicité des NPs et imagerie de fluorescence	85
V.1.1. Principe et méthode.....	88
V.1.2. Résultats et discussions.....	89
V.1.3. Conclusion.....	91
V.2. Greffage de molécules biologiques à la surface des NPs	91
V.2.1. Greffage de la streptavidine.....	92
V.2.1.1. Principe et méthode.....	93
V.2.1.2. Résultats et discussions.....	94
V.2.1.3. Conclusion.....	96
V.2.2. Greffage d'anticorps à la surface des NPs pour détection d' <i>Escherichia coli</i>	96
V.2.2.1. Principe et méthode.....	97
V.2.2.1.1. Greffage de la protéine A sur les NPs de $Gd_2O_2S:Eu^{3+}@SiO_2-APTMS$	98
V.2.2.1.2. Conjugaison des NPs avec l'anticorps IgG1.....	99
V.2.2.1.3. Immuno-essais et imagerie de fluorescence.....	100
V.2.2.2. Résultats et discussions.....	101
V.2.2.3. Conclusion.....	104
V.3. Utilisation des NPs à base de lanthanides (Gd, Ho et Dy) comme agents de contraste pour l'Imagerie par Résonance Magnétique (IRM)	104
V.3.1. Étude des propriétés relaxométriques des suspensions aqueuses de Ln_2O_3 et Ln_2O_2S ($Ln= Gd^{3+}, Ho^{3+}$ et Dy^{3+}).....	104
V.3.1.1. Principe et méthode.....	105
V.3.1.2. Résultats et discussions.....	106
V.3.1.3. Conclusion.....	113
V.3.2. Imagerie des fantômes par résonance magnétique.....	113
V.4. Utilisation NPs de $Gd_2O_2S :Eu^{3+}$ comme agents de contraste pour l'imagerie par tomographie X	115
V.5. Conclusions	119

La mise au point et le développement de nanoplateformes multifonctionnelles (à des fins thérapeutiques ou de diagnostic) requiert bon nombre de caractéristiques physico-chimiques permettant d'envisager à terme une utilisation chez l'Homme.

Outre les aspects purement liés à l'élaboration de telles nanoplateformes, l'étude du mode d'interaction avec les cellules/tissus biologiques s'avère indispensable. Dans ce contexte, nous nous sommes penchés dans ce chapitre sur divers aspects liés à ces considérations d'ordre interdisciplinaires et se rapprochant de problématiques concrètes liées à une possible utilisation biomédicale. En particulier, nous nous sommes intéressés ici à :

- l'étude *in vitro* de l'internalisation des NPs par les cellules,
- l'évaluation *in vitro* des effets d'internalisation des NPs sur la viabilité cellulaire,
- la possibilité de détecter les NPs par microscopie d'épifluorescence couplée à un spectrofluorimètre,
- le greffage sur nos NPs, de molécules biologiques pour applications en diagnostic et thérapie médicale,
- l'étude des propriétés relaxométriques des nanoplateformes synthétisées pour l'imagerie par résonance magnétique et pour la tomographie par rayons X.

V.1. Étude de la cytotoxicité des NPs et imagerie de fluorescence

V.1.1. Principe et méthode

Afin d'évaluer le potentiel cytotoxique des NPs préparées au cours ce travail, nous avons fait réaliser des tests de type MTT sur des cellules de souris de type NIH3T3 par la société ICELLTIS. Ces tests ont pour but d'évaluer la viabilité cellulaire après mise en contact des NPs avec les cellules en suivant leur activité mitochondriale.

La viabilité cellulaire est évaluée grâce à une enzyme mitochondriale, la « succinate déshydrogénase » synthétisée par la cellule lorsqu'elle est vivante. Cette enzyme, en présence du réactif MTT (bromure de 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium) précipite pour donner des cristaux de coloration violette de « Formazan ». La quantité de Formazan produite est proportionnelle à la quantité de cellules vivantes. Il suffit donc d'incuber, le MTT avec des cellules ayant été incubées au préalable avec des NPs ; pendant un certain temps à 37 °C. Ensuite, dissoudre les cellules, leur mitochondries et donc les précipités de Formazan violets dans du DMSO pur. Le dosage par spectrophotométrie à 570 nm de la solution obtenue permet de connaître la quantité relative de cellules vivantes ou actives métaboliquement. Lorsque les cellules sont mises en présence des NPs, deux cas de figure peuvent se présenter :

- soit la quantité de Formazan reste constante (voire augmente) au cours du temps : cela signifie alors que les cellules ont une activité cellulaire normale (voire qu'elles prolifèrent dans le cas d'une augmentation). La substance ainsi testée n'a alors pas d'effet de toxicité visible sur les cellules.
- soit la quantité de Formazan diminue (à une vitesse plus ou moins rapide). Plus cette diminution est rapide, plus la toxicité de la substance est importante.

Ainsi le test MTT constitue un bon indicateur de la vitalité cellulaire. Notons que ce test ne présente aucune interférence avec la présence d'euporium compte tenu de l'absence d'excitation de l'euporium à cette longueur d'onde.

Le protocole utilisé est une adaptation de celui décrit par Mosmann.¹⁵² Les cellules de souris de type NIH3T3 ont étéensemencées dans 96 puits plats avec une densité de 3×10^3 cellules/puits à 37°C sous une atmosphère humidifiée à 95% et contenant 5% de CO₂. Le milieu a été renouvelé toutes les 24 h et les cellules rincées (2 fois) avec du PBS (Phosphate Buffered Saline). Les NPs de Gd₂O₂S :Eu³⁺ sont mises en suspension dans du PBS à différentes concentrations et rajoutées au milieu cellulaire. Après des périodes d'incubation de 4, 7 et 11 jours des NPs, des essais MTT ont été réalisés. Les mesures de densité optique des solutions obtenues ont été effectuées à $\lambda_{exc} = 570$ nm.

Pour l'imagerie cellulaire, les NPs de Gd₂O₂S :Eu³⁺ sont incubées avec les cellules à une concentration de 0.1 mg/mL pendant 24 h dans les mêmes conditions que les tests de cytotoxicité. Les images cellulaires sont obtenues en microscopie à fluorescence avec une longueur d'onde d'excitation à 365 nm et possibilité d'observation à 605/640 nm.

V.1.2. Résultats et discussions

La figure V.1 présente l'évolution de la prolifération des cellules NIH3T3 incubées avec les NPs de Gd₂O₂S :Eu³⁺ (diamètre = 105 nm avec un écartype de 10 nm) pendant 4 jours (J4), 7 jours (J7) et 11 jours (J11) à différentes concentrations (0 ; 0,1 ; 1 ; 3 et 5 mg/mL). Nous observons une diminution sensible de la viabilité cellulaire lorsque la concentration en NPs est supérieure à 3 mg/mL quelle que soit la période d'incubation. Pour les durées d'incubation J4 et J7, nous avons une bonne viabilité cellulaire lorsque la concentration en NPs est comprise entre 0,1 et 1 mg/mL. En revanche, lorsque la durée d'incubation est prolongée à 11 jours (J11), la prolifération des cellules diminue quand la concentration est supérieure à 1 mg/mL. En conséquence, il n'y a pas d'effet cytotoxique des NPs sur les cellules jusqu'à une concentration de 1 mg/mL. Cette valeur de concentration peut être considérée comme le seuil de biocompatibilité.

Nous ferons remarquer que c'est un seuil élevé qui permet de dire que nos NPs sont non ou peu toxiques. Il faut également noter que jusqu'à 1 mg/mL, la croissance cellulaire semble accélérée par nos NPs. Ce phénomène qui est reproductible semble très étrange et n'a, à notre connaissance jamais été rapporté. Dire si ce phénomène de facteur de croissance est bénéfique ou non dépend des

applications visées. Dans le cas du marquage des cellules cancéreuses, un tel phénomène pourrait bien évidemment apparaître comme embêtant.

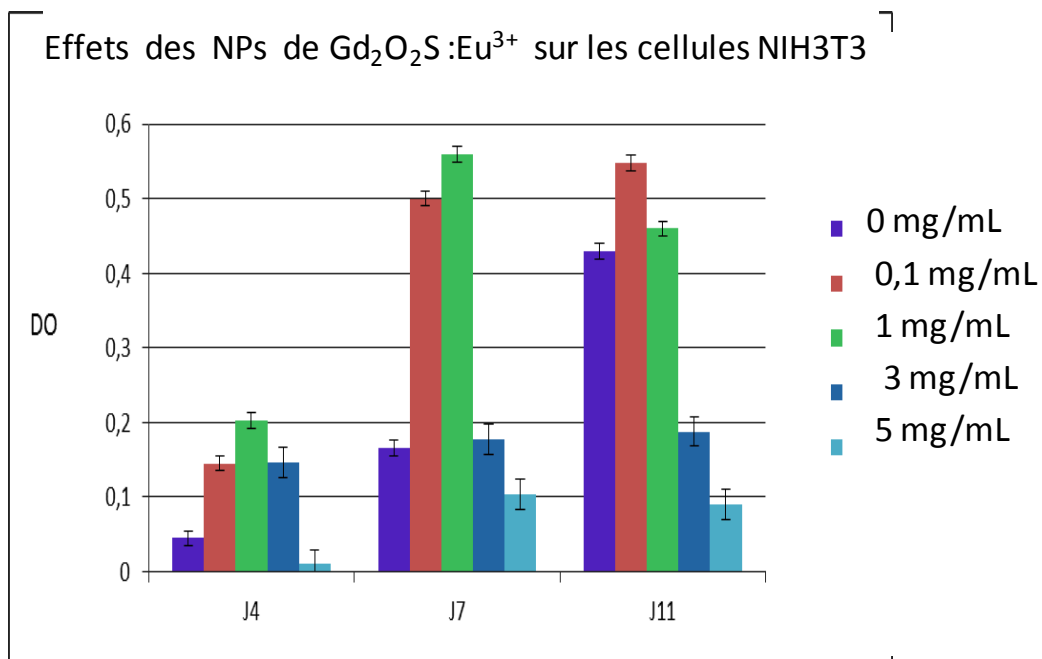


Figure V.1. Tests de cytotoxicité des NPs $Gd_2O_2S:Eu^{3+}$ effectués sur des cellules de souris de type NIH3T3

La figure V.2 présente les images des NPs de $Gd_2O_2S:Eu^{3+}$ à 0,1 mg/mL internalisées par des cellules de souris de type NIH3T3 pendant une nuit et observées en microscopie à fluorescence. Ces images révèlent une bonne internalisation des NPs par les cellules (figure V.2-b et c) avec une forte fluorescence rouge dans leur cytoplasme (figure V.2-e et f).

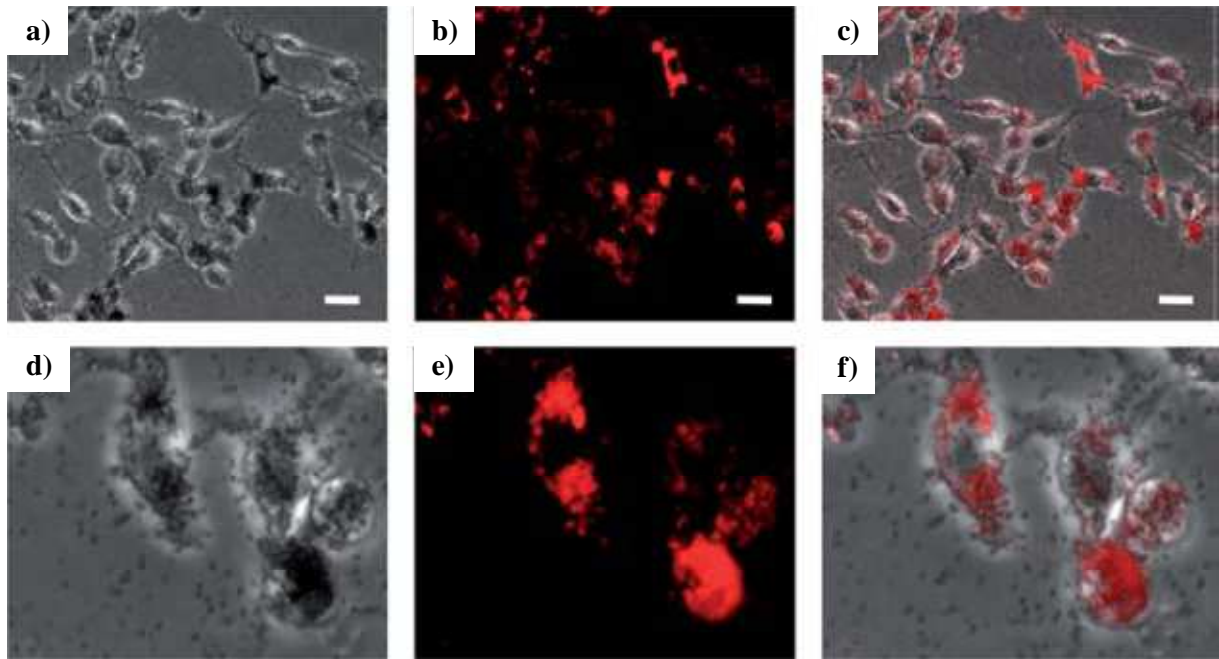


Figure V.2. Images en microscopie de fluorescence des NPs de $Gd_2O_2S:Eu^{3+}$ après internalisation par des cellules NIH3T3 pendant une nuit : (a et d) images en mode contraste de phase ; (b et e) images en mode fluorescent et (c et f) images fusionnées respectives de (a et b) et (d et e). Grandissements : (x100 pour a-c) et (x200 pour d-f) avec une barre d'échelle de 50 μm

V.1.3. Conclusion

Nous avons montré que les NPs sphériques et monodisperses de $Gd_2O_2S:Eu^{3+}$ sont, facilement internalisables par les cellules NIH3T3 ; non cytotoxiques jusqu'à une concentration de 1 mg/mL et sont fortement luminescentes en microscopie à fluorescence excitée à 365 nm. Ces NPs peuvent être considérées comme des marqueurs luminescents très efficaces après internalisation par endocytose. Néanmoins cette technique, si elle permet de suivre des cellules précédemment incubées avec le marqueur ; ne présente aucune sélectivité au cas où les cellules à marquer sont mélangées à d'autres. Dans ce cas, le greffage d'une « clef » de reconnaissance biologique à la surface des NPs devient indispensable afin d'assurer la sélectivité du marquage.

V.2. Greffage de molécules biologiques à la surface des NPs

Ce paragraphe sera dédié au greffage de biomolécules à la surface des NPs synthétisées pour des applications en thérapie ou imagerie médicale humaine.

V.2.1. Greffage de la streptavidine

La streptavidine est une protéine de masse moléculaire de 60 kDa¹⁵³. Elle est formée de quatre sous-unités pouvant chacune se lier à une biotine par de fortes interactions non covalentes, la constante de dissociation étant de 10^{-15} mol.L⁻¹. D'autre part, son point isoélectrique se situe entre 5 et 6. L'intérêt du greffage de la streptavidine sur nos NPs est de pouvoir y coupler des anticorps biotinylés commerciaux spécifiques, grâce au fort couplage existant entre la streptavidine et la biotine.

Le greffage de la streptavidine consiste à la fixer à la surface des NPs tout en lui conservant sa fonctionnalité, c'est-à-dire sans altérer sa structure, qui est à l'origine de sa fonction¹⁵⁴. Nous souhaitons également contrôler la quantité de protéine greffée et maîtriser la stabilité du greffage au cours du temps.

Nous disposons principalement de 2 voies expérimentales pour accrocher la streptavidine à la surface de nos NPs : un greffage par adsorption et un greffage par couplage covalent. Les principes du greffage se révèlent être très empiriques et reposent souvent sur des « recettes », car ils restent fortement dépendants des surfaces et des protéines considérées. Cependant, nous pouvons dégager quelques solutions pour optimiser les conditions de greffage.

Les conditions d'adsorption sont fortement influencées par les conditions physicochimiques du milieu, comme la force ionique, le pH ou la présence de tensioactifs. La quantité adsorbée dépend ensuite principalement de la concentration en protéine. La température et le temps d'incubation sont des paramètres plus ou moins secondaires car ils se situent toujours dans une même fenêtre ($T < 45^{\circ}\text{C}$, le temps d'adsorption se situe entre quelques minutes et quelques heures)¹⁵⁵. Le pH est sans aucun doute le paramètre clé car il joue sur la charge globale des protéines, et dans le cas où les surfaces sont chargées, les interactions électrostatiques peuvent être le moteur ou le frein à l'adsorption.

La seconde méthode de greffage consiste à créer une liaison chimique covalente entre la protéine et la surface de la NP. Il s'agit de déclencher une réaction entre une fonction chimique de la surface et une fonction de la protéine, et le plus souvent en utilisant un agent de couplage. Un grand nombre de réactions de couplage peuvent être imaginées¹⁵⁶. La nature de la surface fixe généralement la réaction empruntée. Les paramètres jouant sur le greffage covalent sont principalement les concentrations relatives en réactifs, le temps et la température de réaction.

Choisir un greffage par physisorption peut être intéressant car la mise en œuvre est assez simple : lorsque l'on connaît les conditions expérimentales, la physisorption consiste en une étape unique. En revanche, cette voie n'assure pas un greffage irréversible dans le temps et ne permet pas d'orienter les protéines ni d'éviter leur dénaturation. Dans la suite de nos travaux nous retiendrons la 2^{ème} méthode de greffage.

V.2.1.1. Principe et méthode

Dans le cas de nos NPs de $Gd_2O_2S :Eu^{3+}@SiO_2$ -APTMS, les fonctions NH_2 présentes à leur surface sont activées par du glutaraldéhyde. Après cette activation, les NPs sont couplées par liaison covalente avec la streptavidine. Nous utilisons donc ces fonctions pour former des liaisons peptidiques avec les fonctions amine de la streptavidine. La figure V.3 présente le schéma réactionnel de ce greffage. Le protocole de greffage utilisé est une adaptation de celui rapporté par Ashtari et *al.*¹⁵⁷

Les NPs de $Gd_2O_2S :Eu^{3+}@SiO_2$ -APTMS utilisées ont un diamètre moyen de 110 nm (diamètre du cœur : 90 nm et épaisseur de la couronne de silice aminée : 10 nm).

- ✓ Environ 10 mg de ces NPs sont mis en suspension dans 5 mL d'une solution de Phosphate Buffered Saline (PBS ; 0,01 mol.L⁻¹).
- ✓ 500 µL d'une solution de glutaraldéhyde (25%.mass) sont ajoutés à la suspension de NPs et le mélange est placé aux ultrasons pendant 30 min à température ambiante.
- ✓ La réaction d'activation des fonctions amine est complétée par agitation à température ambiante pendant 3 h. Les NPs activées sont séparées par centrifugation et lavées au PBS (0,01 M).
- ✓ Les NPs obtenues sont remises en suspension à une concentration de 2,5 mg/mL dans des différentes solutions de streptavidine (0,122 ; 0,25 ; 0,5 mg/mL). Ensuite, les différents mélanges sont maintenus sous agitation à 4°C pendant 24 à 48 heures.
- ✓ Après cette période d'incubation, les NPs sont séparées par centrifugation et lavées au PBS puis remises en suspension dans du PBS à une concentration de 2 mg/mL.

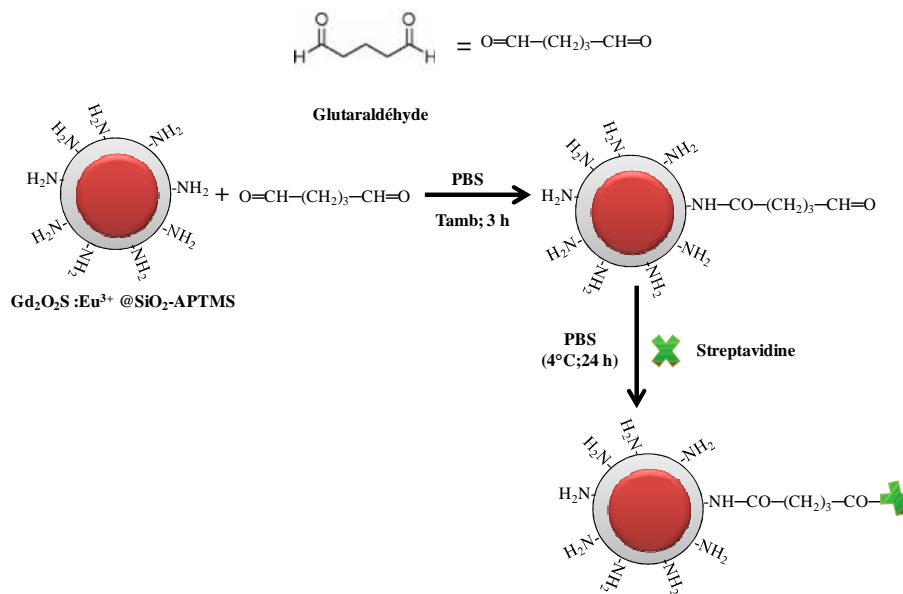


Figure V.3. Schéma réactionnel du greffage de la streptavidine à la surface des NPs de $Gd_2O_2S :Eu^{3+}@SiO_2$ -APTMS

Quantification du nombre de sites actifs pouvant se lier à la biotine

Lorsque la molécule de streptavidine est liée à la surface d'une NP, certains de ses quatre sites peuvent être devenus inaccessibles. Il est alors nécessaire de quantifier le nombre de sites réactifs vis-à-vis de la biotine. Le dosage a été effectué par couplage de la biotine 4-fluoroscéine : B4F (excitable à 494 nm/émission à 523 nm) avec la streptavidine. Il s'agit d'un dosage direct effectué par fluorométrie car il est possible de mesurer l'intensité de fluorescence de la B4F greffée sur nos NPs en suspension. En effet, celles-ci diffusent peu la lumière à cause de leur taille nanométrique.

Les différentes NPs greffées avec de la streptavidine sont mises en suspension à une concentration de 2 mg/mL puis incubées dans 4 mL d'une solution de B4F (10^{-5} mol.L⁻¹) par agitation à l'abri de la lumière pendant 3 h. La concentration en B4F utilisée est suffisamment importante pour que tous les sites actifs de la streptavidine soient saturés. Les NPs ainsi couplées avec de la B4F sont séparées par centrifugation et lavées 4 fois au PBS (0,01 mol.L⁻¹). Ensuite, elles sont remises en suspension dans du PBS à une concentration de 2 mg/mL pour le dosage par fluorométrie.

L'intensité de fluorescence de la B4F couplée avec les NPs greffées avec de la streptavidine a été mesurée sous excitation UV-visible à 495 nm. Une droite d'étalonnage de la solution de B4F a été utilisée pour déterminer la quantité de B4F couplée avec la streptavidine. L'évolution de l'intensité lumineuse I(B4F) en fonction de [B4F] est une droite dont l'équation permet de déterminer le nombre de B4F pouvant se lier aux sites libres de la streptavidine donc du nombre de sites actifs par mg de NPs.

V.2.1.2. Résultats et discussions

La figure V.4 présente le spectre d'émission des NPs greffées avec la streptavidine après couplage avec la B4F. La bande d'émission observée à 521 nm est attribuable à la bande d'émission de la B4F. Ce résultat illustre la présence de la B4F à la surface des NPs greffées avec de la streptavidine.

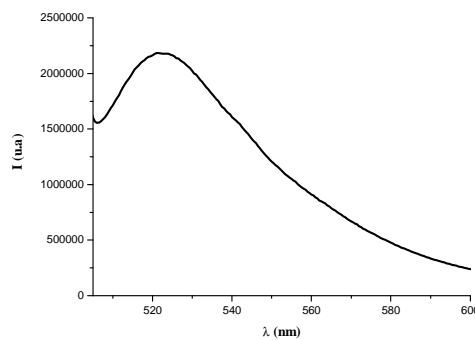


Figure V.4. Spectre d'émission des NPs greffées après couplage avec la B4F sous excitation UV à 495 nm.

Pour avoir des NPs stables présentant une quantité de streptavidine connue, nous avons fait varier la durée de greffage et la concentration en streptavidine. La figure V.5 présente l'évolution du nombre de sites actifs en fonction de la concentration de streptavidine utilisée pour le greffage. Lorsque la concentration en streptavidine augmente jusqu'à 0,25 mg/mL, le nombre de sites actifs dosés augmente également. Au-delà de 0,25 mg/mL le nombre de sites actifs dosés varie très peu quelque soit le temps de greffage. La concentration en streptavidine (0,25 mg/mL) correspond à la valeur de saturation. Le nombre maximal de sites actifs dosés est de 22 pmol/mg de particules ou 67 sites actifs /particule pour un temps de greffage de 24 h.

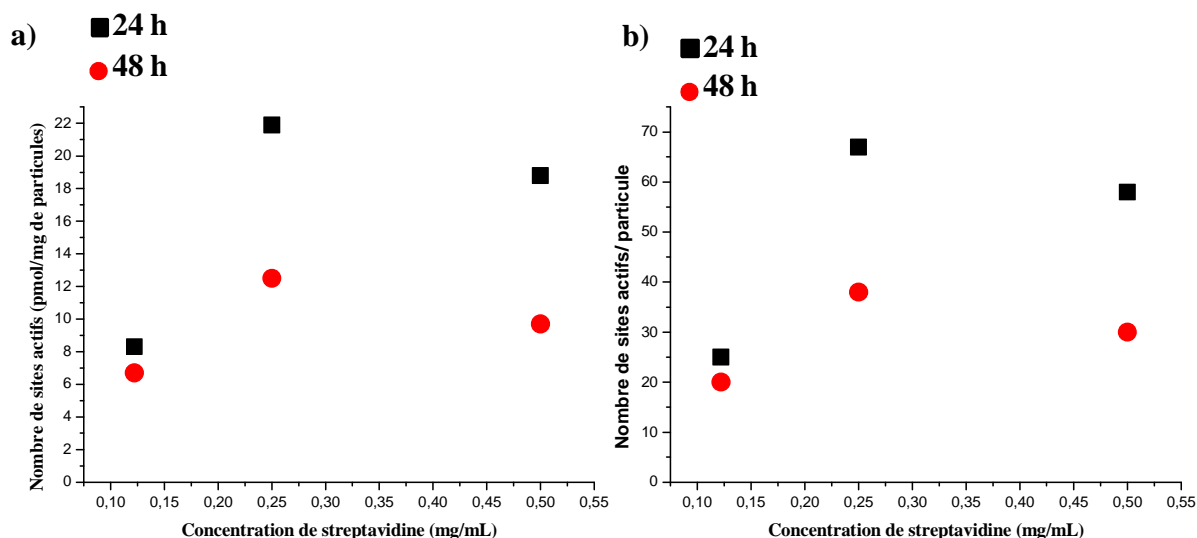


Figure V.5. Variation du nombre de sites actifs en fonction de la concentration de streptavidine utilisée pour le greffage pendant les durées d'incubations de 24 et 48 h.

La diminution du nombre de sites actifs dosés observée lorsque la période de greffage est de 48 h pourrait s'expliquer par une dénaturation de la streptavidine pour des périodes de greffage supérieures à 24 h. Il serait peut être intéressant de réaliser le greffage aux périodes d'incubation inférieures à 24h.

Ces conditions permettent de greffer au maximum 22 pmol de sites actifs/mg de particules ou 67 sites actifs /particule. La surface d'une NP étant estimée à 37994 nm², chaque site actif occupe une surface de 567 nm² sur la NP. Il est connu dans la littérature qu'une molécule de streptavidine a un volume de (4,5 * 4,5 * 5 nm³)¹⁵⁸ soit une surface latérale estimée à 45 nm². La comparaison de ces résultats confirme que tous les sites de la streptavidine ne sont pas accessibles après greffage. La différence entre la surface occupée par un site actif sur une NP et celle d'une streptavidine pourrait s'expliquer par la formation de quelques agrégats lors du greffage ou la présence d'espace entre les molécules de streptavidine greffées sur la NP.

Cette quantité est suffisante pour utiliser cette méthode dans le but d'un greffage d'un anticorps biotinylé. En effet, des manipulations ont été effectuées sur ces mêmes particules par S.

LECHEVALLIER au cours de son stage à l'Université Macquarie de Sydney (Australie) dans le laboratoire du Dr Dayong Jin (Inventeur du Time Gated Luminescence Microscope : TGML). Le greffage de la streptavidine sur nos NPs a été confirmé par la conjugaison des particules greffées avec des cellules exprimant le récepteur CD34 biotinylé. La figure V.6 montre en champ clair (a) et en mode fluorescent (b) la cellule exprimant le récepteur CD34 biotinylé après conjugaison avec les NPs greffées avec de la streptavidine. Sous excitation à 365 nm avec une diode pulsée, nous observons clairement en mode fluorescent les NPs greffées autour de la cellule avec une forte luminescence. Ce qui confirme qu'il y a assez de sites actifs de streptavidine sur les NPs greffées pour une bonne conjugaison avec un anticorps biotinylé.

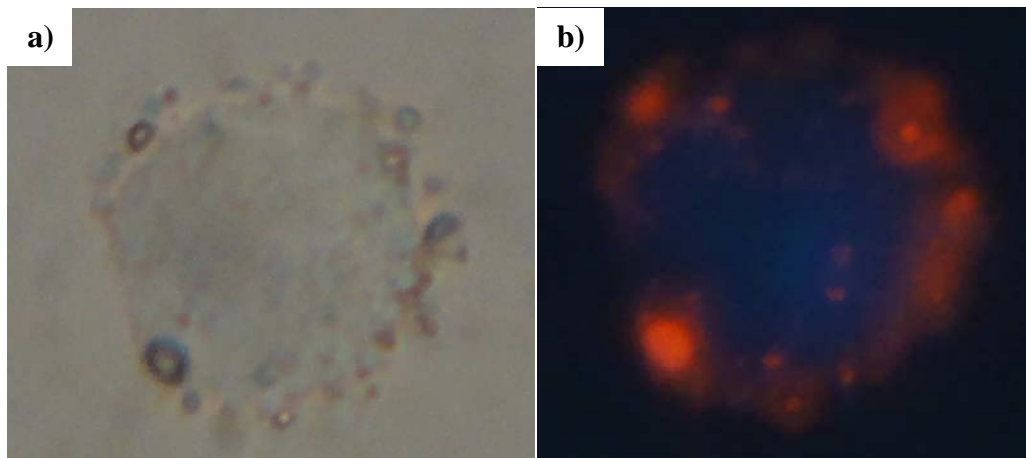


Figure V.6. Images de cellule exprimant le récepteur CD34 biotinylé conjuguée avec des NPs de $Gd_2O_2S:Eu^{3+}$ greffées avec de la streptavidine. (a) champ clair et (b) mode fluorescent.

V.2.1.3. Conclusion

Les conditions expérimentales utilisées nous ont permis de greffer la streptavidine, à la surface des NPs de $Gd_2O_2S:Eu^{3+}@SiO_2$ -APTMS, par formation de liaison peptidique suite à une activation des fonctions NH_2 par le glutaraldéhyde. La quantité maximale de streptavidine greffée est estimée à 22 pmol de sites actifs/mg de particules ou 67 sites actifs /particule.

Cette quantité est suffisante pour utiliser cette méthode dans le but d'un greffage d'un anticorps biotinylé.

V.2.2. Greffage d'anticorps à la surface des NPs de $Gd_2O_2S:Eu^{3+}@SiO_2$ -APTMS pour détection d'*Escherichia coli*

En mai 2011, la bactérie *Escherichia coli* entéro-hémorragique (EHEC), rencontrée dans l'intestin de la majorité des humains et des autres animaux à sang chaud ou dans notre environnement

naturel a causé plusieurs décès en Allemagne, en Suède, au Danemark, en Angleterre, aux Pays-Bas et en France¹⁵⁹. Ainsi, il y a eu une demande accrue de méthodes rapides de détection de la bactérie *Escherichia coli*, dans les domaines de la biotechnologie, de la sécurité alimentaire et en diagnostic médical. Les méthodes conventionnelles de détection microbiologique d'*E. coli* basées sur la culture cellulaire restent encore les méthodes les plus précises. Mais elles nécessitent une période d'incubation trop longue (24-48 h) pour répondre aux besoins d'analyse ce qui ne satisfait pas les pouvoirs publics¹⁶⁰.

Les « quantum dots » utilisés comme marqueurs luminescents ont permis la détection de deux types de bactérie : *E. coli* et *Staphylococcus aureus*. Cette méthode de fluorescence permet de détecter un nombre total de $10^2 - 10^7$ ufc / mL (unité formant une colonie : désigne le nombre de colonies de bactéries contenues dans 1 mL) d'*E. coli* et *S. aureus* dans un délai de 1-2 h¹⁶¹. Mais il est connu que ces quantum dots sont toxiques et très coûteux.

Cheng *et al.*¹⁶² ont développé une autre méthode basée sur le greffage d'anticorps sur les NPs magnétiques aminofonctionnalisées pour la détection d'*E.coli* dans du lait pasteurisé. Cette méthode permet une détection de $2 \cdot 10^1 - 2 \cdot 10^6$ ufc / mL avec une limite de détection de 20 ufc/mL et un temps total de détection d'environ 1 h. Dans cette dynamique, nous proposons alors une nouvelle méthode de détection d'*E.coli* en utilisant un greffage d'anticorps IgG1 spécifique à l'*E.coli* sur nos nanoplateformes $Gd_2O_3:Eu^{3+}@SiO_2$ -APTMS synthétisées dans le chapitre IV. Ces travaux ont été effectués au sein du laboratoire des matériaux inorganiques et de physicochimie de surface -USP (Ribeirão Preto, Sao Paulo, **Brésil**), à l'Institut de chimie d'Araraquara et à la faculté de pharmacie d'Araraquara -UNESP, (Araraquara, Sao Paulo, **Brésil**) ; grâce à une collaboration établie avec le Dr. José Mauricio A. CAIUT.

V.2.2.1. Principe et méthode

Le greffage de l'anticorps IgG1 sur nos nanoplateformes a été effectué par deux méthodes. La première méthode consiste initialement à greffer, à la surface des nanoplateformes, une protéine : la protéine A qui a une forte affinité vis-à-vis de l'anticorps IgG1. Puis, la protéine A, à la surface des nanoplateformes est mise en réaction avec l'anticorps IgG1. La protéine A est une protéine de masse de 64 kDa et possédant quatre récepteurs de liaison Fc (Fragment cristallisable). La capacité de la protéine A à se lier sélectivement aux groupements Fc des immunoglobulines permet d'améliorer la détection des antigènes. Ce procédé est généralement utilisé pour greffer la protéine de façon covalente à une sonde luminescente possédant à sa surface des groupes $(-NH_2)$ ¹⁶³.

La seconde méthode consiste en une simple réaction entre les groupes $(-NH_2)$ à la surface des nanoplateformes et les fonctions carboxyliques de l'anticorps IgG1 par l'utilisation des catalyseurs : *N*-ethyl-*N'*-[3-(diméthylamino) propyl] carbodiimide hydrochloride (EDC) et *N*-hydroxysuccinimide (NHS).

V.2.2.1.1. Greffage de la protéine A sur les NPs de $Gd_2O_2S:Eu^{3+}@SiO_2$ -APTMS

Avant le greffage de la protéine A sur les NPs de $Gd_2O_2S:Eu^{3+}@SiO_2$ -APTMS, un dipeptide protégé par un groupement fluorenylmethoxycarbonyle (Fmoc) a été d'abord greffé en utilisant l'acide Fmoc-6-amino- hexanoïque (Fmoc- ξ -Ahx-OH). Cette méthode permet d'augmenter l'espace entre les NPs et l'anticorps. La synthèse peptidique a été effectuée par la méthode de synthèse de peptide en phase solide (« Solid Phase Peptide Synthesis » en anglais)^{164, 165}.

Environ 125 mg de Fmoc- ξ -Ahx-OH et 31,5 μ L du catalyseur N, N-diisopropyl-carbodiimide (DIC) sont dissous dans 5 mL de dichlorométhane. Le mélange est agité pendant 30 min à 0°C. Il se forme un anhydride selon la réaction décrite sur la figure V.7. Le solvant est évaporé sous pression réduite à 25°C. L'anhydride obtenu est dissous dans 2 mL de diméthylformamide (DMF) et rajouté à une suspension de 56,3 mg de $Gd_2O_2S:Eu^{3+}@SiO_2$ -APTMS dans 2 mL de DMF. Ensuite, 7 mg du catalyseur 4-(diméthylamino) pyridine (DMAP) sont rajoutés et le mélange est agité à température ambiante pendant 24 h. Les particules sont séparées par centrifugation, lavées 3 fois avec du DMF puis à l'eau et séchées sous vide pendant 10 h.

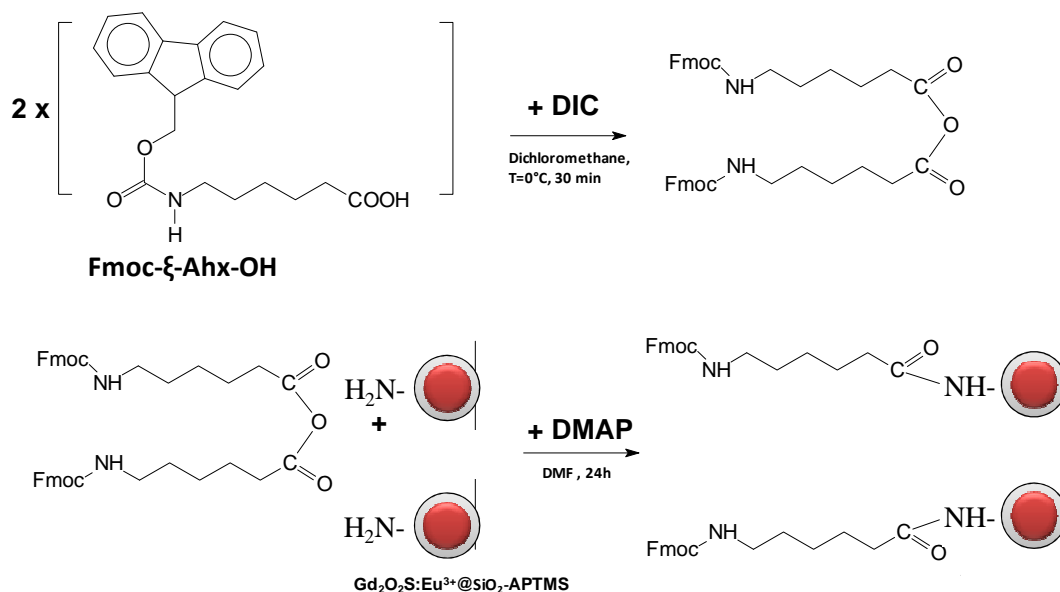


Figure V.7. Synthèse peptidique en phase solide utilisant l'acide Fmoc-6-amino- hexanoïque (Fmoc- ξ -Ahx-OH)

Les particules obtenues ont été traitées avec un mélange alcalin : DMF-Pipéridine (80 vol%-20 vol%) pour éliminer et doser le groupement Fmoc greffé. Environ 40 mg de particules greffées sont mises en suspension dans 2 mL d'un mélange DMF-Pipéridine (80 vol%-20 vol%) pendant 45 min

(figure V.8). Le surnageant est analysé par absorption UV-visible pour doser le groupement chromophore éliminé. Les particules sont séparées par centrifugation et lavées 4 fois avec du DMF.

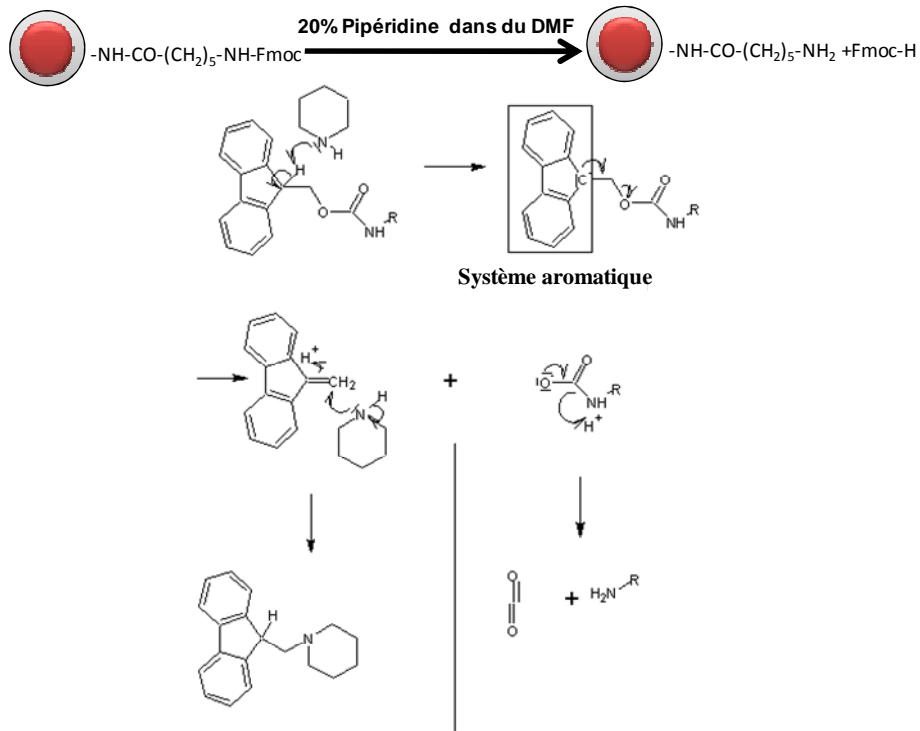


Figure V.8. Élimination du groupement Fmoc par un mélange DMF-Pipéridine (80 vol%-20 vol%)

Les particules séparées après élimination du Fmoc sont remises en suspension dans 5 mL de DMF, 90 mg d'anhydride glutarique sont rajoutés et le mélange est agité à température ambiante pendant 24 h. Ensuite les particules sont séparées par centrifugation, lavées au DMF puis à l'eau et séchées sous vides pendant 10 h.

Enfin, environ 24,8 mg de particules activées à l'anhydride glutarique sont mis en suspension dans 2,5 mL de PBS (0,1 mol.L⁻¹), 125 µL d'une solution de protéine A (0,5 mg/mL) et 5,8 mg du catalyseur EDC sont rajoutés et le mélange est agité pendant 150 min à température ambiante. Les particules greffées à la protéine A sont alors séparées par centrifugation et lavées à l'eau milliQ.

V.2.2.1.2. Conjugaison des NPs avec l'anticorps IgG1

La conjugaison des NPs avec l'anticorps IgG1 a été effectuée par 2 méthodes.

Méthode indirecte par le biais de la protéine A

Elle consiste à faire réagir la protéine A greffée sur les NPs avec l'anticorps IgG1. Les NPs greffées avec la protéine A sont remises en suspension dans 4 mL de PBS (0,1 M), 125 µL d'une

solution (1,45 mg / mL) de l'anticorps IgG1 sont rajoutés. Le mélange est agité à température ambiante pendant 3 h. Enfin, les particules sont séparées par centrifugation, lavées au PBS, remises en suspension dans du PBS et conservées à 4°C pour une utilisation ultérieure.

Méthode directe

Elle est décrite par Wang et al.¹⁶⁶ et est basée sur la réaction de condensation entre les groupes carboxyliques de l'anticorps IgG1 et les amines primaires présentes à la surface des NPs $Gd_2O_3:Eu^{3+}@SiO_2$ -APTMS grâce à l'utilisation de catalyseurs NHS et EDC. Environ 5,4 mg de $Gd_2O_3:Eu^{3+}@SiO_2$ -APTMS sont mis en suspension dans 2 mL de PBS (0,1 M), 187 μ L d'une solution (1,45 mg / mL) d'anticorps IgG1, 31 μ L d'une solution (8,7 mg / mL) d'EDC et 12 μ L d'une solution (11,7 mg / mL) de NHS sont rajoutés et le mélange est agité à température ambiante pendant 2 h. Enfin, les particules sont séparées par centrifugation, lavées au PBS, remises en suspension dans 1 mL de PBS et conservées à 4°C pour une utilisation ultérieure.

V.2.2.1.3. Immuno-essais et imagerie de fluorescence

Les bactéries *E. coli* ont été utilisées pour les tests d'immuno-essais.

Une colonie d'*E. Coli* a été prélevée de la souche de la culture BHI agar ("Brain Heart Infusion", Sigma-Aldrich) et redispersée dans du BHI liquide (Sigma-Aldrich). Après la croissance de la culture, les bactéries ont été déposées sur une lame de microscopie préalablement séchée à température ambiante. Ensuite, les bactéries sont fixées en passant la lame sur le feu (Bec Bunsen). Une suspension de particules (conjuguées ou non avec l'anticorps), diluée avec du RPMI-1640 (Roswell Park Memorial Institute – milieu de culture, code 1640, Sigma Aldrich, + des antibiotiques et des éléments nutritifs) a été déposée sur les bactéries fixées. L'incubation se fait pendant 30 minutes à température ambiante. Ensuite la lame est lavée 3 fois avec une solution RPMI-1640-C et séchée à température ambiante pour l'analyse en microscopie de fluorescence. Les différents essais effectués sont résumés dans le tableau V.1

Tableau V.1. Récapitulatif des essais effectués

Particules	Préparation des lames	Essais
Gd ₂ O ₂ S: Eu ³⁺ @SiO ₂ -APTMS	NPs seules	0
Gd ₂ O ₂ S: Eu ³⁺ @SiO ₂ -APTMS	NPs+ bactéries	Blanc
Gd ₂ O ₂ S: Eu ³⁺ @SiO ₂ -APTMS conjugué avec l'anticorps IgG1 (methode avec protéine A)	NPs+ bactéries	1
Gd ₂ O ₂ S: Eu ³⁺ @SiO ₂ -APTMS conjugaté avec l'anticorps IgG1 (methode directe)	NPs+ bactéries	2

V.2.2.2. Résultats et discussions

Les NPs de Gd₂O₂S :Eu³⁺@SiO₂-APTMS utilisées ont une taille de 55 nm (écart-type de 5 nm) et sont présentées sur la figure V.9.

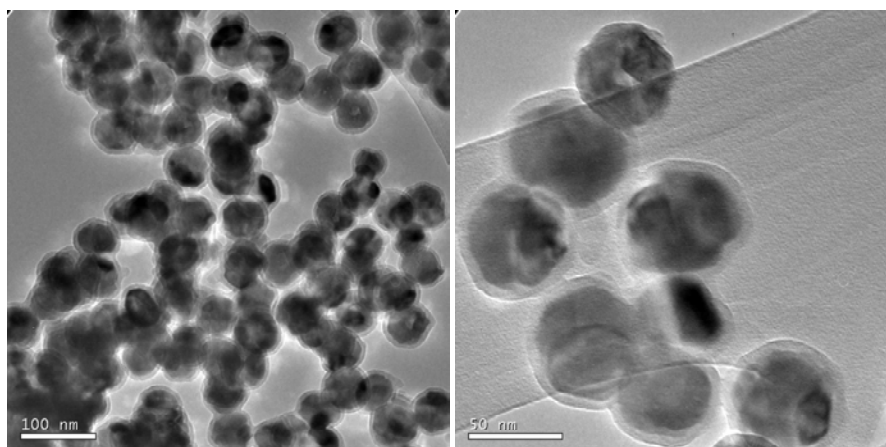


Figure V.9. Images MET des NPs de Gd₂O₂S :Eu³⁺@SiO₂-APTMS.

La quantité d'acide aminé greffé sur les particules a été dosée indirectement par la quantification du groupement chromophore Fmoc par absorption UV-visible. Le spectre d'absorption du surnageant issu de l'élimination du groupement chromophore Fmoc présente deux bandes d'absorption respectivement à 289 nm et à 300 nm (figure V.10).

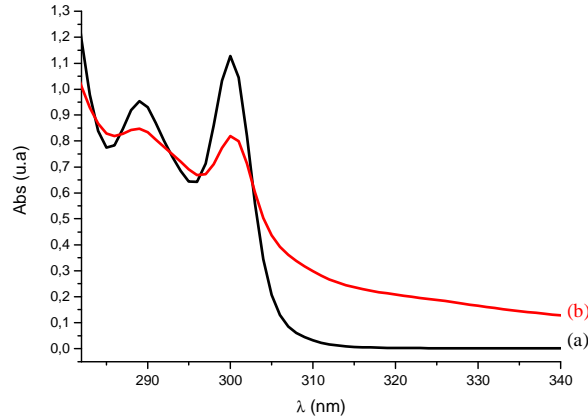


Figure V.10. Spectres d'absorption : a) Surnageant Fmoc-ξ-Ahx-OH dans du DMF-Pipéridine et b) Surnageant issu des NPs greffées dans du DMF-Pipéridine (80 vol%-20 vol%).

Différentes solutions de Fmoc-ξ-Ahx-OH dans du DMF-Pipéridine ont été préparées pour la courbe d'étalonnage. Les mesures d'absorbance ont été effectuées à $\lambda = 289$ nm. La quantité de Fmoc dosé est égale à 0,175 mmol/g de particules, ce qui est comparable aux valeurs rapportées par Gude et *al.*¹⁶⁷ sur la quantité maximale de Fmoc éliminée pour certaines résines. L'analyse chimique élémentaire des NPs avant et après le greffage de l'acide aminé est présentée sur le tableau V.2.

Tableau V.2. Analyse chimique élémentaire avant et après greffage

	N (%)	C (%)	H (%)
Avant greffage	0,23	1,19	0,80
Après greffage	0,24	2,21	1,39

Après le greffage, nous observons une augmentation en masse de 4%, 86% et 74% respectivement pour l'azote, le carbone et l'hydrogène. Ces résultats confortent ceux obtenus en absorption UV-visible et montrent bien que l'acide aminé se greffe sur les NPs lors du procédé de greffage.

Le greffage de l'anticorps IgG1 sur les NPs a été caractérisé à l'Institut de chimie d'Araraquara -UNESP, (Araraquara, Sao Paulo, **Brésil**) et confirmé en microscopie de fluorescence à la faculté de pharmacie d'Araraquara -UNESP, (Araraquara, Sao Paulo, **Brésil**). Les bactéries *E. coli* ont été utilisées pour détecter la présence de l'anticorps sur les NPs selon la procédure décrite au paragraphe V.2.2.1.3. Lorsque les NPs de $Gd_2O_3 : Eu^{3+}$ sont immobilisées seules sur la lame (figure V.11-essai 0), nous observons une luminescence sous excitation UV ($\lambda \approx 365$ nm). Cet essai permet de vérifier la luminescence de nos NPs. Lorsque les NPs sont mises en réaction avec les bactéries (figure

V.11-blanc), seules quelques traces de luminescence sont observées et attribuables aux résidus de particules qui sont restés sur la lame après lavage ou à des interactions non spécifiques pouvant exister entre NPs et bactéries. Ces observations montrent que les NPs à elles seules ne peuvent pas reconnaître les bactéries. Lorsque l'anticorps IgG1 est greffé sur les NPs suivant les 2 différentes méthodes, nous observons une intense luminescence sous excitation UV (figure V.11-1et 2). Avec la 1^{ère} méthode (figure V.11-1), nous observons une luminescence répartie de façon homogène sur la lame alors qu'avec la 2^{ème} méthode nous observons une répartition de luminescence non homogène sur la lame. Cette hétérogénéité pourrait s'expliquer par la présence de bactéries ou groupe de bactéries entourées de NPs de $Gd_2O_2S :Eu^{3+} @SiO_2-APTMS$.

Ces résultats montrent que le greffage d'anticorps selon la 1^{ère} méthode éviterait la formation d'agglomérat donc favoriserait une bonne dispersion des NPs. Les NPs de $Gd_2O_2S :Eu^{3+} @SiO_2-APTMS$ greffées avec l'anticorps ont une bonne stabilité biologique et permettent la reconnaissance de cibles sur la membrane des bactéries *E.coli*.

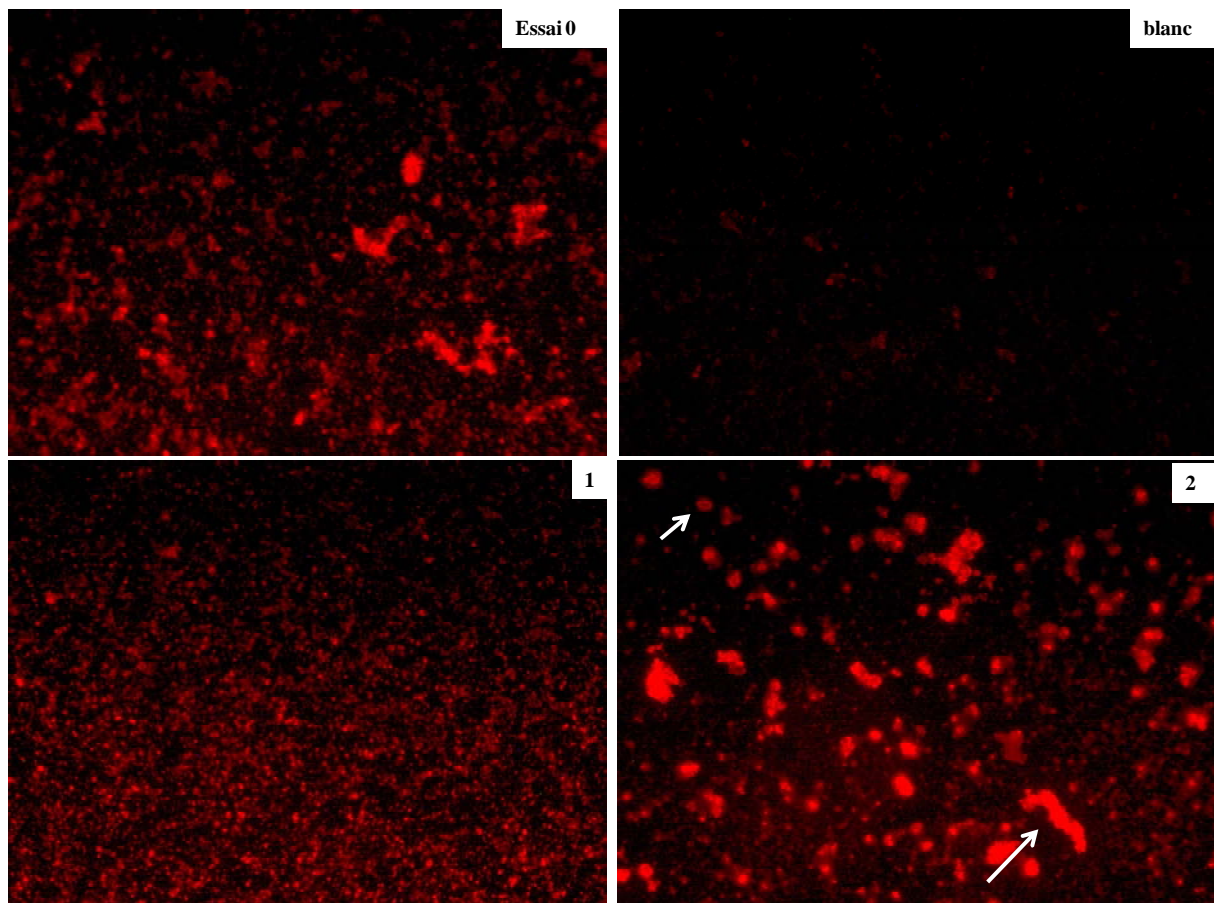


Figure V.11. Images en microscopie de fluorescence : (essai 0) NPs seules, (blanc) NPs seules + bactéries, (1) NPs conjuguées avec IgG1 (1^{ère} méthode) et (2) NPs conjuguées avec IgG1 (2^{ème} méthode)

V.2.2.3. Conclusion

Dans cette partie, nous proposons une nouvelle méthode de détection d'*E.coli* en utilisant nos nanoplateformes $Gd_2O_2S:Eu^{3+}@SiO_2$ -APTMS fonctionnalisées par un anticorps : IgG1 spécifique à *E.coli*. La méthode de greffage utilisant un espaceur entre les NPs et l'anticorps semble être la plus adaptée pour éviter la formation d'agglomérats lors du greffage. Le temps d'incubation nécessaire pour la détection des bactéries est de 30 min. Il est plus court que ceux rapportés jusque là dans la littérature. Des expériences supplémentaires doivent être effectuées pour déterminer le nombre d'*E. coli* détectables dans un milieu donné et préciser la limite de détection de la méthode.

V.3. Utilisation des NPs à base de lanthanides (Gd, Ho et Dy) comme agents de contraste pour l'Imagerie par Résonance Magnétique (IRM)

Comme nous l'avons exposé brièvement dans le chapitre I, les agents de contraste pour l'IRM peuvent être classés en agents de contraste positif T1 ou en agents de contraste négatif T2 selon qu'ils donnent lieu à un renforcement ou un affaiblissement du contraste de l'image en IRM. Les agents de contraste positif ont un effet prédominant sur l'amélioration du temps de relaxation T1, alors que les agents de contraste négatif affectent principalement le temps de relaxation T2. À ce jour, la majorité des agents de contraste positif disponibles dans le commerce sont des chélates de Gd^{3+} , tandis que les particules d'oxyde de fer sont utilisées comme agents de contraste négatif^{168, 169}.

Nous présenterons dans ce paragraphe, l'étude des propriétés relaxométriques de suspensions aqueuses de Ln_2O_3 et Ln_2O_2S ($Ln = Gd^{3+}, Ho^{3+}$ et Dy^{3+}) ainsi que les différentes potentialités d'utilisation des matériaux synthétisés au cours de cette thèse comme agents de contraste pour l'IRM.

V.3.1. Étude des propriétés relaxométriques des suspensions aqueuses de Ln_2O_3 et Ln_2O_2S ($Ln = Gd^{3+}, Ho^{3+}$ et Dy^{3+})

Lorsqu'un composé paramagnétique à base de lanthanides est ajouté à un milieu aqueux, la relaxation des protons de l'eau augmente¹⁷⁰. En règle générale, l'efficacité d'un agent de contraste est déterminée par sa relaxivité, qui est la capacité d'un composé magnétique d'augmenter la vitesse de relaxation des spins des protons qui l'entourent. Elle est exprimée en ($s^{-1}.mM^{-1}$) de l'ion métallique paramagnétique. L'augmentation de la relaxation induite par la présence du composé paramagnétique à base de lanthanides est la somme de quatre contributions différentes : diamagnétique (R_{idia}), dipolaire (R_{iD}), de contact (R_{iC}) et de Curie ($R_{i\chi}$) exprimée par :

$$R_i = R_{idia} + R_{iD} + R_{iC} + R_{i\chi} \quad \text{avec } R_i = 1/T_i ; i = 1, 2. \quad (V.1)$$

En général, la composante diamagnétique est négligeable, la composante dipolaire exprime un effet spatial résultant du couplage dipolaire entre les spins des électrons célibataires de l'ion lanthanide et les spins du noyau¹⁷¹. L'effet de contact est transmis par liaison chimique et résulte du couplage scalaire entre les spins des électrons célibataires et les spins du noyau¹⁷². La composante de Curie ou spin de relaxation de Curie provient de l'interaction dipolaire entre le noyau et la polarisation de spins d'électron¹⁷³. Pour des raisons de simplicité, toute la théorie sur les propriétés relaxométriques des suspensions aqueuses a été mise en annexe.

V.3.1.1. Principe et méthode

Les NPs de Ln_2O_3 et $\text{Ln}_2\text{O}_2\text{S}$ ($\text{Ln} = \text{Gd}^{3+}, \text{Ho}^{3+}$ et Dy^{3+}) utilisées sont celles synthétisées dans le chapitre III. Ces NPs sont de diamètre compris entre 50 et 170 nm. Les temps de relaxation T1 et T2 des protons de l'eau en présence de nos matériaux sont mesurés à faible et fort champ.

À faible champ : $B = 1,4$ Tesla

Les mesures ont été effectuées dans les laboratoires de recherche : Matériaux : Ingénierie et Sciences (MATEIS) et au laboratoire de physico-chimie des matériaux luminescents de Lyon grâce à une collaboration établie avec le Pr P. Perriat et le Pr O. Tillement.

Le temps de relaxation longitudinale, T1, et le temps de relaxation transversale, T2 ont été mesurés à bas champ (1,4T) avec un relaxomètre RMN (Bruker Minispec 60 MHz, 25°C). Pour l'étude des propriétés relaxométriques, des suspensions de NPs de $\text{Gd}_2\text{O}_2\text{S} : \text{Eu}^{3+}$ ont été préparées en mélangeant les particules avec du gel d'agar (1,5% .mass). La variation des taux de relaxation ($1/T1$ et $1/T2$) en fonction de la concentration en Gd^{3+} a permis de calculer les relaxivités r_1 et r_2 .

À fort champ : $B = 7$ Tesla et $9,4$ Tesla

Les temps de relaxation T1 et T2 des protons de l'eau en présence de nos matériaux ont été mesurés par un spectromètre RMN (Varian-INOVA spectrometer) à 300 MHz et utilisant un système de séquences d'impulsions CPMG (Carr-Purcell-Meiboom-Gill). Ces manipulations ont été effectuées au sein du laboratoire de Biocatalyse et de chimie organique de l'Université de Technologie de Delft (Pays-Bas), grâce à une collaboration établie avec le Dr. Ir. J. A. Peters

Les NPs de Ln_2O_3 et $\text{Ln}_2\text{O}_2\text{S}$ ($\text{Ln} = \text{Gd}^{3+}, \text{Ho}^{3+}$ et Dy^{3+}) sont dispersées aux ultrasons pendant 5 min dans une solution aqueuse de Xanthane à 1%.mass. Le Xanthane est utilisé comme dispersant et surfactant pour éviter les problèmes de précipitation qui pourraient avoir lieu lors de l'application de fort champ magnétique. Toutes les valeurs de temps de relaxation ont été corrigées par soustraction de

la ligne de base du Xanthane et des valeurs de relaxivité des suspensions de composés diamagnétiques (Y_2O_3 pour les Ln_2O_3 et Y_2O_2S pour les Ln_2O_2S).

Les relaxivités transversales R_2 (exprimées en s^{-1}) sont déterminées par application d'une séquence d'impulsions de 180° . Parfois, **la relaxation transversale peut être plus rapide en raison des inhomogénéités du champ magnétique externe**. Dans ce cas, le déphasage des spins dans le plan transversal est accéléré puisque la vitesse de rotation des protons varie en fonction du champ magnétique. Le temps de relaxation transversale qui tient compte de **l'interaction spin-spin et des inhomogénéités du champ magnétique** est alors désigné par T_2^* et exprimé comme suit :

$$T_2^* = T_2 + \text{Temps de relaxation dû aux inhomogénéités du champ magnétique}$$

La relaxivité transversale R_2^* (exprimées en s^{-1}) est déterminée à partir de la constante de temps T_2^* mesurée à partir du signal RMN.

V.3.1.2. Résultats et discussions

À faible champ: $B=1,4$ Tesla

Les relaxivités r_1 et r_2 ont été estimées à partir de la pente de la droite exprimant la variation des taux de relaxation ($1/T_1$ et $1/T_2$) en fonction de la concentration en Gd^{3+} . Les résultats sont présentés dans le tableau V.3. Il est connu que les agents de contraste pour l'IRM, peuvent être classés à partir du rapport r_2/r_1 selon qu'ils améliorent T_1 ou T_2 . Lorsque la valeur $r_2/r_1 \approx 1$, l'agent est dit de contraste positif alors que lorsque $r_2/r_1 > 1,5$ il est dit de contraste négatif¹⁷⁴. Les relaxivités des NPs de $Gd_2O_2S:Eu^{3+}$, montrent que le rapport r_2/r_1 augmente de 32,61 à 65,58 lorsque le rayon des NPs augmente de 25,5 nm à 110 nm. Ces valeurs de r_2/r_1 sont largement supérieures à celles des agents de contraste positif à base de complexes de gadolinium tels que : Gd-DTPA – Gadopentetate Dimeglumine ($r_1=3,4 s^{-1}.mM^{-1}$ et $r_2 =3,8 s^{-1}.mM^{-1}$ à 1Tesla ($37^\circ C$)), Gd-DOTA – Gadoterate Meglumine ($r_1=3,4 s^{-1}.mM^{-1}$ et $r_2 =4,8 s^{-1}.mM^{-1}$ à 1Tesla ($37^\circ C$)) et Gd-DTPA-BMA -Gadodiamine ($r_1=3,9 s^{-1}.mM^{-1}$ et $r_2 =4,3 s^{-1}.mM^{-1}$ à 1Tesla ($37^\circ C$))¹⁷⁵. Lorsque la taille des NPs augmente le temps de relaxation transversale T_2 devient plus court et par conséquent les NPs de $Gd_2O_2S:Eu^{3+}$ peuvent être utilisées comme agent de contraste négatif pour l'IRM. En revanche, la taille de ces particules est un peu grande pour leur utilisation comme agent de contraste positif.

Tableau V.3. Relaxivités r_1 et r_2 de suspensions aqueuses de $Gd_2O_2S:Eu^{3+}$ dans du gel d'agar (1,5 wt %) $B = 1,4T$ et $T = 25^\circ C$.

r_{MET} (nm)	r_2 ($mM^{-1} s^{-1}$)	r_1 ($mM^{-1} s^{-1}$)	r_2/r_1
25,5	15	0,46	32,61
59	20,12	0,33	60,97
110	24,92	0,38	65,58

À fort champ : $B=7$ Tesla et $9,4$ Tesla

Les valeurs de r_1 mesurées pour des suspensions de Ln_2O_3 et Ln_2O_2S sont présentées dans le tableau V.4. Pour le gadolinium, la relaxivité longitudinale est presque constante ($\approx 0,24 s^{-1}.mM^{-1}$) quelle que soit la taille des NPs utilisées dans le cas de l'oxysulfure alors qu'elle augmente sensiblement ($0,10$ à $0,97 s^{-1}.mM^{-1}$) lorsque la taille des NPs diminue dans le cas de l'oxyde. Pour les autres lanthanides paramagnétiques, les valeurs de r_1 mesurées sont très faibles (≈ 4 à 12 fois inférieures à celles observées pour le gadolinium). Les faibles valeurs mesurées pourraient s'expliquer par plusieurs facteurs : un échange insuffisant entre les protons en coordination avec le lanthanide et les protons libres dans l'eau induisant ainsi une augmentation du temps de résidence (τ_M) des molécules d'eau dans la sphère interne de coordination ou une diffusion des molécules d'eau entravée par la présence d'une couche de Xanthane autour des particules.

Les relaxivités transversales R_2 (exprimées en s^{-1}) ont été déterminées à partir des temps de relaxation T_2 mesurés par CPMG. L'évolution de la relaxivité transversale r_2 ($s^{-1}.mM^{-1}$), en fonction de τ_{CP} (moitié de l'intervalle de temps séparant 2 impulsions consécutives) et variant τ_{CP} de $0,2$ à 5 ms est reportée sur la figure V.12.

Pour tous les composés, r_2 augmente avec τ_{CP} et atteint la saturation à forte valeur de τ_{CP} (> 3 ms). La valeur de r_2 obtenue à la saturation est considérablement plus faible que la valeur de r_2^* ($r_2^* \approx 6 - 10r_2$) obtenue à partir du signal RMN. Le tableau V.4 présente les différentes valeurs de relaxivité obtenues en comparaison avec celles rapportées par Norek et al.¹⁷⁶. L'évolution des courbes obtenue est identique à celle rapportée Norek et al.¹⁷⁶ et est caractéristique d'un système en régime statique déphasé « Static Dephasing Regime (SDR) » où la condition $\tau_D \gg \frac{1}{\Delta\omega(r_p)}$ est satisfaite ($\tau_D = \frac{r_p^2}{D}$ où r_p est le rayon de la particule, D : le coefficient de diffusion de l'eau et $\Delta\omega(r_p)$: la différence de fréquence de Larmor à la surface de la particule)¹⁷⁷. Contrairement aux résultats de nos travaux, les NPs de Dy_2O_3 revêtues par une couche de dextran¹⁷⁸ et les NPs d' Ho_2O_3 stabilisées dans du CTAB (0,05%.mass)¹⁷⁹ présentent un comportement qui est typique pour un régime suivant la théorie de la

sphère externe de coordination (OS) avec des valeurs de r_2 et r_2^* pratiquement égales. Dans les deux cas, il n'a pas été nécessaire d'ajouter du Xanthane pour éviter la précipitation. En conséquence, le comportement d'un système en régime statique déphasé (SDR) présenté par les composés étudiés au cours de cette thèse et les Ln_2O_3 précédemment étudiés peut être attribué à l'adsorption d'une épaisse couche de Xanthane à la surface des NPs.

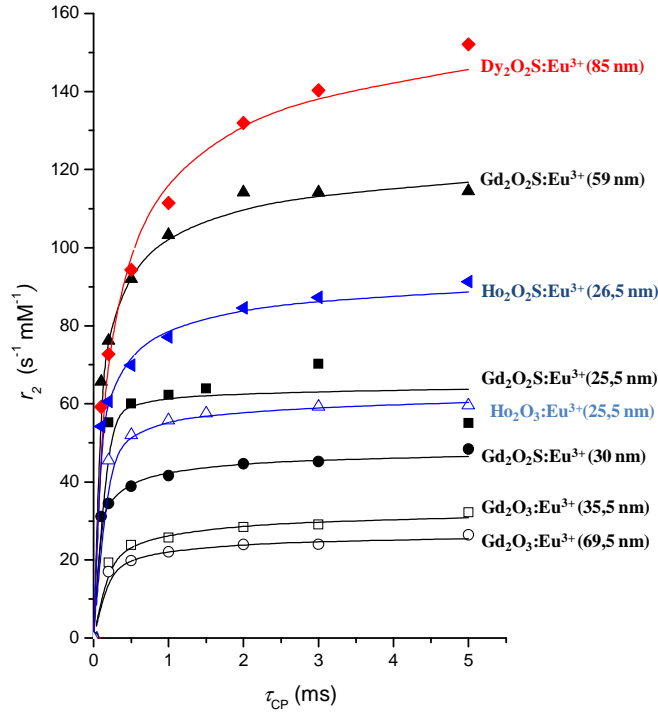


Figure V.12. Évolution de r_2 en fonction de τ_{CP} pour des suspensions aqueuses, de Ln_2O_3 et $\text{Ln}_2\text{O}_2\text{S}$ de différents rayons ; contenant du Xanthane (1%.mass) à $B = 7 \text{ T}$ et $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$.

Les relaxations transversales R_2 et R_2^* ont été simultanément calculées avec les équations (V.2) et (V.5) en utilisant $\Delta \omega(r_p)$, $\tau_D(r_{diff})$, et r_p / r_{diff} comme paramètres ajustables.

$$R_2^* = \frac{1}{T_2^*} = R_2^0 + \frac{2\pi\sqrt{3}f\Delta\omega(r_p)}{9} \quad (\text{V.2})$$

La différence de fréquence angulaire $\Delta\omega(r_p)$, à la surface des particules est reliée à la magnétisation d'une particule, M_p , et donc étroitement liée à la taille des particules. Pour une particule

sphérique, $\Delta\omega(r_p)$ peut être exprimée par l'équation V.3 où γ est le rapport gyromagnétique du proton¹⁸⁰.

$$\Delta\omega(r_p) = \gamma \frac{M_p}{3} \quad (V.3)$$

Pour les particules paramagnétiques, la magnétisation M_p s'exprime par l'équation V.4 où le volume v et le nombre de moles n sont déterminés à partir de la taille de la particule mesurée en MET.

$$M_p = \frac{n}{v} \mu_0 \mu_C \quad (V.4)$$

$$R_2 = R_2^0 + \frac{[\Delta\omega(r_{diff})]^2 f(r_{diff}) \tau_D(r_{diff}) F(x)}{2} \quad (V.5)$$

$$\text{Où } F(x) = \frac{1}{\sqrt{\pi}} \int_0^\infty dy \frac{e^{-y}}{\sqrt{y}} \left[1 - \frac{1}{xy} \tanh(xy) \right] \text{ et } x = \frac{4\tau_{CP}}{\tau_D(r_{diff})}$$

Les valeurs de $\Delta\omega(r_{diff})$, $\tau_D(r_{diff})$ et $f(r_{diff})$ peuvent être exprimées comme suit :

$$\Delta\omega(r_{diff}) = \Delta\omega(r_p) \left(\frac{r_p}{r_{diff}} \right)^3 \quad (V.6)$$

$$\tau_D(r_{diff}) = \tau_D(r_p) \left(\frac{r_{diff}}{r_p} \right)^2 \left(\frac{D}{D_0} \right) \quad (V.7)$$

$$f(r_{diff}) = f(r_p) \left(\frac{r_{diff}}{r_p} \right)^3 \quad (V.8)$$

Pour $x \ll 1$, $F(x) = \frac{x^2}{4}$ et pour $x \gg 1$, $F(x) = 1$. Ainsi,

$$R_2 = R_2^0 + \frac{[\Delta\omega(r_{diff})]^2 f(r_{diff}) \tau_{CP}^2}{2\tau_D(r_{diff})} \quad \text{si } \tau_{CP} \ll \tau_D(r_{diff}) \quad (V.9)$$

Et

$$R_2 = R_2^0 + \frac{[\Delta\omega(r_{diff})]^2 f(r_{diff}) \tau_D(r_{diff})}{2} \quad \text{si } \tau_{CP} \gg \tau_D(r_{diff}) \quad (V.10)$$

Tableau V.4. Relaxivités de suspensions aqueuses de Ln₂O₃ et Ln₂O₂S (Ln= Gd³⁺, Ho³⁺ et Dy³⁺) B = 7 T et T = 25°C^a.

Matériaux	r_p (nm) ^b	r_1 (s ⁻¹ mM ⁻¹)	r_2 (s ⁻¹ mM ⁻¹) ^d	r_2^* (s ⁻¹ mM ⁻¹)	$\Delta\omega(r_p)$ (10 ⁶ s ⁻¹) ^e	$\Delta\omega(r_p)_{\max}$ (10 ⁶ s ⁻¹) ^f	$\tau_D(r_{diff})$ (10 ⁻⁴ s) ^e	r_p/r_{diff} ^e	r_p (nm) ^g	r_{diff} (nm) ^g
Gd₂O₂S:Eu³⁺	25,5	0,24	55,12	483,42	7,763 ± 0,025	7,772	38 ± 49	0,022 ± 0,009	59,9	2673,4
Gd₂O₂S:Eu³⁺	30,0	0,24	48,42	490,17	7,872 ± 0,005	7,772	211 ± 24	0,0114 ± 0,0004	72,2	6330,2
Gd₂O₂S:Eu³⁺	59,0	0,23	114,52	639,03	10,263 ± 0,011	7,772	401 ± 33	0,0106 ± 0,0003	92,3	8731,3
Dy₂O₂S:Eu³⁺	85,0	0,06	152,11	1086,45	18,088 ± 0,027	14,298	1145 ± 138	0,0057 ± 0,0002	84,0	14750,6
Ho₂O₂S:Eu³⁺	26,5	0,05	91,30	824,53	13,931 ± 0,011	14,510	791 ± 37	0,0085 ± 0,0003	67,4	7906,2
Gd₂O₃:Eu³⁺	35,5	0,97	32,18	465,05	7,860 ± 0,004	8,191	598 ± 77	0,0073 ± 0,0003	77,5	10660,5
Gd₂O₃:Eu³⁺	69,5	0,10	26,46	525,63	8,883 ± 0,003	8,191	469 ± 60	0,0068 ± 0,0002	64,0	9435,7
Ho₂O₃:Eu³⁺	25,5	0,02	59,60	871,37	15,946 ± 0,003	15,770	194 ± 11	0,00833 ± 0,0002	50,6	6072,0
ⁱ Gd₂O₃	50-100 ^c	1,67	25,48	237,00	3,838 ± 0,003	8,525	17,4 ± 1,1	0,036 ± 0,001	65,0	575,0
ⁱ Dy₂O₃	50-100 ^c	0,38	62,26	300,00	4,818 ± 0,027	15,570	2,8 ± 0,5	0,069 ± 0,004	50,0	658,0

^a Xanthane (1%.mass), ^b Mesures en MET, ^c Mesures en DLS, ^d Pour $\tau_{CP} = 5$ ms, ^e Valeurs obtenues à partir de l'ajustement des données expérimentales selon les équations V.2 et V.3, ^f Valeurs calculées à partir des équations V.3 et V.4 ^g Valeurs calculées à partir des meilleures valeurs d'ajustement de $\tau_D(r_{diff})$, r_p/r_{diff} et $D_0 = 1.9 \times 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$, ^h Valeurs fixées lors de l'ajustement, ⁱ Valeurs de référence et $R_2^0 = 0$.

Lors des simulations avec le logiciel Micromath, la variation de la valeur de R_2^0 nous permettait d'obtenir des valeurs négatives ou de bonnes valeurs des paramètres ajustables avec un écart-type élevé. Pour remédier à cela, nous avons fixé $R_2^0 = 0$ et une bonne concordance entre les valeurs expérimentales et celles calculées par simulation a été obtenue (voir figure V.12 et tableau V.3). À partir des valeurs de $\tau_D(r_{diff})$ et $D_0 = 1,9 \times 10^{-9} \text{ m}^2\text{s}^{-1}$, les valeurs de r_{diff} et r_p ont été calculées. Les valeurs de r_p obtenues sont en parfaite concordance avec celles mesurées en MET.

Puisque, r_{diff} est le rayon de la sphère, dans laquelle les protons de l'eau n'influent pas sur la relaxivité transversale, les résultats obtenus reflètent aussi qu'il y a une épaisse couche de Xanthane autour de la particule. L'épaisseur de cette couche peut être estimée à 3-10 μm , ce qui est supérieur à la valeur rapportée précédemment dans le cas des NPs de Ln_2O_3 ¹⁷⁶. Une autre différence avec les particules précédemment étudiées, est que les valeurs, après un meilleur ajustement de $\Delta\omega(r_p)$ sont plus proches des valeurs maximales calculées pour ce paramètre à partir des équations V.20 et V.21. Au cours de cette étude, les valeurs de $\Delta\omega(r_p)$ évaluées étaient significativement plus petites que $\Delta\omega(r_p)_{max}$. Cette différence peut s'expliquer par la différence de la forme des NPs. Le matériau étudié précédemment était constitué d'agrégats de fibres de forme plate, avec une taille de 5-10 nm ; qui en suspension forment des agrégats de 50-100 nm de rayon. Contrairement à ce qui a été rapporté précédemment, il n'a pas été nécessaire d'avoir de fortes valeurs de R_2^0 pour obtenir un meilleur ajustement. Probablement, R_2^0 est principalement déterminé par un échange entre les protons de la sphère de coordination et les protons libres de l'eau¹⁸¹.

Il convient de noter que dans le cas des oxysulfures $\text{Ln}_2\text{O}_2\text{S}$, les valeurs de $\Delta\omega(r_p)$ évaluées sont nettement plus élevées que les valeurs maximales $\Delta\omega(r_p)_{max}$ de ce paramètre calculées avec les équations V.20 et V.21. Plusieurs explications sont possibles :

- Les incertitudes dans les concentrations Ln^{3+} des échantillons, causées par des erreurs de volume prélevé avec les pipettes en raison de la viscosité élevée des suspensions aqueuses de Xanthane.
- Les interactions magnétiques entre les ions Ln^{3+} et Eu^{3+} conduisant à des valeurs plus élevées de μ_{eff} et donc une augmentation des contributions de relaxivité.
- Un échange de contributions. Les simulations montrent qu'il devrait être mineur.

Les résultats obtenus pour les NPs de $\text{Gd}_2\text{O}_2\text{S}$ démontrent bien l'effet du rayon de la particule sur la relaxivité. Nous pouvons expliquer cette augmentation des relaxivités transversales par une augmentation de $\tau_D(diff)$.

La figure V.13 montre que les relaxivités r_2^* sont presque indépendantes du rayon des particules ce qui correspond aux résultats escomptés dans le cas d'un régime SDR¹⁷⁶.

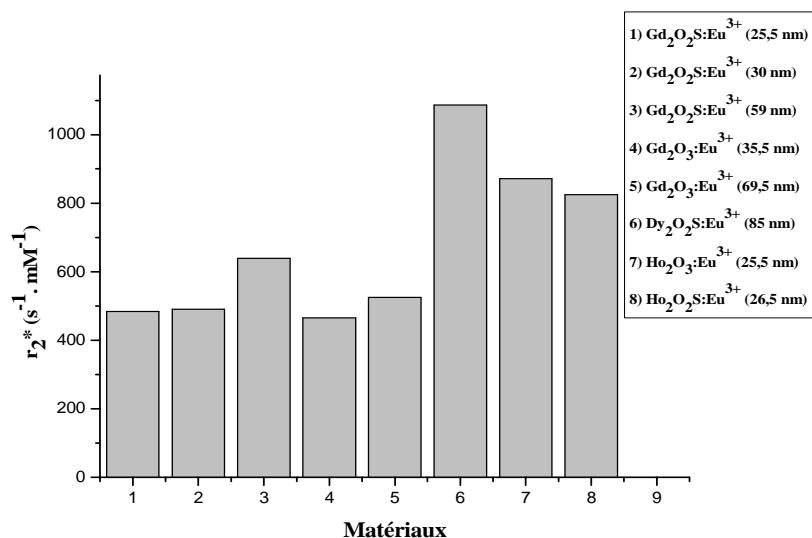


Figure V.13. Relaxivités mesurées à partir de la largeur du signal RMN de ¹H des NPs Ln₂O₃ et Ln₂O₂S en suspension dans du Xanthane (1%.mass)

Effet du champ magnétique appliqué

Les suspensions de nanoparticules Ln₂O₂S ont été également étudiées à un champ magnétique de 9,4 T. Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau V.5. La comparaison avec les résultats obtenus à 7 T suggère que r_2 et r_2^* sont linéairement proportionnelles à la force du champ magnétique B. La figure V.14 montre que r_2 varie linéairement en fonction de B quelle que soit la taille des NPs de Gd₂O₂S :Eu³⁺. Ces résultats concordent bien avec ceux rapportés dans le cas des Ln₂O₃¹⁷⁶.

Tableau V.5. Effet du Champ magnétique sur les relaxivités de suspensions aqueuses de Ln₂O₃ et Ln₂O₂S (Ln= Gd³⁺, Ho³⁺ et Dy³⁺) T = 25°C

	r _p (nm)	r ₂ (s ⁻¹ mM ⁻¹) 9,4 T	r ₂ (s ⁻¹ mM ⁻¹) 7 T	Ratio	r ₂ [*] (s ⁻¹ mM ⁻¹) 9,4 T	r ₂ [*] (s ⁻¹ mM ⁻¹) 7 T	Ratio
Gd ₂ O ₂ S:Eu ³⁺	30	60,55	48,42	1,21	671,96	490,17	1,37
Gd ₂ O ₂ S:Eu ³⁺	59	157,36	114,52	1,37	880,30	639,03	1,38
Ho ₂ O ₂ S:Eu ³⁺	26,5	130,84	91,30	1,43	1042,79	824,53	1,26
Dy ₂ O ₂ S:Eu ³⁺	85	192,62	152,11	1,27	1727,39	1086	1,59

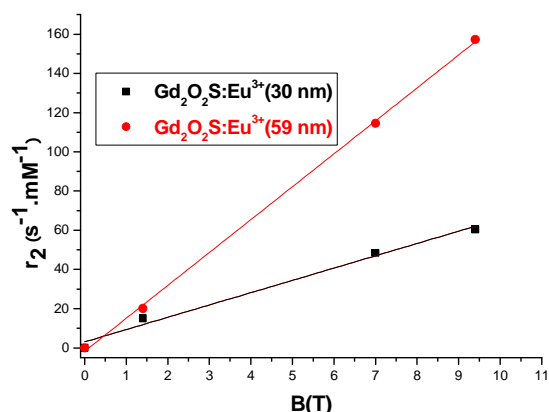


Figure V.14. Variation de la relaxivité transversale des suspensions aqueuses de NPs de $Gd_2O_2S:Eu^{3+}$ en fonction du champ externe B appliqué.

V.3.1.3. Conclusion

Les valeurs de relaxivité transversale les plus élevées sont obtenues dans le cas des oxysulfures. La relaxivité transversale r_2 maximale est de $91,30 \text{ s}^{-1}.\text{mM}^{-1}$, $114,52 \text{ s}^{-1}.\text{mM}^{-1}$ et $152,11 \text{ s}^{-1}.\text{mM}^{-1}$ respectivement pour les NPs de Ho_2O_2S , Gd_2O_2S et Dy_2O_2S . La relaxivité transversale r_2 est dépendante du rayon des NPs dans le cas de Gd_2O_3 et Gd_2O_2S alors que r_2^* est indépendante de la taille des NPs pour tous les composés Ln_2O_3 et Ln_2O_2S étudiés. **La valeur maximale de relaxivité ($r_2 = 152,11 \text{ s}^{-1}.\text{mM}^{-1}$, $B = 7T$ et $T = 25^\circ C$) obtenue pour des NPs de Dy_2O_2S de 85 nm de rayon, est meilleure que celle mesurée pour les agents de contraste négatif commercialisés tels que le *Ferumoxide* (AMI-125) et le *Ferumoxtran-10* (AMI-227) qui ont respectivement des relaxivités égales à $130 \text{ s}^{-1}.\text{mM}^{-1}$ et $71 \text{ s}^{-1}.\text{mM}^{-1}$ à $B = 7,1T$ et $T = 25^\circ C$ ¹⁸². Lorsque le champ magnétique appliqué augmente, la relaxivité augmente également linéairement comme ce qui est attendu dans le cas d'un régime statique déphasé.**

Grâce à leurs excellentes propriétés relaxométriques, les NPs Ln_2O_3 et Ln_2O_2S synthétisées peuvent être utilisées avantageusement comme agent de contraste négatif à fort champ magnétique pour l'IRM.

V.3.2. Imagerie des fantômes par résonance magnétique

Nous avons évalué les potentialités d'utilisation des NPs de $Gd_2O_2S:Eu^{3+}$ et $Dy_2O_2S:Eu^{3+}$ comme agents de contraste négatif pour l'IRM. Nous avons fait des essais *in vitro* (imagerie pondérée T2) de suspensions de NPs contenues dans du gel d'agar (1,5%.mass). La concentration en Ln^{3+} ($Ln = Gd, Dy$) était comprise entre 0 et 15 mM. Les images des fantômes en IRM ont été effectuées avec un appareil clinique de 3 T situé sur la plateforme d'imagerie médicale de l'hôpital de Purpan

(Toulouse). Des séquences d'écho de spin pondérées en T_2 avec un temps de répétition (TR) égal à 1500 ms et un temps d'écho (TE) égal à 11 ms. Les images ont été acquises sur une matrice de 160 * 120 mm avec un champ de vue de 1*1*5 mm et une épaisseur de tranche de 5 mm.

Les images pondérées T_2 (figure V.15) montrent que lorsque la concentration en Ln^{3+} ($\text{Ln} = \text{Gd}, \text{Dy}$) augmente, l'intensité du signal diminue. Cette atténuation de l'intensité du signal augmente lorsque la taille des NPs de $\text{Gd}_2\text{O}_2\text{S} : \text{Eu}^{3+}$ augmente. Ces résultats confirment ceux obtenus lors des études de propriétés relaxométriques et montrent la possibilité d'utilisation des NPs de $\text{Gd}_2\text{O}_2\text{S} : \text{Eu}^{3+}$ et $\text{Dy}_2\text{O}_2\text{S} : \text{Eu}^{3+}$ comme agents de contraste négatif pour l'imagerie par résonance magnétique.

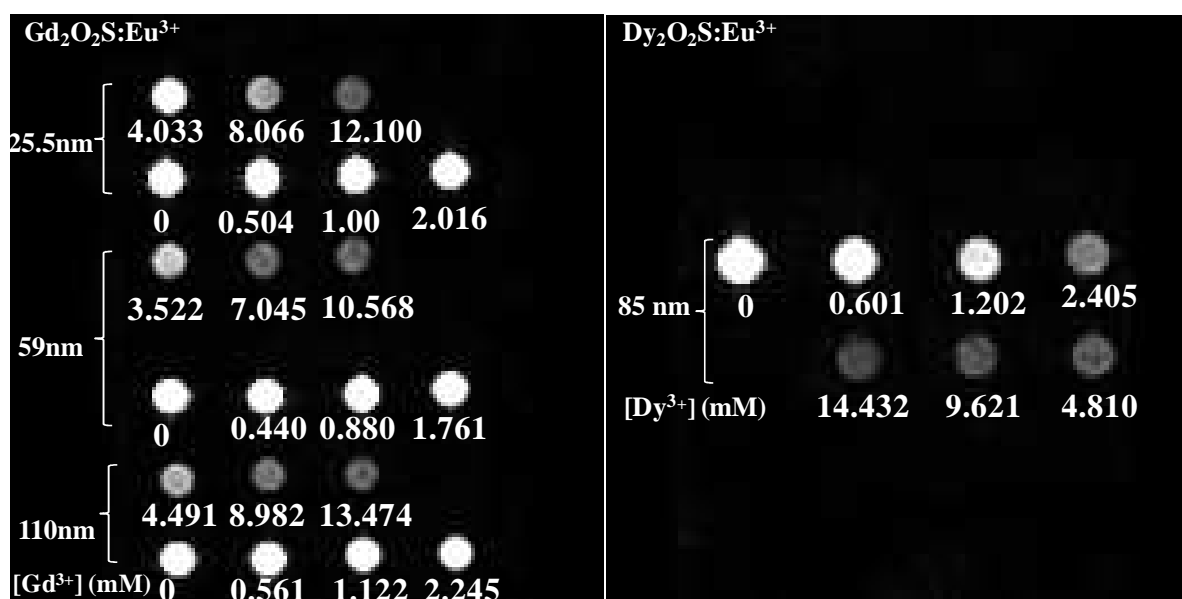


Figure V.15. Images pondérées T_2 par RM des fantômes contenant des NPs de $\text{Gd}_2\text{O}_2\text{S} : \text{Eu}^{3+}$ et $\text{Dy}_2\text{O}_2\text{S} : \text{Eu}^{3+}$.

Pour quantifier la différence de contraste obtenue entre les échantillons, nous avons mesuré la variation des niveaux de gris en fonction de la concentration en gadolinium. La figure V.16 présente l'allure des courbes obtenues dans le cas des NPs de $\text{Gd}_2\text{O}_2\text{S} : \text{Eu}^{3+}$ (figure V.16.a) et de $\text{Dy}_2\text{O}_2\text{S} : \text{Eu}^{3+}$ (figure V.16.b). Ces profils de valeurs numériques montrent bien l'atténuation du signal quand la concentration en Ln^{3+} ($\text{Ln} = \text{Gd}, \text{Dy}$) augmente. L'intensité du signal augmente quand $[\text{Gd}]$ augmente pour des valeurs de concentration inférieures à 1 mM. À fortes $[\text{Gd}]$, nous observons une diminution de l'intensité du signal de 64 à 66%. Ces résultats peuvent s'expliquer par une prédominance de l'effet T_2 à forte concentration et concordent avec ceux obtenus par A. Klasson et al¹⁸³. Alors que dans le cas des NPs de $\text{Dy}_2\text{O}_2\text{S} : \text{Eu}^{3+}$, l'intensité du signal diminue de 92 % quand $[\text{Dy}]$ augmente de 0 à 10 mM. Pour $[\text{Dy}] > 10$ mM l'intensité du signal reste quasiment constante.

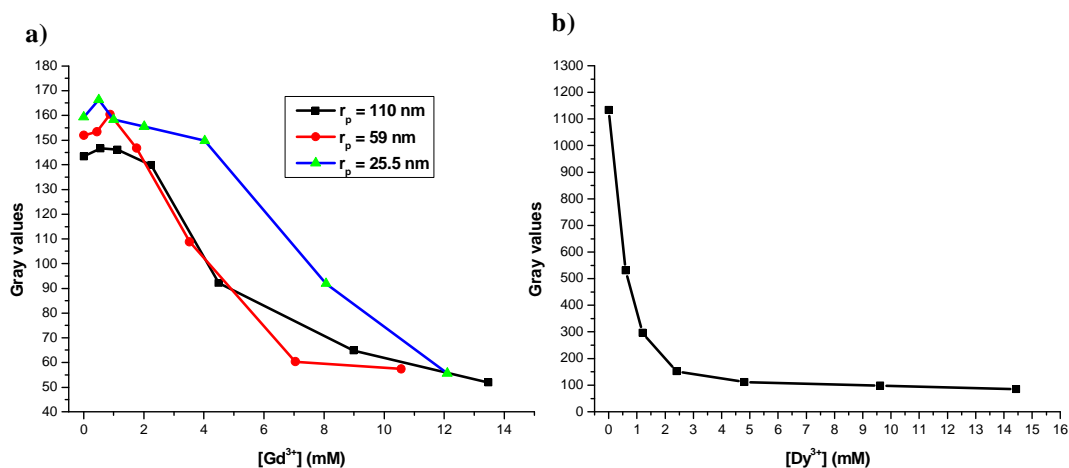


Figure V.16. Variation des valeurs de niveau de gris de l'image en fonction de la concentration en Ln³⁺. (a) NPs de Gd₂O₂S: Eu³⁺ et (b) NPs de Dy₂O₂S: Eu³⁺.

V.4. Tomographie par rayons X

L'acquisition des images par tomographie a été effectuée à l'institut Sainte Cathérine d'Avignon (France) grâce à une collaboration établie avec Mr Robin Garcia.

Le scanner (tomodensitomètre) est un GE RT16 et réglé à 100 keV. L'accélérateur équipé des systèmes d'imagerie Portal et OBI (On Board Imaging) est un TrueBeam STX de marque VARIAN.

Les échantillons sont exposés à l'intérieur d'un fantôme simulant l'épaisseur moyenne d'un patient. Ils sont exposés aux modalités RX suivantes :

- Tomodensitométrie (scanner)
- Faisceau de traitement (6MV)
- Images planes KV (OBI)
- Images CB-CT (système d'imagerie par tomographie conique de basse énergie)

Des échantillons fantômes ont été préparés à partir de suspensions de NPs de Gd₂O₂S: Eu³⁺ (r_p = 59 nm) dans du gel d'agar (1,5%.mass), puis introduits dans les trous d'une plaque en plastique perforée (figure V.17-a). La figure V.17-c, montre l'image en tomographie par rayons X. Le point noir représente un trou vide où il n'y a pas d'absorption de rayons X. Lorsque la concentration en Gd augmente de 0 à 16,64 mM, l'absorption des rayons X par les échantillons devient importante et l'intensité du signal en tomographie augmente aussi. **L'absorption des rayons X augmente alors avec la concentration en Gd et par ricochet la densité électronique de l'échantillon.** À partir de [Gd³⁺] ≈ 4 mM, l'échantillon est détectable sur l'image obtenue en tomodensitométrie.



Figure V.17. (a) Plaque en plastique contenant des suspensions de NPs de $Gd_2O_2S:Eu^{3+}$ dans du gel d'agar (1,5%.mass); (b) image de la plaque dans le scanner (c) Image en tomographie par rayons X acquise à l'aide d'un appareil de radiographie: **0**: control, **1** : 0,52 mM, **2**: 1,04 mM, **3** : 2,08 mM ; **4**: 4,16 mM, **5**: 8,32 mM , **6** : 16,64 mM.

Lorsque l'échantillon est irradié par des rayons X, il se produit des interactions rayonnement-matière (atténuations, diffusion Compton, ...). Pour quantifier l'image tomодensitométrique, il existe une échelle d'Unités Hounsfield (UH) qui est une transformation linéaire des mesures des coefficients d'atténuation linéique (probabilité d'interaction par unité de longueur des photons avec un matériau) dans laquelle, la densité de l'eau distillée, à la température et la pression standard (20°C et 1013 HPa), est définie égale à 0 UH. De même, la densité de l'air dans ces conditions de température et pression est définie égale à -1000 UH¹⁸⁴. Pour un matériau X ayant un coefficient d'atténuation linéique égal à μ_x , la valeur UH correspondante est donnée par :

$$UH = ((\mu_x - \mu_{H_2O}) / (\mu_{H_2O} - \mu_{air})) \times 1000$$

μ_{H_2O} et μ_{air} sont respectivement les coefficients d'atténuation linéique de l'eau et de l'air dans les conditions standard de température et de pression. Une Unité Hounsfield représente une variation de 0,1% de la différence entre les coefficients d'atténuation de l'eau et de l'air, ou approximativement 0,1% du coefficient d'atténuation de l'eau puisque celui de l'air est quasi nul.

Influence de l'atténuation des rayons X sur la quantification des images tomодensitométriques

L'effet de l'atténuation des rayons X sur l'image tomодensitométrique a été étudié en mesurant le nombre d'unités Hounsfield de l'image acquise en fonction de la concentration en Gd donc de la densité électronique de l'échantillon et ce pour différentes tensions d'énergies X utilisées.

La figure V.18 présente les valeurs moyennes mesurées en tomодensitométrie en fonction de la concentration en Gd des échantillons. Nous remarquons qu'il y a une relation linéaire entre le

nombre d'unités Hounsfield et la concentration de Gd. Cette figure montre également que l'effet de contraste est plus efficace à faible énergie X (80 kV) qu'à forte énergie (140 kV).

Il convient de noter que les NPs de $Gd_2O_3S:Eu^{3+}$ ont un comportement différent de celui des NPs d'or qui donnent plutôt un meilleur effet de contraste à haute énergie (140 kV) qu'à faible énergie (80 kV)¹⁸⁵. Pour des échantillons de $[Gd^{3+}] < 4$ mM le nombre d'unités Hounsfield est quasiment constant quelle que soit la tension d'énergie X utilisée alors que lorsque $[Gd^{3+}] > 4$ mM, le nombre d'unités Hounsfield mesuré change quand la tension d'énergie X change. Cette différence s'observe clairement à $[Gd^{3+}] \approx 16,6$ mM.

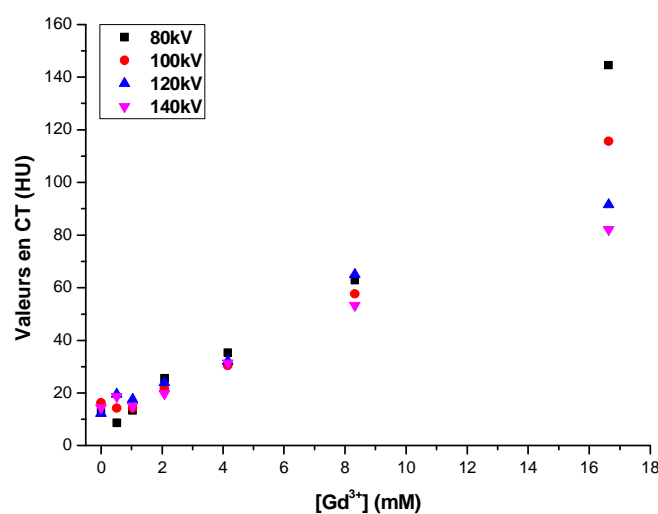


Figure V.18. Relation entre le nombre d'unités Hounsfield de l'image acquise et la concentration en Gd de l'échantillon à différentes tensions d'énergie X.

Ces résultats montrent bien la dépendance entre le nombre d'unités Hounsfield et la densité électronique de l'échantillon d'une part et d'autre part la tension d'énergie de rayons X et le nombre d'unités Hounsfield de l'image acquise.

Lorsque l'image est acquise par un imageur de type KV-OBI (figure V.19), nous distinguons bien les échantillons les plus denses (5 et 6). Comme nous l'avons observé en imagerie CT, ces images permettent également de distinguer les échantillons les plus denses (5 et 6). L'augmentation du contraste observée avec la densité électronique de l'échantillon concorde avec les images acquises où seules les échantillons les plus denses (5 et 6) sont distinguables.

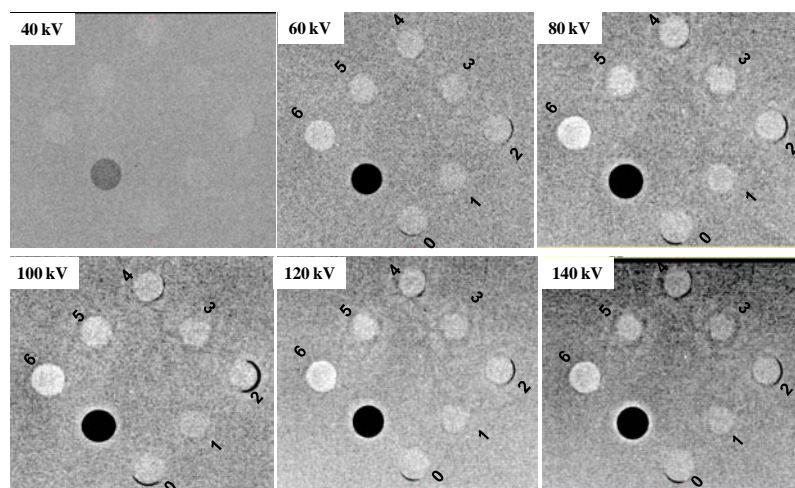


Figure V.19. Images acquises par un imageur de type KV (OBI image plane) à différentes tensions d'énergie X.

Pour ce type d'imageur, nous avons également fait la mesure des échantillons à l'aide de profils de valeurs numériques (figure V.20). Pour chaque image, la gamme de valeurs dynamiques dépend de l'acquisition. La variation des valeurs numériques moyennes mesurées en fonction de la concentration des échantillons est présentée sur la figure V.20. Ces valeurs numériques diminuent avec $[Gd^{3+}]$ pour $[Gd^{3+}] < 4$ mM alors qu'au-delà de cette concentration, elles augmentent à nouveau.

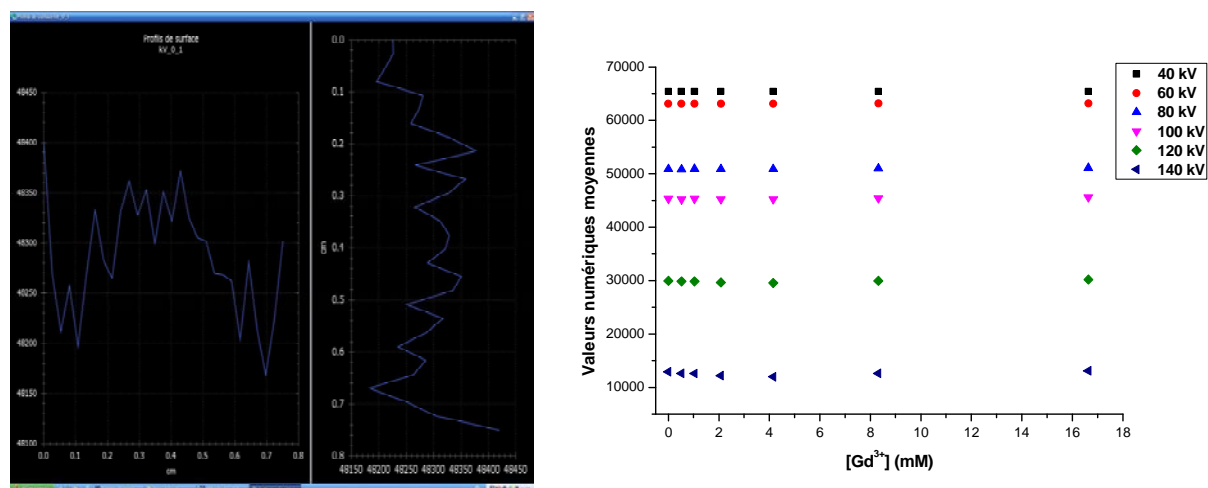


Figure V.20. Images acquises par un imageur de type KV (OBI image plane) à différentes tensions d'énergie X.

Les NPs de $Gd_2O_3:Eu^{3+}$ sont détectables à partir de $[Gd^{3+}] \approx 4$ mM en tomographie par rayons X et donc potentiellement utilisables comme agent de contraste en tomographie par rayons X.

V.5. Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons exploré les différentes applications biomédicales des nanoplateformes multifonctionnelles synthétisées.

Cette étude nous a permis d'une part, de réaliser l'internalisation des cellules NIH3T3 par les NPs de $Gd_2O_2S:Eu^{3+}$ et des tests de cytotoxicité. Ces NPs sont non cytotoxiques jusqu'à une concentration de 1 mg/mL et sont fortement luminescentes en microscopie à fluorescence sous excitation à 365 nm. Ces NPs peuvent être considérées comme des marqueurs luminescents très efficaces après internalisation par endocytose. Néanmoins cette technique, si elle permet de suivre des cellules précédemment incubées avec le marqueur, ne présente aucune sélectivité au cas où les cellules à marquer sont mélangées à d'autres. Dans ce cas, le greffage d'une « clef » de reconnaissance biologique à la surface des NPs devient indispensable afin d'assurer la sélectivité du marquage. De ce fait, le greffage de la streptavidine a été effectué à la surface des NPs de $Gd_2O_2S:Eu^{3+}@SiO_2$ -APTMS ; par formation de liaison peptidique suite à une activation des fonctions NH_2 par le glutaraldéhyde. La quantité maximale de streptavidine greffée est estimée à 22 pmol de sites actifs/mg de particules ou 67 sites actifs /particule. Cette quantité est suffisante pour utiliser cette méthode dans le but d'un greffage d'un anticorps biotinylé. Le greffage de l'anticorps IgG1 a été également effectué sur les NPs $Gd_2O_2S:Eu^{3+}@SiO_2$ -APTMS pour la détection de la bactérie *E.coli*.

D'autres parts, l'étude des propriétés relaxométriques a montré que les valeurs de relaxivité transversale les plus élevées sont obtenues dans le cas des oxysulfures. La relaxivité transversale r_2 maximale est de $91,30 \text{ s}^{-1}.\text{mM}^{-1}$, $114,52 \text{ s}^{-1}.\text{mM}^{-1}$ et $152,11 \text{ s}^{-1}.\text{mM}^{-1}$ respectivement pour les NPs de Ho_2O_2S , Gd_2O_2S et Dy_2O_2S . La valeur maximale de relaxivité ($r_2 = 152,11 \text{ s}^{-1}.\text{mM}^{-1}$, $B = 7T$ et $T = 25^\circ C$) obtenue pour des NPs de Dy_2O_2S de 85 nm de rayon, est meilleure que celle mesurée pour les agents de contraste négatif commercialisés tels que le *Ferumoxide (AMI-125)* et le *Ferumoxtran-10 (AMI-22)*. La relaxivité transversale augmente linéairement avec le champ magnétique appliqué. Grâce à leurs excellentes propriétés relaxométriques, les NPs de Ln_2O_2S synthétisées peuvent être utilisées comme agent de contraste négatif à fort champ magnétique pour l'IRM. Les images obtenues par résonance magnétique confirment la possibilité d'utilisation des NPs de $Gd_2O_2S:Eu^{3+}$ et $Dy_2O_2S:Eu^{3+}$ comme agents de contraste négatif pour l'imagerie par résonance magnétique.

Enfin, les NPs de $Gd_2O_2S:Eu^{3+}$ sont détectables à partir de $[Gd^{3+}] \approx 4 \text{ mM}$ en tomographie par rayons X et donc potentiellement utilisables comme agent de contraste en tomographie par rayons X.

*CONCLUSION GENERALE
ET PERSPECTIVES*

La problématique de ce projet de thèse était de concevoir des nanoplateformes multimodales pour l'imagerie médicale. Pour y répondre, nous avons dans un premier temps, optimisé un procédé de synthèse de différentes NPs luminescentes de Ln_2O_3 et $\text{Ln}_2\text{O}_2\text{S}$ ($\text{Ln} = \text{Gd}, \text{Dy}$ et Ho), sphériques et monodisperses en taille. Le diamètre des NPs obtenues est compris entre 50 nm et 170 nm. Si les NPs de $\text{Gd}_2\text{O}_2\text{S}:\text{Eu}^{3+}$ et $\text{Gd}_2\text{O}_3:\text{Eu}^{3+}$ sont fortement luminescentes sous excitation UV, les NPs de $\text{Ln}_2\text{O}_3:\text{Eu}^{3+}$ et $\text{Ln}_2\text{O}_2\text{S}:\text{Eu}^{3+}$ ($\text{Ln} = \text{Dy}$ et Ho) quant à elles, ont révélé une faible luminescence sous excitation UV.

Les NPs de $\text{Gd}_2\text{O}_3:\text{Er}; \text{Yb}$ et $\text{Gd}_2\text{O}_2\text{S}:\text{Er}; \text{Yb}$ sont aussi bien excitables en UV (400 et 380 nm) que dans le NIR (980 nm), ce qui fait d'elles **des NPs très versatiles** utilisables aussi bien pour l'imagerie *in vivo* qu'*in vitro*. L'émission visible en « up-conversion » se produit selon un processus à 2 photons. Nos NPs de $\text{Gd}_2\text{O}_3:\text{Er}; \text{Yb}$ et $\text{Gd}_2\text{O}_2\text{S}:\text{Er}; \text{Yb}$ sont donc de bonnes candidates pour le marquage biologique.

Dans une 2^{ème} partie, nous avons enrobé des NPs de $\text{Gd}_2\text{O}_2\text{S}:\text{Eu}^{3+}$ d'une couche de silice aminée ou mésoporeuse d'épaisseur et de composition contrôlables. Des tests de cytotoxicité et d'imagerie cellulaire *in vitro* ont montré que les NPs de $\text{Gd}_2\text{O}_2\text{S}:\text{Eu}^{3+}$ sont facilement internalisables par les cellules NIH3T3, non cytotoxiques jusqu'à une concentration de 1 mg/mL et sont fortement luminescentes en microscopie à fluorescence sous excitation à 365 nm. Ces NPs peuvent être considérées comme des marqueurs luminescents très efficaces après internalisation par endocytose. Le greffage de l'anticorps IgG1 effectué sur les NPs $\text{Gd}_2\text{O}_2\text{S}:\text{Eu}^{3+}$ a permis de détecter en une durée de 30 min les bactéries *E.coli*.

Enfin, dans une 3^{ème} partie, l'étude des propriétés relaxométriques a montré que la relaxivité obtenue pour des NPs de $\text{Dy}_2\text{O}_2\text{S}$ de 85 nm de rayon, est meilleure que celle mesurée pour les agents de contraste négatif commercialisés tels que le *Ferumoxide (AMI-125)* et le *Ferumoxtran-10 (AMI-22)*. La relaxivité transversale augmente linéairement avec le champ magnétique appliqué. Les images obtenues par résonance magnétique confirment la possibilité d'utilisation des NPs de $\text{Gd}_2\text{O}_2\text{S}:\text{Eu}^{3+}$ et $\text{Dy}_2\text{O}_2\text{S}:\text{Eu}^{3+}$ comme agents de contraste négatif pour l'imagerie par résonance magnétique.

À partir de $[\text{Gd}^{3+}] \approx 4$ mM, les NPs de $\text{Gd}_2\text{O}_2\text{S}:\text{Eu}^{3+}$ sont détectables en tomographie par rayons X et donc potentiellement utilisables comme agent de contraste en tomographie par rayons X.

Ce travail de thèse constitue une preuve du concept de nanoplateformes multimodales pour le diagnostic. Ces nanoplateformes peuvent être utilisées pour la reconnaissance et la capture des biomolécules ou comme agent de contraste en IRM ou en tomographie X. Pour compléter les travaux réalisés, des études *in vivo* doivent être menées afin de mieux évaluer le potentiel prometteur de ces nanoplateformes.

ANNEXES

Liste des publications

- [1] S. A. Osseni, S. Lechevallier, M. Verelst, P. Perriat, J. Dexpert-Ghys, D. Neumeyer, R. Garcia, F. Mayer, K. Djanashvili, J. A. Peters, E. Magdeleine, H. Gros-dagnac, P. Celsis, R. Mauricot, *Rare earth oxysulfide nanoparticles as multimodal imaging agents for T₂-weighted MR, X-ray tomography and photoluminescence*, soumise en septembre 2012
- [2] M. Verelst , J. Dexpert-Ghys, L. Marchin, R. Mauricot, S. A. Osseni, S. Lechevallier, *Nanoparticules luminescentes utilisables en tant que marqueurs et procédé pour leur préparation*, **Brevet Français**, FR2964665 (B1)/ date de publication : 16-03-2012 .
- [3] S. A. Osseni, S. Lechevallier, M. Verelst , C. Dujardin, J. Dexpert-Ghys, D. Neumeyer, M. Leclercq , H. Baaziz, D. Cussac, V. Santran, R. Mauricot, *New Nanoplatfrom based on Gd₂O₂S: Eu³⁺ core: synthesis, characterization and use for in-vitro bio-labelling*, **J. Mater. Chem**, 2011, 21, 18365.

I. Diffraction des rayons X (DRX)

La diffraction des rayons X permet d'identifier la nature des phases présentes dans un matériau et d'obtenir des informations sur sa structure cristalline. Les rayons X sont des rayonnements électromagnétiques présentant des longueurs d'onde proches des distances inter-atomiques des solides que l'on désire analyser. Ainsi, lorsqu'un faisceau de rayons X est envoyé sur un cristal, il y a diffraction par les atomes du réseau et on obtient un diffractogramme présentant des raies qui renseignent sur la nature de l'échantillon. Les diagrammes de diffraction ont été réalisés à l'aide d'un diffractomètre XRD 300TT SEIFERT, en configuration de Bragg-Brentano (θ - 2θ), travaillant avec la radiation K_α du cuivre ($\lambda=1,5406 \text{ \AA}$). Les échantillons ont été préparés en déposant une fine couche de poudre sur un porte échantillon en aluminium de 2 cm de diamètre spécialement usiné à cette fin.

II. Spectroscopie infrarouge

La spectroscopie infrarouge est basée sur l'absorption ou la réflexion de radiations électromagnétiques appartenant au domaine infrarouge (1-1000 μm). Les bandes d'absorption situées dans le moyen IR proviennent de l'interaction entre la composante électrique du rayonnement électromagnétique et les dipôles oscillants associés aux liaisons chimiques (modes de vibration). En raison des propriétés de symétrie du champ électrique incident, les vibrations symétriques sont invisibles en IR. Les spectres ont été réalisés sur un appareil Perkin Elmer Spectrum 100 Series, dans le domaine 4000-400 cm^{-1} . L'analyse des poudres est réalisée en pastille, préparée par frittage de l'échantillon dans une matrice de bromure de potassium (1% .mass).

III. Microscopie électronique en transmission

Les observations ont été réalisées sur deux microscopes du CEMES :

- Un CM20 (Philips), équipé d'un filament LaB6 et d'une caméra Gatan 1024*1024 pixels.
- Un CM30 (Philips), équipé d'un filament LaB6.

Tous les échantillons ont été observés par dépôt de quelques gouttes de poudre en suspension dans l'éthanol sur une grille de cuivre recouverte d'un très fin film de carbone. La mesure de la taille des particules a été effectuée sur des images contenant 35-50 particules.

IV. Mesures granulométriques (DLS)

La granulométrie des particules de taille nanométrique a été évaluée par diffusion de la lumière (DLS), en déterminant le diamètre hydrodynamique des nanoparticules en suspension. Ces

mesures ont été effectuées à l'aide d'un Nanosizer ZS Malvern Instrument ($\lambda = 630$ nm), en considérant les caractéristiques du milieu (viscosité, indice de réfraction).

V. Spectrophotomètre

Cet appareil permet de faire des mesures sur des échantillons solides, déposés sous forme de poudre dans des portes échantillons spécialement usinés à cet effet, ou sur des échantillons liquides, dans des cuves en quartz. L'appareil utilisé est un spectrophotomètre Jobin Yvon Fluorolog FL3-22, équipé d'un photomultiplicateur Hamamatsu R928. L'excitation est réalisée par une lampe Xe 450 W et les bandes spectrales sont sélectionnées par des monochromateurs comportant chacun un jeu de deux fentes motorisées dont l'ouverture peut être sélectionnée de manière continûment variable entre 0 et 7 mm. Le Fluorolog-3 comporte également un détecteur de référence (une photodiode) qui reçoit une fraction de la lumière incidente et permet la normalisation du signal de fluorescence par rapport à l'intensité d'excitation reçue. Cette référence est très utile pour corriger les fluctuations de la lampe dans le temps (long terme) et pour les acquisitions des spectres d'excitation. Pour l'analyse des déclinés de luminescence, une lampe Xe pulsée a été employée.

L'émission en up-conversion a été obtenue grâce au faisceau d'un laser fonctionnant à 980 nm avec une puissance maximale de 2 Watts.

VI. Spectroscopie d'absorption UV-visible

Les courbes d'absorbance des particules ont été obtenues entre 200 et 800 nm à l'aide du spectrophotomètre UV-visible CARY 300 scan de Varian.

VII. Microscopie à fluorescence et internalisation des NPs

Les cellules de souris de type NIH3T3 ont étéensemencées dans 96 puits plats avec une densité de $3 \cdot 10^3$ cellules/puits à 37°C dans une atmosphère humidifiée à 95% et contenant 5% de CO₂. Le milieu a été renouvelé toutes les 24 h et les cellules rincées (2 fois) avec du PBS (Phosphate Buffered Saline). Les NPs de Gd₂O₂S:Eu³⁺ sont mises en suspension dans du PBS à différentes concentrations et rajoutées au milieu cellulaire. Après des périodes d'incubation de 4, 7 et 11 jours des NPs, des essais MTT ont été réalisés. Les mesures de densité optique des solutions obtenues ont été effectuées à $\lambda_{exc} = 570$ nm.

Pour l'imagerie cellulaire, les NPs de Gd₂O₂S:Eu³⁺ sont incubées avec les cellules à une concentration de 0,1 mg/mL pendant 24 h dans les mêmes conditions que les tests de cytotoxicité. Les images cellulaires sont obtenues avec en microscopie à fluorescence avec une longueur d'onde d'excitation à 365 nm et possibilité d'observation à 605/640 nm.

VIII. Spectroscopie par résonance magnétique nucléaire

VIII.1. Théorie

Lorsqu'un composé paramagnétique à base de lanthanides est ajouté à un milieu aqueux, la relaxation des protons de l'eau augmente¹⁷⁰. En règle générale, l'efficacité d'un agent de contraste est déterminée par sa relaxivité, qui est la capacité d'un composé magnétique d'augmenter la vitesse de relaxation des spins des protons qui l'entourent. Elle est exprimée en ($s^{-1} \cdot mM^{-1}$) de l'ion métallique paramagnétique. L'augmentation de la relaxation induite par la présence du composé paramagnétique à base de lanthanides est la somme de quatre différentes contributions : diamagnétique (R_{dia}), dipolaire (R_{iD}), de contact (R_{iC}) et de Curie ($R_{i\chi}$) exprimée par :

$$R_i = R_{dia} + R_{iD} + R_{iC} + R_{i\chi} \quad \text{avec } R_i = 1/T_i ; i = 1, 2. \quad (A.1)$$

En général, la composante diamagnétique est négligeable, la composante dipolaire exprime un effet spatial résultant du couplage dipolaire entre les spins des électrons célibataires de l'ion lanthanide et les spins du noyau¹⁷¹. L'effet de contact est transmis par liaison chimique et résulte du couplage scalaire entre les spins des électrons célibataires et les spins du noyau¹⁷². La composante de Curie ou spin de relaxation de Curie provient de l'interaction dipolaire entre le noyau et la polarisation de spins d'électron¹⁷³.

La relaxation de spin de Curie devient un facteur important de la relaxivité de l'eau uniquement lorsque le temps de relaxation électronique (T_{1e}) de l'ion paramagnétique est assez court pour permettre aux spins de revenir à leur équilibre thermique avant le changement de position de la molécule. En d'autres termes, les molécules doivent être pratiquement immobiles pendant le temps de relaxation électronique T_{1e} , ce qui nécessite $\tau_R \gg T_{1e}$ (τ_R est le temps de corrélation rotationnelle).

L'ion Gd^{3+} possède un état fondamental électronique isotrope ($^8S_{7/2}$) et une orbitale f à moitié remplie avec 7 électrons non appariés. Son moment orbital est non nul, par conséquent, son temps de relaxation électronique (T_{1e}) est relativement long ($\approx 5 T_{1e}$ des autres ions lanthanides paramagnétiques tels que : Dy^{3+} et Ho^{3+} qui ont des états fondamentaux fortement anisotropes). Pour les petits complexes tels que Ln-DTPA, $\tau_R \approx 10^{-10}$ s et donc pour Ln = Gd, $\tau_R \ll T_{1e}$ et la contribution de la relaxation de spin est négligeable.

D'autre part, pour les autres Ln^{3+} paramagnétiques, τ_R est toujours très supérieur à T_{1e} . Dans ces conditions, le processus de relaxation induit par le moment de Curie n'est pas affecté par le temps de relaxation électronique et peut devenir important, surtout pour les ions Ln^{3+} ayant un fort moment magnétique (Dy^{3+} , Ho^{3+}).

En raison de l'anisotropie de l'état fondamental de l'ion paramagnétique Ln^{3+} ($Ln \neq Gd$), il existe entre l'ion Ln^{3+} et les molécules d'eau une différence de fréquence de Larmor : $\Delta\omega_M$,

proportionnelle à l'intensité du champ magnétique externe B_0^{186} . Le processus de relaxation globale est modulé par échange chimique entre l'eau en coordinence avec l'ion Ln^{3+} . Il est expliqué par la théorie de Swift-Connick¹⁸⁷ et a été décrit en détail par Vander Elst. et *al.*¹⁸⁸.

V.III.1.1. Augmentation de la relaxation longitudinale

La relaxation longitudinale des protons de l'eau est la somme de la relaxation de la sphère de coordinence interne « inner-sphere » (R_1^{IS}) et celle de la sphère de coordinence externe « outer-sphere » (R_1^{OS}). Les temps de corrélation gouvernant ces 2 types de relaxation sont illustrés sur la figure V.12.

La relaxation de la sphère de coordinence interne s'exprime par :

$$R_1^{IS} = fq \frac{1}{T_{1M} + \tau_M} \quad (A.2)$$

- f : rapport molaire entre l'ion Ln^{3+} et l'eau.
- q : nombre de molécules d'eau en coordinence avec l'ion Ln^{3+} .
- τ_{IM} : temps de résidence des molécules d'eau en coordinence et échangeant avec les molécules d'eau libres.
- T_{1M} : temps de relaxation du noyau ($R_{1M} = 1/T_{1M}$)

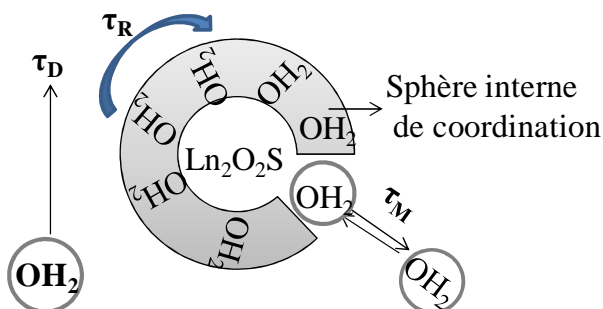


Figure 1. Schéma représentatif des temps de corrélation déterminant l'augmentation de la vitesse de relaxation longitudinale de l'eau par Ln_2O_2S .

La relaxation R_{1M} est composée des contributions provenant des relaxations de contact (R_{1C}), dipolaire (R_{1D}), et de Curie ($R_{1\gamma}$). Pour les lanthanides autres que le gadolinium, le terme de contact est beaucoup plus faible que les termes : dipolaire et de Curie. Il peut être ainsi négligé¹⁶⁸ et $R_{1M} = R_{1D} + R_{1\gamma}$. Ces deux contributions s'expriment par :

$$R_{1D} = \frac{2}{15} \left(\frac{\mu_0}{4\pi} \right)^2 \gamma_I^2 \mu_{eff}^2 \frac{1}{r^6} \left[\frac{3\tau_{C1}}{1+\omega_I^2\tau_{C1}^2} + \frac{7\tau_{C2}}{1+\omega_S^2\tau_{C2}^2} \right], \quad (A.3)$$

$$R_{1X} = \frac{2}{5} \left(\frac{\mu_0}{4\pi} \right)^2 \gamma_I^2 \mu_C^2 \frac{1}{r^6} \left[\frac{3\tau_{CC}}{1+\omega_I^2\tau_{CC}^2} \right] \quad (A.4)$$

Dans ces équations,

- μ_0 désigne la perméabilité du vide.
- γ_I désigne le rapport gyromagnétique d'un noyau ^1H .
- μ_{eff} désigne le moment magnétique effectif du lanthanide et est calculé par $\mu_{eff} = \mu_B g \sqrt{J(J+1)}$.
- μ_C désigne le moment magnétique de Curie et est calculé par $\mu_C = \mu_{eff}^2 B_0 / 3k_B T$ (k_B désignant la constante de Boltzmann, g le facteur de Lande et J le nombre quantique total de spin).
- r : représente la distance entre l'ion Ln^{3+} et le proton de l'eau en coordinence.
- ω_I et ω_S représentent respectivement la fréquence angulaire de précession du proton et celle de l'électron.
- τ_{C1} est le temps de corrélation modulant les interactions dipolaires ($\tau_{C1}^{-1} = \tau_R^{-1} + \tau_M^{-1} + T_{ie}^{-1}$).
- τ_{CC} est le temps de corrélation de Curie ($\tau_{CC}^{-1} = \tau_R^{-1} + \tau_M^{-1}$).

Pour les lanthanides paramagnétiques autres que le Gd^{3+} , le temps de corrélation τ_{C1} est dominé par de faible temps de relaxation électronique ($\tau_{C1}^{-1} \approx T_{ie}^{-1}$). Ainsi la contribution dipolaire à la vitesse de relaxation est très petite. En général, τ_M est significativement plus grand que τ_R et la composante de Curie devient : $\tau_{CC}^{-1} = \tau_R^{-1}$.

À la limite d'un échange rapide où $\tau_M \ll T_{IM}$, la relaxation longitudinale de la sphère interne R_1^{IS} devient $R_1^{IS} = fqR_M$ (voir équation V.2). À la limite d'un échange lent où $\tau_M \gg T_{IM}$, $R_1^{IS} = fq/\tau_M$ et la relaxivité peut être fortement atténuée des fortes valeurs de τ_M ¹⁸⁹.

La relaxation longitudinale de la sphère externe (R_1^{OS}) est également constituée d'un terme dipolaire (R_{1D}^{OS}) modulé par le temps de relaxation électronique et le terme de Curie (R_{1X}^{OS}) modulé par le temps de corrélation translationnelle : τ_d ($\tau_d = a^2/D$; a : représente la distance entre le proton de l'eau et l'ion Ln^{3+} au centre ; D : constante de diffusion relative). Ces deux contributions sont exprimées par les équations suivantes d'après Freed et al.¹⁹⁰.

$$R_{1D}^{OS} = \frac{32\pi}{135000} \left(\frac{\mu_0}{4\pi} \right)^2 \gamma_I^2 \mu_B^2 g_J^2 N_A \frac{M}{aD} \times [3f_D(\omega_I; \tau_d; T_{ie}) + 7f_D(\omega_S; \tau_D; T_{ie})], \quad (A.5)$$

$$R_{1\chi}^{OS} = \frac{32\pi}{45000} \left(\frac{\mu_0}{4\pi}\right)^2 \gamma_I^2 \mu_B^2 g_J^2 N_A \frac{M}{a_D} \mu_C^2 \times [3j_\chi(\omega_I; \tau_d)] \quad (\text{A.6})$$

Avec :

- N_A : nombre d'Avogadro.
- μ_B : magnéton de Bohr.
- M : concentration molaire de l'ion paramagnétique.
- j_D et j_χ sont respectivement les fonctions de densité spectrale de l'interaction dipolaire et de Curie.

Ainsi, tant que $\tau_M \ll T_{1M}$, la relaxivité longitudinale totale est négligeable à faible champ ($B_0 < 1,5$ T) à cause de la faible valeur de T_{1e} mais devient élevée à forte valeur du champ B_0 en raison de la contribution des termes de Curie et de la sphère interne/externe.

VIII.1.2. Augmentation de la relaxation transversale

Le terme de la relaxation transversale est donné par l'expression suivante.

$$R_2^{IS} = f q \frac{1}{\tau_M} \frac{\frac{1}{T_{2M}^2} + \frac{1}{\tau_M T_{2M}} + \Delta\omega_M^2}{\left(\frac{1}{\tau_M} + \frac{1}{T_{2M}}\right)^2 + \Delta\omega_M^2} \quad (\text{A.7})$$

Avec $T_{2M} = 1/R_{2M}$ et $\Delta\omega_M$ (exprimée en $\text{rad}\cdot\text{s}^{-1}$) désignant le déplacement chimique du proton lié avec l'ion paramagnétique par rapport au proton libre dans l'eau. En général, R_{2M} est la somme des trois composantes : R_{2D} , $R_{2\chi}$ et R_{2C} dont les expressions sont décrites comme suit :

$$R_{2D} = \frac{1}{15} \left(\frac{\mu_0}{4\pi}\right)^2 \gamma_I^2 \mu_{eff}^2 \frac{1}{r^6} \left[4\tau_{C1} + \frac{3\tau_{C1}}{1+\omega_I^2\tau_{C1}^2} + \frac{13\tau_{C2}}{1+\omega_S^2\tau_{C2}^2} \right], \quad (\text{A.8})$$

$$R_{2\chi} = \frac{1}{5} \left(\frac{\mu_0}{4\pi}\right)^2 \gamma_I^2 \mu_{eff}^2 \frac{1}{r^6} \left[4\tau_{CC} + \frac{3\tau_{C1}}{1+\omega_I^2\tau_{CC}^2} \right], \quad (\text{A.9})$$

$$R_{2C} = \frac{4}{3} \Delta\omega_{cont}^2 \tau_M. \quad (\text{A.10})$$

$\Delta\omega_{cont}$ représente le déplacement chimique de contact et est calculé par :

$$\Delta\omega_{cont} = \frac{g_I(g_J-1)\mu_B I(J+1)A}{3kT} \frac{A}{\hbar} \quad (\text{A.11})$$

Avec $\frac{A}{h}$ (exprimé en rad.s^{-1}) et désignant la constante de couplage $\text{Ln} - {}^1\text{H}$. À la limite d'un échange rapide où $\tau_M \ll T_{2M}$ et quand $\tau_M \ll \Delta\omega_M^{-1}$ l'équation (V.7) peut être simplifiée comme suit:

$$R_2^{IS} \cong fQ \left(\frac{1}{T_{2M}} + \tau_M \Delta\omega_M^2 \right) \quad (\text{A.12})$$

Lorsque l'échange de protons devient faible à tel point où $\tau_M \geq \Delta\omega_M^{-1}$ et $\Delta\omega_M$ est faible, R_2^{IS} devient égale à fQR_{2M} pour des faibles valeurs du champ magnétique appliqué. Mais lorsqu'on applique un moyen ou fort champ, l'équation (V.7) peut s'écrire comme suit :

$$R_2^{IS} = fQ \frac{\tau_M \Delta\omega_M^2}{1 + \tau_M^2 \Delta\omega_M^2} \quad (\text{A.13})$$

De ces équations, nous pouvons tirer deux conclusions importantes :

- À faible champ où $\tau_M \Delta\omega_M^2 \ll 1/T_{2M}$ et $\tau_M^2 \Delta\omega_M^2 \ll 1$ comme nous l'avons vu pour R_1^{IS} , la relaxivité transversale s'exprime par :

$$R_2^{IS} \cong fQR_{2M} \quad (\text{A.14})$$

- À des fortes ou moyennes valeurs de champ appliqué, la relaxivité est dominée par un mécanisme d'échange d'eau et 2 cas peuvent être distingués :
 - $\tau_M \Delta\omega_M^2 \gg 1/T_{2M}$ et $\tau_M^2 \Delta\omega_M^2 \ll 1$ où la relaxivité transversale de la sphère interne est proportionnelle au produit du temps de résidence (τ_M) de l'eau et à $\Delta\omega_M^2$, ce qui nous permet d'écrire l'équation :

$$R_2^{IS} = fQ\tau_M \Delta\omega_M^2 \quad (\text{A.15})$$

- $\tau_M \Delta\omega_M^2 \gg 1/T_{2M}$ et $\tau_M^2 \Delta\omega_M^2 \gg 1$, ce régime a lieu à fort champ où $\Delta\omega_M^2$ est très grand. Ainsi, R_2^{IS} devient indépendante de $\Delta\omega_M$ et décroît lorsque le temps de résidence (τ_M) de l'eau augmente selon l'équation :

$$R_2^{IS} = \frac{fQ}{\tau_M} \quad (\text{A.16})$$

Ce qui permet de déduire qu'à la limite de faible échange d'eau, $R_2^{IS} = R_1^{IS}$.

Comme dans le cas de la relaxation longitudinale, la relaxation transversale de la sphère externe (R_2^{OS}) est également constituée d'un terme dipolaire (R_{2D}^{OS}) modulé par le temps de relaxation électronique et le terme de Curie ($R_{2\chi}^{OS}$) modulé par le temps de corrélation translationnelle : τ_d .

$$R_{2D}^{OS} = \frac{32\pi}{135000} \left(\frac{\mu_0}{4\pi}\right)^2 \gamma_I^2 \mu_B^2 g_J^2 N_A \frac{M}{aD} \times [1,5j_D(\omega_I; \tau_d; T_{ie}) + 2j_D(0; \tau_d; T_{ie}) + 6,5j_D(\omega_S; \tau_d; T_{ie})] \quad (V.17)$$

$$R_{2\chi}^{OS} = \frac{32\pi}{45000} \left(\frac{\mu_0}{4\pi}\right)^2 \gamma_I^2 \mu_B^2 g_J^2 N_A \frac{M}{aD} \mu_C^2 \times [1,5(\omega_I; \tau_d) + 2j_\chi(0; \tau_d)] \quad (A.18)$$

En pratique, de nombreux paramètres rentrent en jeu dans la description du mécanisme de relaxation d'un agent de contraste. Pour obtenir **une relaxivité élevée, plusieurs paramètres tels que le nombre de molécules d'eau dans la sphère de coordination de l'ion paramagnétique, leur vitesse d'échange, le temps de corrélation rotationnelle du composé et le temps de relaxation électronique sont à optimiser**. De plus, **leur influence sur la relaxivité varie en fonction du champ magnétique**. Ainsi, des propriétés différentes sont requises pour leur utilisation aux champs forts (7 à 9,4 T) ou aux champs classiques de l'IRM actuelle (0,5 à 1,5 T).

Les ions Ln^{3+} ($\text{Ln} = \text{Dy}, \text{Ho}$) contrairement au Gd^{3+} , possèdent de **faibles temps de relaxation électronique et sont donc des « relaxers » efficaces à moyens et forts champs magnétiques**. Ces faibles temps de relaxation électronique des ions Ln^{3+} ($\text{Ln} = \text{Dy}, \text{Ho}$) sont dus à la **forte anisotropie de leur état fondamental** ; ce qui augmente aussi la différence de déplacement chimique entre les protons en coordinence avec l'ion Ln^{3+} et les protons libres.

VIII.2. Applications

À faible champ : B=1,4 Tesla

Les mesures ont été effectuées dans les laboratoires de recherche : Matériaux : Ingénierie et Sciences (MATEIS) et au laboratoire de physico-chimie des matériaux luminescents de Lyon. Le temps de relaxation longitudinale, T1, et le temps de relaxation transversale, T2 ont été mesurés à bas champ (1,4T) avec un relaxomètre RMN (Bruker Minispec 60 MHz, 25°C). Pour l'étude des propriétés relaxométriques, des suspensions de NPs de $\text{Gd}_2\text{O}_2\text{S}:\text{Eu}^{3+}$ ont été préparées en mélangeant les particules avec du gel d'agar (1,5% .mass). La variation des taux de relaxation (1/T1 et 1/T2) en fonction de la concentration en Gd^{3+} a permis de calculer les relaxivités r_1 et r_2 .

À fort champ: B=7 Tesla et 9,4 Tesla

Les temps de relaxation T1 et T2 des protons de l'eau en présence de nos matériaux ont été mesurés par un spectromètre RMN (Varian-INOVA spectrometer) à 300 MHz et utilisant un système de séquences d'impulsions CPMG (Carr-Purcell-Meiboom-Gill). Ces manipulations ont été effectuées au sein du laboratoire de Biocatalyse et de chimie organique de l'Université de Technologie de Delft (Pays-Bas).

Les NPs de Ln_2O_3 et $\text{Ln}_2\text{O}_2\text{S}$ ($\text{Ln} = \text{Gd}^{3+}, \text{Ho}^{3+}$ et Dy^{3+}) sont dispersées aux ultrasons pendant 5 min dans une solution aqueuse de Xanthane à 1%.mass. Le Xanthane est utilisé comme dispersant et surfactant pour éviter les problèmes de précipitation qui pourraient avoir lieu lors de l'application de fort champ magnétique. Toutes les valeurs de temps de relaxation ont été corrigées par soustraction de la ligne de base du Xanthane et des valeurs de relaxivité des suspensions de composés diamagnétiques (Y_2O_3 pour les Ln_2O_3 et $\text{Y}_2\text{O}_2\text{S}$ pour les $\text{Ln}_2\text{O}_2\text{S}$).

Les relaxivités transversales R_2 (exprimées en s^{-1}) sont déterminées par application d'une séquence d'impulsions de 180° . Parfois, **la relaxation transversale peut être plus rapide en raison des inhomogénéités du champ magnétique externe**. Dans ce cas, le déphasage des spins dans le plan transversal est accéléré puisque la vitesse de rotation des protons varie en fonction du champ magnétique. Le temps de relaxation transversale qui tient compte de **l'interaction spin-spin et des inhomogénéités du champ magnétique** est alors désigné par T_2^* et exprimé comme suit :

$$T_2^* = T_2 + \text{Temps de relaxation dû aux inhomogénéités du champ magnétique}$$

La relaxivité transversale R_2^* (exprimées en s^{-1}) est déterminée à partir de la constante de temps T_2^* mesurée à partir du signal RMN.

IX. Imagerie par résonance magnétique (IRM)

Nous avons évalué les potentialités d'utilisation des NPs comme agents de contraste négatif pour l'IRM. Nous avons fait des essais *in vitro* (imagerie pondérée T2) de suspensions de NPs contenues dans du gel d'agar (1,5%.mass). La concentration en Ln^{3+} ($\text{Ln} = \text{Gd}, \text{Dy}$) a été variée entre 0 et 15 mM. Les images des fantômes en IRM ont été effectuées avec un appareil clinique de 3 T situé sur la plateforme d'imagerie médicale de l'hôpital de Purpan (France). Des séquences d'écho de spin pondérées en T2 avec un temps de répétition (TR) égal à 1500 ms et un temps d'écho (TE) égal à 11 ms. Les images ont été acquises sur une matrice de 160 * 120 mm avec un champ de vue de 1*1*5 mm et une épaisseur de tranche de 5 mm.

X. Tomographie par rayons X

L'acquisition des images par tomographie a été effectuée à l'institut Sainte Cathérine d'Avignon (France). Le scanner (tomodensitomètre) est un GE RT16 et réglé à 100 keV. L'accélérateur équipé des systèmes d'imagerie Portal et OBI (On Board Imaging) est un TrueBeam STX de marque VARIAN.

Les échantillons sont exposés à l'intérieur d'un fantôme simulant l'épaisseur moyenne d'un patient (figure ci-dessous). Ils sont exposés aux modalités RX suivantes :

- Tomodensitométrie (scanner)
- Faisceau de traitement (6MV)
- Images planes KV (OBI)
- Images CB-CT (système d'imagerie par tomographie conique de basse énergie)

Des échantillons fantômes ont été préparés à partir de suspensions de NPs de $Gd_2O_3:Eu^{3+}$ dans du gel d'agar (1,5%.mass), puis introduits dans les trous d'une plaque en plastique perforée.



Figure 2 : Images des différents types d'imageur utilisés et du fantôme.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

Références bibliographiques

- [1] M. Beaud, *L'art de la thèse : Comment préparer et rédiger une thèse de doctorat, un mémoire de DEA ou de maîtrise ou tout autre travail universitaire*, **Nouvelle édition**, 1994, 5.
- [2] S. Y. Tan, S. Grimes, *Paul Ehrlich (1854-1915): man with the magic bullet*, **Singapore Med J**, 2010, 51 (11), 842-3.
- [3] *Definition of a nanomaterial*, **Journal officiel de la commission de l'Union Européenne**, 18/11/2011.
- [4] C. Kumar, *Biological and Pharmaceutical Nanomaterials*. **Nanotechnologies for the Life Sciences**, 2006, 2.
- [5] A. D. Bangham, M. M. Standish, J. C. Watkins, *Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids*, **J Mol Biol**, 1965, 13, 238-52.
- [6] A. Lorin, C. Flore, A. Thomas, R. Brasseur, *Les liposomes : description, fabrication et applications*, **Biotechnol. Agron. Soc. Environ.**, 2004, 8 (3), 163-176.
- [7] G. Gregoriadis, *Carrier Potential of Liposomes in Biology and Medicine .1*, **New England Journal of Medicine**, 1976, 295(13), 704-710.
- [8] H. Pinto-Alphandary, A. Andreumont, P. Couvreur, *Targeted delivery of antibiotics using liposomes and nanoparticles: research and applications*, **International Journal of Antimicrobial Agents**, 2000, 13(3), 155-168.
- [9] B. Mukherjee, B. Patra, B. Layek, A. Mukherjee, *Sustained release of acyclovir from nano-liposomes and nanoniosomes: An in vitro study*, **International Journal of Nanomedicine**, 2007, 2(2), 213-225.
- [10] K. Letchford, H. Burt, *A review of the formation and classification of amphiphilic block copolymer nanoparticulate structures: micelles, nanospheres, nanocapsules and polymersomes*, **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, 2007. 65(3), 259-269.
- [11] Y. Fukumori , H. Ichikawa, *Nanoparticles for cancer therapy and diagnosis*, **Adv. Powder Technology**, 2006, 17, 1-28.
- [12] H. Wartlick, B. Spankuch-Schmitt, K. Strebhardt, J. Kreuter, K. Langer, *Tumor cell delivery of antisense oligonucleotides by human serum albumin nanoparticles*, **J. Control. Release**, 2004, 3, 483-495.
- [13] G. Kaul, M. Amiji, *Long-circulating poly(ethylene glycol)-modified gelatine nanoparticles for intracellular delivery*, **Pharm. Res**, 2002, 19, 1061-1067.
- [14] P. Couvreur, C. Vauthier, *Nanotechnology : intelligent design to treat complex disease*, **Pharm. Res**, 2006, 23, 1417-1450.
- [15] F. Podlogar, M. Gasperlin, M. Tomsic, A. Jamnik, M. B. Rogac. *Structural characterisation of water-Tween 40/Imwitor 308-isopropyl myristate microemulsions using different experimental methods*, **Int J Pharm**, 2004, 276, 115-28.

- [16] J. Seki, S. Sonoke, A. Saheki, H. Fukui, H. Sasaki, T. Mayumi, *A nanometer lipid emulsion, lipid nano-sphere (LNS), as a parenteral drug carrier for passive drug targeting*. **Int J Pharm**, 2004, 273, 75-83.
- [17] T. Tadros, P. Izquierdo, J. Esquena, C. Solans, *Formation and stability of nano-emulsions*, **Adv Colloid Interface Sci**, 2004, 108-109, 303 - 18.
- [18] O. M. Koo, I. Rubinstein, H. Onyuksel, *Role of nanotechnology in targeted drug delivery and imaging: a concise review*, **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, 2005. 1(3), 193-212.
- [19] P. Reiss, M. Protiere, L. Li, *Core/Shell semiconductor nanocrystals*, **Small**, 2009, 5 (2), 154–168.
- [20] X. Michalet, F. F. Pinaud, L. A. Bentolila, J. M. Tsay, S. Doose, J. J. Li, G. Sundaresan, A. M. Wu, S. S. Gambhir, S. Weiss, *Quantum dots for live cells, in vivo imaging, and diagnostics*, **Science**, 2005, 307 (5709), 538–544.
- [21] W. Cai, X. Chen, *Preparation of peptide-conjugated quantum dots for tumor vasculature-targeted imaging*. **Nat. Protoc**, 2008, 3 (1), 89–96.
- [22] W. Yunqing, C. Lingxin, *Quantum dots, lighting up the research and development of nanomedicine*, **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, 2011, 7, 4, 385-402.
- [23] T. S. Hauck, R. E. Anderson, H. C. Fischer, S. Newbigging, W. C. W. Chan, *In vivo quantum-dot toxicity assessment*, **Small**, 2009, 6 (1), 138–144.
- [24] N. L. Rosi, D. A. Giljohann, C. S. Thaxton, A. K. Lytton-Jean, M. S. Han, C. A. Mirkin, *Oligonucleotide-Modified Gold Nanoparticles for Intracellular Gene Regulation*, **Science**, 2006, 312, 1027.
- [25] M. Thomas, A. M. Klibanov, *Conjugation to gold nanoparticles enhances polyethylenimines transfer of plasmid DNA into mammalian cells*, **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A**, 2003, 100, 9138-9143.
- [26] M. A. El-Sayed, *Some interesting properties of metals confined in time and nanometer space of different shapes*, **Acc. Chem. Res**, 2001, 34 (4), 257–264.
- [27] S. Link, M. A. El-Sayed, *Spectral properties and relaxation dynamics of surface plasmon electronic oscillations in gold and silver nanodots and nanorods*, **J. Phys. Chem. B**, 1999, 103 (40), 8410–8426.
- [28] S. Link, M. A. El-Sayed, *Shape and size dependence of radiative, non-radiative and photothermal properties of gold nanocrystals*, **Int. Rev. Phys. Chem**, 2000, 19 (3) 409–453.
- [29] X. H. Huang, I. H. El-Sayed, W. Qian, M. A. El-Sayed, *Cancer cell imaging and photothermal therapy in the near-infrared region by using gold nanorods*, **J. Am. Chem. Soc**, 2006, 128 (6), 2115–2120.

- [30] J. Y. Chen, D. L. Wang, J. F. Xi, L. Au, A. Siekkinen, A. Warsen, Z. Y. Li, H. Zhang, Y. N. Xia, X. D. Li, *Immuno gold nanocages with tailored optical properties for targeted photothermal destruction of cancer cells*, **Nano Lett**, 2007, 7 (5), 1318–1322.
- [31] C. Loo, A. Lowery, N. Halas, J. West, R. Drezek, *Immunotargeted nanoshells for integrated cancer imaging and therapy*, **Nano Lett**, 2005, 5 (4), 709–711.
- [32] N. R. Jana, L. Gearheart, C. J. Murphy, *Seed-mediated growth approach for shapecontrolled synthesis of spheroidal and rod-like gold nanoparticles using a surfactant template*, **Adv. Mater**, 2001, 13 (18), 1389–1393.
- [33] N. R. Jana, L. Gearheart, C. J. Murphy, *Wet chemical synthesis of high aspect ratio cylindrical gold nanorods*, **J. Phys. Chem. B**, 2001, 105 (19), 4065–4067.
- [34] N. R. Jana, L. Gearheart, S. O. Obare, C. J. Murphy, *Anisotropic chemical reactivity of gold spheroids and nanorods*, **Langmuir**, 2002, 18 (3), 922–927.
- [35] C. R. Martin, *Nanomaterials – a membrane-based synthetic approach*, **Science**, 1994, 266 (5193), 1961–1966.
- [36] J. Burdick, E. Alonas, H. C. Huang, K. Rege, J. Wang, *High-throughput template multisegment synthesis of gold nanowires and nanorods*, **Nanotechnology**, 2009, 20 (6).
- [37] C. Alexiou, W. Arnold, R. J. Klein, F. G. Parak, P. Hulin, C. Bergemann, W. Erhardt, S. Wagenpfeil, A. S. Lubbe, *Locoregional cancer treatment with magnetic drug targeting*, **Cancer Res**, 2000, 60 (23), 6641–6648.
- [38] J. W. Bulte, Y. Hoekstra, R. L. Kamman, R. L. Magin, A. G. Webb, R. W. Briggs, K. G. Go, C. E. Hulstaert, S. Miltenyi, T. H. The, *Specific MR imaging of human lymphocytes by monoclonal antibody-guided dextran-magnetite particles*, **Magn. Reson. Med**, 1992, 25 (1), 148–157.
- [39] Q. A. Pankhurst, J. Connolly, S. K. Jones, J. Dobson, *Applications of magnetic nanoparticles in biomedicine*, **J. Phys. D: Appl. Phys**, 2003, 36, 167–181.
- [40] R. Weissleder, D. D. Stark, B. L. Engelstad, B. R. Bacon, C. C. Compton, D. L. White, P. Jacobs, J. Lewis, *Superparamagnetic iron oxide: pharmacokinetics and toxicity*, **AJR**, 1989, 152 (1), 167–173.
- [41] J. Lee, T. Isobe, M. Senna, *Preparation of ultrafine Fe₃O₄ particles by precipitation in the presence of PVA at high pH*, **J. Colloid Interface Sci**, 1996, 177 (2), 490–494.
- [42] A. K. Gupta, M. Gupta, *Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications*, **Biomaterials**, 2005, 26 (18), 3995–4021.
- [43] P. Reimer, T. Balzer, *Ferucarbotran (Resovist): a new clinically approved RES-specific contrast agent for contrast-enhanced MRI of the liver: properties, clinical development, and applications*, **Eur. Radiol**, 2003, 13 (6), 1266–1276.
- [44] C. Gruttner, J. Teller, *New types of silica-fortified magnetic nanoparticles as tools for molecular biology applications*, **J. Magn. Mater**, 1999, 194, 8–15.

- [45] C. Berry, A. S. G. Curtis, *Functionalization of magnetic nanoparticles for applications in biomedicine*, **J. Phys. D Appl. Phys.**, 2003, 36, 198–206.
- [46] H.W. Kroto, J. R. Heath, S. C. O'Brien, R. F. Curl, R. E. Smalley, *C60: Buckminsterfullerene*, **Nature**, 1985, 318, 162–163.
- [47] E. Osawa, *C60: Buckminsterfullerene*, **Kagaku**, 1970, 25, 854.
- [48] D. Koruga, L. Matija, N. Misic, P. Rakin, *Fullerene C60: properties and possible applications*. **Trans. Tech. Publ. Mat. Sci. Forum**, 1996, 214, 49–56.
- [49] J.H. Zagal, S. Griveau, K. I. Ozoemena, T. Nyokong, F. Bedioui, *Carbon nanotubes, phthalocyanines and porphyrins: attractive hybrid materials for electrocatalysis and electroanalysis*, **J Nanosci. Nanotechnol**, 2009, 9 (4), 2201–2214.
- [50] G. V. Andrievsky, V. I. Bruskov, A. A. Tykhomyrov, S. V. Gudkov, *Peculiarities of the antioxidant and radioprotective effects of hydrated C(60) fullerene nanostructures in vitro and in vivo*, **Radic. Biol. Med**, 2009.
- [51] H. J. Johnston, G. R. Hutchison, F. M. Christensen, K. Aschberger, V. Stone, *The biological mechanisms and physicochemical characteristics responsible for driving fullerene toxicity*. **Toxicol. Sci**, 2009.
- [52] M. Terrones, N. Grobert, J. Olivares, J. P. Zhang, H. Terrones, K. Kordatos, W. K. Hsu, J. P. Hare, P. D. Townsend, K. Prassides, A. K. Cheetham, H. W. Kroto, D. R. M. Walton, *Controlled production of aligned-nanotube bundles*, **Nature**, 1997, 388 (6637), 52–55
- [53] T. Enoki, K. Takai, V. Osipov, M. Baidakova, A. Vul, *Nanographene and nanodiamond; new members in the nanocarbon family*. **Chem. Asian J**, 2009, 4, 796–804.
- [54] A. Krueger, *New carbon materials: biological applications of functionalized nanodiamond materials*, **Chemistry**, 2008, 14 (5), 1382–1390.
- [55] E. Matijevic, W. P. Hsu, *Preparation and Properties of Monodispersed Colloidal Particles of Lanthanide Compounds*, **J. Colloid Interface Sci**, 1987, 118, 506– 253
- [56] C. Louis, R. Bazzi, C.A. Marquette, J.L. Bridot, S. Roux, G. Ledoux, B. Mercier, L. Blum, P. Perriat, and O. Tillement, *Nanosized hybrid particles with double luminescence for biological labeling*, **Chem. Mater**, 2005, 17, 1673–1682.
- [57] D. Dosev, M. Nichkova, M. Liu, B. Guo, G.Y. Liu, B. D. Hammock, I.M. Kennedy, *Application of luminescent Eu :Gd₂O₃ nanoparticles to the visualization of protein micropatterns*, **Journal of Biomedical Optics**, 2005, 10 :064006.
- [58] S. L. Issler, C. C. Torardi, *Solid state chemistry and luminescence of X-ray phosphors*, **Journal of Alloys and Compounds**, 1995, 229, 54-65.
- [59] C. Huang, T. Liu, C. Su, Y. Lo, J. Chen, C. Yeh, *Superparamagnetic Hollow and Paramagnetic Porous Gd₂O₃ Particles*, **Chem. Mater**, 2008, 20, 3840–3848.

- [60] J. Y. Park, K. Kattel, W. Xu, H. G. Kim, E. J. Lee, G. H. Lee, *Longitudinal Water Proton Relaxivities of $Gd(OH)_3$ Nanorods, $Gd(OH)_3$ Nanoparticles, and Gd_2O_3 Nanoparticles: Dependence on Particle Diameter, Composition, and Morphology*, **Journal of the Korean Physical Society**, 2011, 59, 3, 2376-2380.
- [61] H. K. Cho, H. J. Cho, S. Lone, D. Kim, J. H. Yeum, I. W. Cheong, *Preparation and characterization of MRI-active gadolinium nanocomposite particles for neutron capture therapy*, **J. Mater. Chem**, 2011, DOI: 10.1039/c1jm11608h.
- [62] S. Lechevallier, P. Lecante, R. Mauricot, H. Dexpert, J. Dexpert-Ghys, H. Kong, G. Law and K. Wong, *Gadolinium-Europium Carbonate Particles: Controlled Precipitation for Luminescent Biolabeling*, **Chem. Mater**, 2010, 22, 6153–6161.
- [63] G. K. Das, Y. Zhang, L. D'Silva, P. Padmanabhan, B. C. Heng, J. S. C. Loo, S. T. Selvan, K. K. Bhakoo, T. T. Y. Tan, *Single-Phase $Dy_2O_3:Tb^{3+}$ Nanocrystals as Dual-Modal Contrast Agent for High Field Magnetic Resonance and Optical Imaging*, **Chem. Mater**, 2011, 23, 2439–2446.
- [64] Y. Tian, W. Cao, X. Luo, Y. Fu, *Preparation and luminescence property of $Gd_2O_2S:Tb$ X-ray nano-phosphors using the complex precipitation method*, **Journal of Alloys and Compounds**, 2007, 433, 313–317.
- [65] M. M. Xing, W. Cao, T. Pang, X. Q. Ling, N. Chen, *Preparation and characterization of monodisperse spherical particles of X-ray nano-phosphors based on $Gd_2O_2S:Tb$* , **Chinese Sci Bull**, 2009, 54, 2982—2986.
- [66] M. M. Xing, W. Cao, T. Pang, X. Ling, *Synthesis of monodisperse spherical $Y_2O_2S:Yb, Ho$ upconversion nanoparticles*, **Solid State Communications**, 2009, 149, 911-914.
- [67] E. Abliz, J. E. Collins, H. Bell, D. B. Tata, *Novel applications of diagnostic X-rays in activating a clinical photodynamic drug: Photofrin II through X-ray induced visible luminescence from "rare-earth" formulated particles*, **Journal of X-Rays Science and Technology**, 2011, 19, 4, 521-530.
- [68] W. Stöber, A. Fink, E. J. Bohn, *Controlled growth of monodisperse silica spheres in the micron size range*, **Coll. Interf. Sci**, 1968, 26, 62–69.
- [69] S. G. Zhu, J. J. Xiang, X. L. Li, S. R. Shen, H. . Lu, J. Zhou, W. Xiong, B. C. Zhang, X. M. Nie, M. Zhou, K. Tang, G. Y. Li, *Poly(L-lysine)-modified silica nanoparticles for the delivery of antisense oligonucleotides*, **Biotechnol. Appl. Biochem**, 2004, 39, 179.
- [70] I. Roy, T. Y. Ohulchanskyy, D. J. Bharali, H.E. Pudavar, R. A. Mistretta, N. Kaur, P. N. Prasad, *Optical tracking of organically modified silica nanoparticles as DNA carriers: a nonviral, nanomedicine approach for gene delivery*, **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A**, 2005, 102, 279.

- [71] C. R. Thomas, D. P. Ferris, J. Lee, E. Choi, M. Cho, E. S. Kim, J. F. Stoddart, J. Shin, J. Cheon, J. I. Zink, *Noninvasive Remote-Controlled Release of Drug Molecules in Vitro Using Magnetic Actuation of Mechanized Nanoparticles*, **J. Am. Chem. Soc.**, 2010, 132 (31), 10623–10625.
- [72] M. Cianfrocca, V. Kaklamani, S. Rosen, J. von Roenn, A. Rademaker, S. Rubin, R. Friedman, R. Uthe, W. Gradishar, *A Phase I Trial of a Pegylated Liposomal Anthracycline (DoxilTM) and Lapatinib Combination in the Treatment of Metastatic Breast Cancer: Dose-Escalation Results of an Anthracycline and Lapatinib Combination Trial*, **Cancer Res**, 2009, 69, 24, 3.
- [73] H. Tada, H. Higuchi, T. M. Wanatabe, N. Ohuchi, *In vivo real-time tracking of single quantum dots conjugated with monoclonal anti-HER2 antibody in tumors of mice*, **Cancer Research**, 2007, 67(3), 1138-1144.
- [74] W. B. Cai, D. W. Shin, K. Chen, O. Gheysens, Q. Cao, S. X. Wang, S. S. Gambhir, X. Chen, *Peptide-labeled near-infrared quantum dots for imaging tumor vasculature in living subjects*, **Nano Letters**, 2006, 6(4), 669-676.
- [75] Z. P. Zhang, S.H. Lee, S. S. Feng, *Folate-decorated poly(lactide-co-glycolide)-vitamin E TPGS nanoparticles for targeted drug delivery*, **Biomaterials**, 2007, 28(10), 1889-1899.
- [76] K. M. McNeeley, A. Annapragada, R.V. Bellamkonda, *Decreased circulation time offsets increased efficacy of PEGylated nanocarriers targeting folate receptors of glioma*, **Nanotechnology**, 2007, 18(38).
- [77] M. Ferrari, *Cancer nanotechnology: opportunities and challenges*. **Nature Reviews Cancer**, 2005, 5, 161–71.
- [78] Y. Matsumura, M. Kimura, T. Yamamoto, H. Maeda, *Involvement of the kinin-generating cascade in enhanced vascular permeability in tumor tissue*, **Jpn J Cancer Res**, 1988, 79:1327- 34.
- [79] J. Wu, T. Akaike, H. Maeda, *Modulation of enhanced vascular permeability in tumors by a bradykinin antagonist, a cyclooxygenase inhibitor, and a nitric oxide scavenger*, **Cancer Res**, 1998, 58:159- 65.
- [80] L. Y. Li, C. A. Wartchow, S. N. Danthi, Z. Shen, N. Dechene, J. Pease, H. S. Choi, T. Doede, P. Chu, S. Ning, D.Y. Lee, M. D. Bednarski, S. J. Knox. *A novel antiangiogenesis therapy using an integrin antagonist or anti- FLK-1 antibody coated Y-90-labeled nanoparticles*, **International Journal of Radiation Oncology Biology Physics**, 2004, 58, 4, 1215-1227.
- [81] A. Ito, M. Shinkai, H. Honda, T. Kobayash, *Medical application of functionalized magnetic nanoparticles*, **Journal of Bioscience and Bioengineering**, 2005, 100, 1, 1-11.
- [82] P. Wust, U. Gneveckow, M. Johannsen, D. Böhmer, T. Henkel, F. Kahmann, J. Sehouli, R. Felix, J. Rieke, A. Jordan, *Magnetic nanoparticles for interstitial thermotherapy - feasibility, tolerance and achieved temperatures*, **International Journal of Hyperthermia**, 2006, 22, 8, 673-685.

- [83] R. Kopelman, Y. Leekoo, M. Philbert, B. Moffat, G. Ramachandrareddy, P. Mcconville, D. Hall, T. Chenevert, M. Bhojani, S. Buck, *Multifunctional nanoparticle platforms for in vivo MRI enhancement and photodynamic therapy of a rat brain cancer*. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, 2005, 293(1), 404-410.
- [84] M. Elke, *The centenary of W. C. Roentgen's discovery: a look at developments in science, clinical radiologic practice and environmental problems*, **Cell Mol Life Sci**, 1995, 51:637–639.
- [85] J. A. Seibert, J. M. Boone, *X-ray imaging physics for nuclear medicine technologists. Part 2: X-ray interactions and image formation*, **J Nucl Med Technol**, 2005, 33:3–18.
- [86] P. Debbage, W. Jaschke, *Molecular imaging with nanoparticles: giant roles for dwarf Actors*, **Histochem Cell Biol**, 2008, 130:845–875.
- [87] J. R. Lindner, *Evolving applications for contrast ultrasound*, **Am J. Cardiol**, 2002, 90:72–80.
- [88] G. M. Lanza, S. A. Wickline, *Targeted ultrasonic contrast agents for molecular imaging and therapy*. **Progress in Cardiovascular Diseases**, 2001. 44(1) 13-31.
- [89] E. C. Unger, T. Porter, W. Culp, R. Labell, T. Matsunaga, R. Zutshi, *Therapeutic applications of lipid-coated microbubbles*, **Advanced Drug Delivery Reviews**, 2004. 56(9) 1291-1314.
- [90] R. Weissleder, *Scaling down imaging: molecular mapping of cancer in mice*, **Nat. Rev. Cancer** 2, 2002, 11–18.
- [91] H. B. Na, I. C. Song, T. Hyeon, *Inorganic Nanoparticles for MRI Contrast Agents*, **Adv. Mater**, 2009, 21, 2133–2148.
- [92] P. Caravan, J. J. Ellison, T. J. McMurry, R. B. Lauffer, *Gadolinium(III) chelates as MRI contrast agents: structure, dynamics, and applications*, **Chem. Rev**, 99, 1999, 2293–2352.
- [93] A. Datta, K. N. Raymond, *Gd-hydroxypyridinone (HOPO)-based high-relaxivity magnetic resonance imaging (MRI) contrast agents*, **Acc. Chem. Res**, 42, 2009, 938–947.
- [94] H. Ai, *Layer-by-layer capsules for magnetic resonance imaging and drug delivery*, **Advanced Drug Delivery Reviews**, 63, 2011, 772–788.
- [95] P. Caravan, *Strategies for increasing the sensitivity of gadolinium based MRI contrast agents*, **Chem. Soc. Rev**, 35, 2006, 512–523.
- [96] D. Kozłowska, P. Foran, P. MacMahon, M. J. Shelly, S. Eustace, R. O'Kennedy, *Molecular and magnetic resonance imaging: the value of immunoliposomes*, **Adv. Drug Deliv. Rev**, 2009, 61, 1402–1411.
- [97] K. Glunde, A. P. Pathak, Z. M. Bhujwalla, *Molecular-functional imaging of cancer: to image and imagine*, **Trends Mol. Med**, 2007,13, 287–297.
- [98] M. Rudin, R. Weissleder, *Molecular imaging in drug discovery and development*, **Nat. Rev. Drug Discov**, 2003, 2, 123–131.

- [99] N. Nasongkla, E. Bey, J. Ren, H. Ai, C. Khemtong, J. S. Guthi, S. F. Chin, A. D. Sherry, D. A. Boothman, J. Gao, *Multifunctional polymeric micelles as cancer-targeted, MRI-ultrasensitive drug delivery systems*, **Nano Lett**, 2006, 6, 2427–2430.
- [100] A. Chacko, E. D. Hood, B. J. Zern, V. R. Muzykantov, *Targeted nanocarriers for imaging and therapy of vascular inflammation*, **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, 2011, 16, 215–227.
- [101] A. Louie, *Multimodality imaging probes: design and challenges*, **Chem Rev**, 2010, 110, 3146–95.
- [102] R. Weissleder, V. Ntziachristos, *Shedding light onto live molecular targets*, **Nat Med**, 2003, 9:123–8.
- [103] A. J. Hueber, R. Stevenson, R. J. Stokes, D. Graham, P. Garside, I. B. McInnes, *Imaging inflammation in real time—future of nanoparticles*, **Autoimmunity**, 2009, 42:368–72.
- [104] S. Gioux, H. S. Choi, J. V. Frangioni, *Image-guided surgery using invisible near-infrared light: fundamentals of clinical translation*, **Mol Imaging**, 2010, 9:237–55.
- [105] M. S. Judenhofer, H. F. Wehrl, D. F. Newport, C. Catana, S. B. Siegel, M. Becker, A. Thielscher, M. Kneilling, M. P. Lichy, M. Eichner, K. Klingel, G. Reischl, S. Widmaier, M. Röcken, R. E. Nutt, H. J. Machulla, K. Uludag, S. R. Cherry, C. D. Claussen, B. J. Pichler, *Simultaneous PET-MRI: a new approach for functional and morphological imaging*, **Nat Med**, 2008, 14:459–65.
- [106] B. R. Jarrett, B. Gustafsson, D. L. Kukis, A. Y. Louie, *Synthesis of ^{64}Cu -labeled magnetic nanoparticles for multimodal imaging*, **Bioconjug Chem**, 2008;19:1496–504.
- [107] M. Oostendorp, K. Douma, A. Wagenaar, J. M. Slenter, T. M. Hackeng, M. A. Van Zandvoort, et al. *Molecular magnetic resonance imaging of myocardial angiogenesis after acute myocardial infarction*, **Circulation**, 2010;121:775–83.
- [108] M. Nahrendorf, H. Zhang, S. Hembrador, P. Panizzi, D. E. Sosnovik, E. Aikawa, et al. *Nanoparticle PET-CT imaging of macrophages in inflammatory atherosclerosis*, **Circulation**, 2008, 117:379–87.
- [109] S. Viswanathan, Z. Kovacs, K. N. Green, S. J. Ratnakar, A. D. Sherry, *Alternatives to Gadolinium- Based Metal Chelates for Magnetic Resonance Imaging*, **Chem. Rev**, 2010, 110, 2960.
- [110] I. Bertini, F. Capozzi, C. Luchinat, G. Nicastro, Z. Xia, *Nuclear and electron relaxation of $\text{Fe}(\text{OH}_2)_6^{3+}$* , **J. Phys. Chem**, 1993, 97, 635.
- [111] J. P. Joliver, M. Henry, J. Livabe, *De la solution à l'oxyde*, **Savoirs actuels InterEditions/CNRS**, 1994.

- [112] I. Djerdj, G. Garnweitner, D. S. Su, M. Niederberger, *Morphology-controlled nonaqueous synthesis of anisotropic lanthanum hydroxide nanoparticles*, **Journal of Solid State Chemistry**, 2007, 180 :2154–2165.
- [113] T. Kim Anh, L. Quoc Minh, N. Vu, T. Thu Huong, N. Thanh Huong, C. Barthou, W. Streck, *Nanomaterials containing rare-earth ions Tb, Eu, Er and Yb : preparation, optical properties and application potential*, **Journal of Luminescence**, 2003,102-103 :391–394.
- [114] T. Hirai, T. Orikoshi, *Preparation of $Gd_2O_3 :Yb,Er$ and $Gd_2O_2S :Yb,Er$ infrared-to-visible conversion phosphor ultrafine particles using an emulsion liquid membrane system*, **Journal of Colloid and Interface Science**, 2004, 269 :103–108.
- [115] R. Bazzi, M.A. Flores, C. Louis, K. Lebbou, W. Zhang, C. Dujardin, S. Roux, B. Mercier, G. Ledoux, E. Bernstein, P. Perriat, O. Tillement, *Synthesis and properties of europium-based phosphors on the nanometer scale Eu_2O_3 , $Gd_2O_3 :Eu^{3+}$, and $Y_2O_3 :Eu^{3+}$* , *Journal of Colloid and Interface Science*, 2004, 273 :191–197.
- [116] N. Joffin, B. Caillier, J. Dexpert-Ghys, M. Verelst, G. Baret, A. Garcia, P. Guillot, J. Galy, R. Mauricot, S. Schamm, *Elaboration by spray pyrolysis and characterization in the vuv range of phosphor particles with spherical shape and micronic size*, **J. Phys. D : Appl. Phys**, 2005, 38 :3261–3268.
- [117] S. Chandra, F. L. Deepak, J. B. Gruber, D. K. Sardar. *Synthesis, morphology, and optical characterization of nanocrystalline $Er^{3+}:Y_2O_3$* , **J. Phys. Chem. C**, 2010, 114 :874–880.
- [118] K. L. Wong, G. L. Law, M. B. Murphy, P. A. Tanner, W. T. Wong, P. K. S. Lam, M. H. W. Lam, *Functionalized europium nanorods for in vitro imaging*, **Inorganic Chemistry**, 2008, 47, 12.
- [119] Y. Mao, J. Y. Huang, R. Ostroumov, K. L. Wang, J. P. Chang, *Synthesis and luminescence properties of erbium-doped Y_2O_3 nanotubes*, **J. Phys. Chem. C**, 2008, 112 :2278–2285.
- [120] K. Nakamoto, *The Infrared and Raman Spectra of Inorganic and Coordination Compounds*, **5th ed.**, **John Wiley & Sons**, 1997, 84-87.
- [121] H. S. Yoo, H. S. Jang, W. B. Im, J. H. Kang and D. Y. Jeon, *Particle size control of a monodisperse spherical $Y_2O_3:Eu^{3+}$ phosphor and its photoluminescence properties*, **J. Mater. Res**, 2007, 22, 2017–2024.
- [122] R. D. L. Gaspar, I. O. Mazali and F. A. Sigoli, *Particle size tailoring and luminescence of europium(III)-doped gadolinium oxide obtained by the modified homogeneous precipitation method: Dielectric constant and counter anion effects*, **Colloids Surf. A**, 2010, 367, 155–160.
- [123] G. Akerlof, *Dielectric constants of some organic solvent-water mixtures at various temperatures*, **J. Am. Chem. Soc.**, 1932, 54, 4125–4139.

- [124] Q. Guodong, W. Minguana, W. Mang, F. Xianping, H. Zhanglian, *Structural evolution and fluorescence properties of Tb³⁺-doped silica xerogels in the gel to glass conversion*, **J. Lum.**, 1997, 75, 63-69.
- [125] M. Buijs, A. Meyerink, and G. Blasse, *Energy transfer between Eu³⁺ ions in lattice with two different crystallographic sites : Y₂O₃ :Eu³⁺, Gd₂O₃ :Eu³⁺ and Lu₂O₃*, **J. Lumin.**, 34 :9–20, 1985.
- [126] F. Auzel, *Upconversion processes in coupled ion systems*, **J. Lumin.**, 1990, 45, 341–345.
- [127] J. Mobley, T. Vo-Dinh, *Optical properties of tissues*, **Biomedical Photonics Handbook**, T. Vo-Dinh, Editor. 2003, CRC Press. p. Chapter 2.
- [128] J. Shan, J. Chen, J. Meng, J. Collins, W. Soboyejo, J. S. Friedberg, Y. Ju, *Biofunctionalization, cytotoxicity, and cell uptake of lanthanide doped hydrophobically ligated NaYF₄ upconversion nanophosphors*, **J. Appl. Phys.**, 2008, 104, 094308.
- [129] M. Pollnau, D. R. Gamelin, S. R. Lüthi, H. U. Güdel, *Power dependence of upconversion luminescence in lanthanide and transition-metal-ion systems*, **Phys. Rev. B**, 2000, 61, 3337.
- [130] D. R. Gamelin, H. U. Güdel, *Upconversion Processes in Transition Metal and Rare Earth Metal Systems*, **Topics in Current Chemistry**, 2001, 214, 1-56.
- [131] V. Buissette, A. Huignard, T. Gacoin, et al., *Luminescence properties of YVO₄:Ln (Ln=Nd, Yb, and Yb-Er) nanoparticles*, **Surf. Sci.**, 2003, 532-535, 444.
- [132] K. W. Kramer, D. Biner, G. Frei, H. U. Güdel, M. P. Hehlen, S. R. Lüthi, *Hexagonal Sodium Yttrium Fluoride Based Green and Blue Emitting Upconversion Phosphors*, **Chem. Mater.**, 2004, 16, 1244-1251.
- [133] H. R. Page, K. I. Schaffers, P. A. Waide, J. B. Tassano, S. A. Payne, W. F. Krupke, *Upconversion-pumped luminescence efficiency of rare-earth-doped hosts sensitized with trivalent ytterbium*, **J. Appl. Phys.**, 1972, 43, 595–600.
- [134] J. F. Suyver, A. Aebischer, D. Biner, P. Gerner, J. Grimm, S. Heer, K.W. Kramer, C. Reinhard, H.U. Güdel, *Novel materials doped with trivalent lanthanides and transition metal ions showing near-infrared to visible photon upconversion*, **Optical Materials**, 2005, 27, 1111–1130.
- [135] B. Morosin, *Structural Crystallography and Crystal Chemistry*, **Acta Cryst**, 1973, B29, 2647-2648.
- [136] S. Lechevallier, *Synthèse et caractérisation de nanoparticules luminescentes à base de lanthanides : vers de nouveaux bio-marqueurs*, **Thèse de doctorat de l'université de Toulouse**, 2010, 79.
- [137] Y. M. Golovin, K. I. Petrov and A. A. Grizik, *Long-wave IR spectra for rare earth metal oxysulfides*, **J. Appl. Spectrosc.**, 1973, 18(1), 84–86.
- [138] M. Verelst, J. Dexpert-Ghys, L. Marchin, R. Mauricot, S. A. Osseni, S. Lechevallier, *Nanoparticules luminescentes utilisables en tant que marqueurs et procédé pour leur préparation*,

- BREVET FRANÇAIS**, (N° et date dépôt : FR1057296 /14-09-2010; N° et date de publication : FR2964665/ 16-03-2012 ; extension PCT en cours).
- [139] S. A. Osseni, S. Lechevallier, M. Verelst, C. Dujardin, J. Dexpert-Ghys, D. Neumeyer, M. Leclercq, H. Baaziz, D. Cussac, V. Santran, R. Mauricot, *New Nanoplatform based on Gd₂O₂S:Eu³⁺ core: synthesis, characterization and use for in-vitro bio-labelling*, **J. Mater. Chem.**, 2011, 21, 18365.
- [140] J. Bang, M. Abboudi, B. Abrams and P. H. Holloway, *Combustion synthesis of Eu-, Tb- and Tm-doped Ln₂O₂S (Ln=Y, La, Gd) phosphors*, **J. Lumin.**, 2004, 106, 177–185.
- [141] Q. Dai, H. Song, M. Wang, X. Bai, B. Dong, R. Qin, X. Qu and H. Zhang, *Size and Concentration Effects on the Photoluminescence of La₂O₂S:Eu³⁺ Nanocrystals*, **J. Phys. Chem. C**, 2008, 112, 19399–19404.
- [142] L. Ozawa, *Determination of Self-Concentration Quenching Measurements on Powdered Phosphor Screens Mechanisms of Rare Earth Luminescence from Intensity*, **J. Electrochem. Soc.**, 1979, 126, 1, 106-109.
- [143] J. P. Gelamos, M. L. Laranja, K. C. L. Alvino, S. A. Camacho, A. M. Pires, *Up converter nanophosphor Y₂O₂S:Er,Yb aminofunctionalized containing or not spherical silica conjugated with BSA*, **Journal of Luminescence**, 129, 2009, 1726–1730.
- [144] M. Wang, C. C. Mi, W. X. Wang, C. H. Liu, Y. F. Wu, Z. R. Xu, C. B. Mao, S. K. Xu, *Fluorescent Imaging of HeLa Cells by Using NaYF₄:Yb,Er Upconversion Nanoparticles*, **ACS Nano**, 2009, 3, 6, 1580- 1586.
- [145] H. Lu, G. Yi, S. Zhao, D. Chen, L. Guo, J. Cheng, *Synthesis and characterization of multifunctional nanoparticles possessing magnetic, up-conversion fluorescence and bio-affinity properties*, **J. Mater. Chem.**, 2004, 14, 1336 – 1341.
- [146] I. Gorelikov, N. Matsuura, *Single-Step Coating of Mesoporous Silica on Cetyltrimethyl Ammonium Bromide-Capped Nanoparticles*, **Nano Lett.**, 2008, 8, 1, 369-373.
- [147] H. S. Qian, H. C. Guo, P. C. Ho, R. Mahendran, Y. Zhang, *Mesoporous-Silica-Coated Up-Conversion Fluorescent Nanoparticles for Photodynamic Therapy*, **Small**, 2009, 5, 20, 2285–2290.
- [148] J. Kim, H. S. Kim, N. Lee, T. Kim, H. Kim, T. Yu, I. C. Song, W. K. Moon, T. Hyeon, *Multifunctional Uniform Nanoparticles Composed of a Magnetite Nanocrystal Core and a Mesoporous Silica Shell for Magnetic Resonance and Fluorescence Imaging and for Drug Delivery*, **Angew. Chem. Int. Ed.**, 2008, 47, 8438 –8441.
- [149] D. Ma, T. Veres, L. Clime, F. Normandin, J. Guan, D. Kingston, B. Simard, *Superparamagnetic Fe₃O₄@SiO₂ core-shell nanostructures: controlled synthesis and magnetic characterization*, **J. Phys. Chem. B**, 2007, 111, 1999–2007.

- [150] M. Nichkova, D. Dosev, S. J. Gee, B. D. Hammock, I. M. Kennedy, *Microarray Immunoassay for Phenoxybenzoic Acid Using Polymer Encapsulated Eu:Gd₂O₃ Nanoparticles as Fluorescent Labels*, **Anal. Chem.**, 2005, 77, 6864-6873.
- [151] S. Lechevallier, P. Hammer, J. M. A. Caiut, S. Mazeres, R. Mauricot, M. Verelst, H. Dexpert, S. J. L. Ribeiro, J. Dexpert-Ghys, *APTES-Modified RE₂O₃:Eu³⁺ Luminescent Beads: Structure and Properties*, **Langmuir** 2012, 28, 3962–3971.
- [152] T. Mosmann, *Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays*, *J. Immunol. Methods*, 1983, 65, 55–63.
- [153] E. Bayer, H. Ben-Hur, G. Gitlin, M. Wilchek, *An improved method for the single step purification of streptavidin*, **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, 1986, 13, 103–112.
- [154] I. Vikholm, W. M. Albers, *Oriented Immobilization of Antibodies for Immunosensing*, **Langmuir**, 1998, 14, 3865-3872.
- [155] J. J. Ortega-Vinuesa, D. Bastos-Gonzales, *A review of factors affecting the performances of latex agglutination tests*, **Journal of Biomaterials Science-Polymer** ,2001,12, 379-408.
- [156] G. T. Hermanson, *Bioconjugate techniques*, **Academic Press**, 1996, London.
- [157] P. Ashtari, X. He, K. Wang, P. Gong, *An efficient method for recovery of target ssDNA based on amino-modified silica-coated magnetic nanoparticles*, **Talanta**, 2005, 67, 548–554.
- [158] W. H. Scouten, P. Konecny, *Reversible immobilization of antibodies on magnetic beads*, **Anal Biochem**, 1992, 205:313– 318.
- [159] http://ec.europa.eu/food/food/coli_outbreak_germany_en.htm .
- [160] L. Clesceri, A. Greenberg, A. Eaton, *American Public Health Association, American Water Works Association and Water Environment Federation, Washington*, 1998, **20th edition**.
- [161] X. Xue, J. Pana, H. Xie, J. Wang, S. Zhang, *Bioconjugated quantum dots as fluorescent probes for bioanalytical applications*, **Talanta**, 2009, **77**,1808–1813.
- [162] Y. Cheng, Y. Liu, J. Huang, K. Li, W. Zhang, Y. Xian, L. Jin, *Combining biofunctional magnetic nanoparticles and ATP bioluminescence for rapid detection of Escherichia coli*, **Talanta**, 2009, **77**, 1332–1336.
- [163] G. P. Anderson, M. A. Jacoby, F. S. Ligler, K. D. King, *Effectiveness of protein A for antibody immobilization for a fiber optic biosensor*, **Biosensors and Bioelectronics**, 1997, 12, 4, 329–336.
- [164] N. Zinieris, C. Zikos, N. Ferderigos, *Improved solid-phase peptide synthesis of 'difficult peptides' by altering the microenvironment of the developing sequence*, **Tetrahedron Letters**, 2006, 47, 6861-6864.

- [165] G. Fields, R. L. Noble, *Solid phase peptide synthesis utilizing 9-fluorenylmethoxycarbonyl amino acids*, **Int. J. Peptide Protein Res**, 1990, 35, 161-214.
- [166] M. Wang, C.C. Mi, W. X. Wang, C. H. Liu, Y. F. Wu, Z. R. Xu, C. B. Mao, S. K. Xu, *Immunolabeling and NIR-excited fluorescent imaging of HeLa cells by using NaYF₄:Yb,Er upconversion nanoparticles*, **ACS Nano**, 2009, 3, 6, 1580- 1586.
- [167] M. Gude, J. Ryf, P. D. White, *An accurate method for the quantitation of Fmoc-derivatized solid phase Supports*, **Letters in Peptide Science**, 2002, 9, 203-206.
- [168] J. A. Peters, J. Huskens, D. J. Raber, *Lanthanide induced shifts and relaxation rate enhancements*, **Progr. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc**, 1996, 28, 283–350.
- [169] C.F.G.C. Geraldes, S. Laurent, *Classification and Basic Properties of Contrast Agents for Magnetic Resonance Imaging*, **Contrast Media Mol. Imaging**, 2009, 4, 1–23.
- [170] L. Helm, *Relaxivity in paramagnetic systems: Theory and mechanisms*, **Progr. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc**, 2006, 49, 45–64
- [171] N. Bloembergen, L. O. Morgan, *Proton Relaxation Times in Paramagnetic Solutions. Effects of Electron Spin Relaxation*, **J. Chem. Phys**, 1961, 34, 842-850.
- [172] N. Bloembergen, *Proton relaxation times in paramagnetic solutions*, **J. Chem. Phys**, 1957, 27, 572–573.
- [173] M. Gueron, *Nuclear relaxation in macromolecules by paramagnetic ions: novel mechanism*, **J. Magn. Reson**, 1975, 19, 58–66.
- [174] M. A. Fortin, R. M. Pectoral, Jr F. Soderlind, A. Klasson, M. Engstrom, T. Veres, P.O. Kall, K. Uvdal, *Polyethylene glycol-covered ultra-small Gd₂O₃ nanoparticles for positive contrast at 1.5 T magnetic resonance clinical scanning*, **Nanotechnology**, 2007, 18, 395501.
- [175] S. Laurent, D. Forge, M. Port, A. Roch, C. Robic, L. V. Elst, R.N. Muller, *Magnetic iron oxide nanoparticles: Synthesis, stabilization, vectorization, physicochemical characterizations, and biological applications*, **Chemical Reviews**, 2008, 108 (6), 2064-2110.
- [176] M. Norek, G. A. Pereira, C. F. G. C. Geraldes, A. Denkova, W. Zhou, J. A. Peters, *NMR Transversal Relaxivity of Suspensions of Lanthanide Oxide Nanoparticles*, **J. Phys. Chem. C**, 2007, 111, 10240-10246.
- [177] M. Norek, J. A. Peters, *MRI contrast agents based on dysprosium or holmium*, **Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc**, 2011, 59, 64-82.
- [178] M. Norek, E. Kampert, U. Zeitler, J. A. Peters, *Tuning of the size of Dy₂O₃ nanoparticles for optimal performance as an MRI contrast agent*, **J. Am. Chem. Soc**, 2008, 130, 5335-5340
- [179] F. Mayer, J.A. Peters, K. Djanashvili, **Chem. Eur. J**, 2012, DOI: 10.1002/chem.201200472
- [180] A. Roch, Y. Gossuin, R. N. Muller, P. Gillis, *Superparamagnetic colloid suspensions: water magnetic relaxation and clustering*, **J. Magn. Magn. Mater**, 2005, 293, 532-539.

- [181] Q. L. Vuong, P. Gillis, Y. Gossuin, *Monte Carlo simulation and theory of proton NMR transverse relaxation induced by aggregation of magnetic particles used as MRI contrast agents*, **J. Magn. Reson**, 2011, 212, 139-148.
- [182] M. M. J. Modo, J. W. M. Bulte, E. E. Kim, *Molecular and cellular MR imaging*, **Journal of Nuclear Medicine**, 2007,48, 2087.
- [183] A. Klasson, M. Ahren, E. Hellqvist, F. Soderlind, A. Rosend, P. Kall, K. Uvdal, M. Engstrom, *Positive MRI contrast enhancement in THP-1cells with Gd₂O₃ nanoparticles*, **Contrast Media Mol. Imaging**, 2008, 3 106–111.
- [184] N. J.J, B. Papanikolaou, A.L. Boyer, C. Kappas, E. E. Klein, T. R. Mackie, M. Sharpe, J. Vandick, *AAPM-85. Tissue inhomogeneity corrections for megavoltage photon Beams*, **Medical Physics**, 2004, 1-135.
- [185] E. Boote, G. Fent, V. Kattumuri, S. Casteel, K. Katti, N. Chanda, R. Kannan, K. Katti, R. Churchill, *Gold Nanoparticle Contrast in a Phantom and Juvenile Swine: Models for Molecular Imaging of Human Organs using X-ray Computed Tomography*, **Academic Radiology**, 2010, 17, 4, 410-417.
- [186] K. E. Kellar, S. L. Fossheim, S. H. Koenig, *Magnetic field dependence of solvent proton relaxation by solute dysprosium (III) complexes*, **Invest. Radiol**, 1998, 33, 835–840.
- [187] T. J. Swift, R. E. Connick, *NMR Relaxation of O₁₇*, **J. Chem. Phys**, 1962, 37, 307–320.
- [188] L. Vander Elst, A. Roch, P. Gillis, S. Laurent, F. Botteman, J. W. M. Bulte, R. N. Muller, *DTPA derivatives as relaxation agents for very high field MRI: The beneficial effect of slow water exchange on the transverse relaxivities*, **Magn. Reson. Med**, 2002, 47, 1121–1130.
- [189] S. Aime, M. Botta, M. Fasano, S. Paoletti, P.L. Anelli, F. Uggeri, M. Virtuani, *NMR Evidence of a Long Exchange Lifetime for the Coordinated Water in Ln(III)-Bis(methyl amide)-DTPA Complexes (Ln = Gd, Dy)*, **Inorg. Chem**, 1994, 33, 4707–4711.
- [190] J. H. Freed, *Dynamic effects of pair correlation functions on spin relaxation by translational diffusion in liquids. II. Finite jumps and independent T₁ processes*, **J. Chem. Phys**, 1978, 68, 4034–4037.

Abstract :

This thesis aims to present the concept of multimodal nanoplatfoms designed for medical imaging. Initially, a method of synthesis on different luminescent Ln₂O₂S (Ln = Gd, Dy and Ho) NPs, spherical and monodisperse in size was optimized. An experimental control of the synthesis parameters allows obtaining NPs with average diameter between 50 nm – 170 nm.

If Gd₂O₂S: Eu³⁺ and Gd₂O₃: Eu³⁺ NPs are strongly luminescent under UV excitation, Ln₂O₃: Eu³⁺ and Ln₂O₂S: Eu³⁺ (Ln = Dy and Ho) NPs showed low luminescence. Gd₂O₃: Er;Yb and Gd₂O₂S: Er, Yb NPs are both excitable by UV (400 and 380 nm) as well as by NIR (980nm), which makes them very versatile NPs, enabling their use *in vivo* and *in vitro* imaging.

Then, Gd₂O₂S: Eu³⁺ NPs surface has been modified by an amino-silica or by a mesoporous silica shell (thickness 10–15 nm). Gd₂O₂S: Eu³⁺ NPs can be easily internalized in living NIH3T3 mouse cells. It is not cytotoxic up to 1 mg/mL and can be easily imaged by epifluorescence microscopy with excitation in the NUV. When the IgG1 antibody is grafted onto Gd₂O₂S: Eu³⁺ NPs, a good bonding of IgG1-NPs to the *E. coli* bacterium surface was obtained. These observations indicated that the NPs recognized targets on the bacterium membrane through a combination with the IgG1 antibody.

Finally, relaxometric properties showed that the relaxivity gotten by NPs Dy₂O₂S (85 nm in radius) is bigger than the one measured from the commercial negative contrast agents, such as Ferumoxide (AMI-125) and ferumoxtran-10 (AMI-22). This transverse relaxivity increases linearly with the applied magnetic field. The magnetic resonance images confirm the possibility of using Gd₂O₂S: Eu³⁺ and Dy₂O₂S: Eu³⁺ NPs as negative contrast agents for magnetic resonance imaging. The Gd₂O₂S: Eu³⁺ NPs are detectable in X-ray tomography, therefore it is potentially useful as a contrast agent.

This thesis is a proof of multimodal nanoplatfoms concept for diagnosis.

Key words: Rare earth oxysulfide and oxide nanoparticles; luminescence; up-conversion; bio-labelling; multimodal imaging; Magnetic Resonance Imaging; x-ray tomography.

Résumé :

La problématique de ce projet de thèse était de concevoir des nanoplateformes multimodales pour l'imagerie médicale. Pour y répondre, nous avons dans un premier temps, optimisé un procédé de synthèse de différentes NPs luminescentes de Ln_2O_3 et $\text{Ln}_2\text{O}_2\text{S}$ ($\text{Ln} = \text{Gd}, \text{Dy}$ et Ho), sphériques et monodisperses en taille. Le contrôle des paramètres expérimentaux a permis de contrôler le diamètre moyen des NPs (50 nm - 170 nm). Si les NPs de $\text{Gd}_2\text{O}_2\text{S}:\text{Eu}^{3+}$ et $\text{Gd}_2\text{O}_3:\text{Eu}^{3+}$ sont fortement luminescentes sous excitation UV, les NPs de $\text{Ln}_2\text{O}_3:\text{Eu}^{3+}$ et $\text{Ln}_2\text{O}_2\text{S}:\text{Eu}^{3+}$ ($\text{Ln} = \text{Dy}$ et Ho) quant à elles ; ont révélé une faible luminescence sous excitation UV.

Les NPs de $\text{Gd}_2\text{O}_3:\text{Er}; \text{Yb}$ et $\text{Gd}_2\text{O}_2\text{S}:\text{Er}; \text{Yb}$ sont aussi bien excitables en UV (400 et 380 nm) que dans le NIR (980 nm). Ce qui fait d'elles **des NPs très versatiles** utilisables aussi bien pour l'imagerie *in vivo* qu'*in vitro*. L'émission visible en « upconversion » se fait selon un processus à 2 photons. Nos NPs de $\text{Gd}_2\text{O}_3:\text{Er}; \text{Yb}$ et $\text{Gd}_2\text{O}_2\text{S}:\text{Er}; \text{Yb}$ sont donc de bonnes candidates pour le marquage biologique.

Dans une 2^{ème} partie, nous avons enrobé des NPs de $\text{Gd}_2\text{O}_2\text{S}:\text{Eu}^{3+}$ d'une couche de silice aminée ou mésoporeuse d'épaisseur et de composition contrôlables. Des tests de cytotoxicité et d'imagerie cellulaire *in vitro* ont montré que les NPs de $\text{Gd}_2\text{O}_2\text{S}:\text{Eu}^{3+}$ sont, facilement internalisables par les cellules NIH3T3 ; non cytotoxiques jusqu'à une concentration de 1 mg/mL et sont fortement luminescentes en microscopie à fluorescence sous excitation à 365 nm. Ces NPs peuvent être considérées comme des marqueurs luminescents très efficaces après internalisation par endocytose. Le greffage de l'anticorps IgG1 effectué sur les NPs $\text{Gd}_2\text{O}_2\text{S}:\text{Eu}^{3+}$ a permis la détection des bactéries *E.coli*.

Enfin, dans une 3^{ème} partie, l'étude des propriétés relaxométriques a montré que la relaxivité obtenue pour des NPs de $\text{Dy}_2\text{O}_2\text{S}$ de 85 nm de rayon, est meilleure que celle mesurée pour les agents de contraste négatif commercialisés tels que le *Ferumoxide (AMI-125)* et le *Ferumoxtran-10 (AMI-22)*. Cette relaxivité transversale augmente linéairement avec le champ magnétique appliqué. Les images obtenues par résonance magnétique confirment la possibilité d'utilisation des NPs de $\text{Gd}_2\text{O}_2\text{S}:\text{Eu}^{3+}$ et $\text{Dy}_2\text{O}_2\text{S}:\text{Eu}^{3+}$ comme agents de contraste négatif pour l'imagerie par résonance magnétique.

Les NPs de $\text{Gd}_2\text{O}_2\text{S}:\text{Eu}^{3+}$ sont détectables en tomographie par rayons X et donc potentiellement utilisables comme agent de contraste.

Ce travail de thèse constitue une preuve du concept de nanoplateformes multimodales pour le diagnostic.

Mots clés: Nanoparticules d'oxyde et d'oxysulfure de terres rares; luminescence; up-conversion; bio-marquage; imagerie multimodale; Imagerie par résonance magnétique; tomographie par rayons X.