

Université
de Toulouse

THÈSE

En vue de l'obtention du
DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par :
Institut National Polytechnique de Toulouse (INP Toulouse)

Discipline ou spécialité :
Sciences et Génie des Matériaux

Présentée et soutenue par :
Ahmed AL-KATTAN

le : vendredi 5 novembre 2010

Titre :

Développement de nano-systèmes hybrides à base d'apatites biomimétiques
en vue d'applications biomédicales en cancérologie

JURY

Mme. S. BEGIN-COLIN Professeur, Université de Strasbourg, Présidente
Mme. J. DEXPERT-GHYS, Chargée de recherche CNRS, CEMES, Examinatrice
Mme. M.-C. DURRIEU, Chargée de recherche INSERM, U577, Examinatrice
Mr. C. MINGOTAUD, Directeur de recherche CNRS, IMRCP, Examinateur

Ecole doctorale :
Sciences de la Matière (SDM)

Unité de recherche :
Institut Carnot CIRIMAT

Directeur(s) de Thèse :
Mr. C. DROUET, Chargé de recherche CNRS, CIRIMAT
Mr. P. DUFOUR, Maître de conférences, Université de Toulouse

Rapporteurs :
Mr. J.-M. BOULER, Professeur, Université de Nantes
Mr. O. TILLEMENT, Professeur, Université de Lyon

*à mon père, à ma mère,
à mon frère Mohamed,
à mes trois sœurs Rasha, Rana et Dalya.*

« L'invention doit être partout, jusque dans les plus humbles recherches des faits, jusque dans l'expérience la plus simple. Là où il n'y a pas un effort personnel et même original, il n'y a même pas un commencement de science... »

Henri Bergson

Remerciements

Ce travail a été réalisé au sein de l'équipe *Phosphates-Pharmacotechnie-Biomatériaux* et en collaboration avec l'équipe Oxydes à Valences Mixtes, de l'Institut Carnot CIRIMAT (Centre Inter-universitaire de Recherche et d'Ingénierie des Matériaux) de Toulouse.

Je tiens tout particulièrement à remercier mes directeur et co-directeur de thèse pour m'avoir proposé ce sujet de recherche passionnant.

Merci à Monsieur Christophe Drouet, Chargé de Recherche CNRS au CIRIMAT, de m'avoir épaulé tout au long de ces trois années de thèse. Ce mémoire lui doit beaucoup. Soyez Christophe assuré de ma profonde reconnaissance. Ce fut un grand plaisir d'avoir été votre thésard.

Je tiens également à remercier chaleureusement Monsieur Pascal Dufour, Maître de conférences à l'Université Paul Sabatier de Toulouse, pour sa disponibilité et les enrichissements précieux dont il m'a fait bénéficier au cours de nombreuses discussions. Pascal, mille fois merci pour la confiance et l'aide que vous m'avez témoignées. Ce fut d'un enthousiasme constant d'avoir été votre doctorant.

Ce travail a fait l'objet de nombreuses collaborations. J'aimerais remercier en premier lieu Madame Jeannette Dexpert-Ghys Chargée de Recherche CNRS au CEMES, Toulouse, pour tout l'aide, aussi bien scientifique que technique, qu'elle a apportée sur la partie luminescence de ce mémoire. Merci Jeannette pour votre disponibilité et votre gentillesse. Vous m'avez ouvert, avec beaucoup d'implication et de générosité, les portes de CEMES.

J'adresse également mes remerciements à Monsieur Bernard Pipy, Directeur de Recherche à IINSERM à l'Université Paul Sabatier de Toulouse et Monsieur José Bernad, Maître de conférences à l'Université Paul Sabatier de Toulouse, du laboratoire des Macrophages, médiateurs de l'inflammation et interactions du métabolisme pour avoir contribué à l'étude de l'interaction nanoparticules colloïdales/ macrophages humains. Merci à tous les deux pour les nombreuses discussions enrichissantes.

Je tiens également à remercier Madame Véronique Santran de la société ICELLTIS pour avoir réalisé les tests de cytotoxicité, et avoir fait partager ses connaissances en biologie cellulaire, ainsi que pour avoir accepté de participer à ce jury de thèse en tant que membre invité. Un grand merci aussi à Julie Bordère pour son aide technique précieuse.

J'adresse également mes remerciements à Monsieur Serge Mazères du laboratoire IPBS pour les tests préliminaires de microscopie optique.

Mes remerciements vont également à Madame Sylvie Bégin-Colin, Professeur à l'Université de Strasbourg pour m'avoir fait l'honneur de présider ce jury de thèse.

Que Monsieur Jean-Michel Bouler, Professeur à l'Université de Nantes et Monsieur Olivier Tillement, Professeur à l'Université de Lyon 1, trouvent ici l'expression de ma gratitude pour l'intérêt qu'ils ont porté à ce travail en acceptant de participer au jury en tant que Rapporteurs.

J'adresse mes vifs remerciements à Madame Marie-Christine Durrieu, Chargée de Recherche INSERM à l'Université de Bordeaux 2 et Monsieur Christophe Mingotaud, Directeur de Recherche à l'IMRCP à l'Université Paul Sabatier de Toulouse pour avoir accepté d'être membre de ce jury.

Je suis sensible à l'honneur que m'a fait Monsieur Christian Rey, Professeur à l'ENSIACET pour avoir accepté de participer à ce jury en tant que membre invité et m'avoir rappelé qu'une soutenance de thèse n'est pas un « examen terrifiant » mais une occasion rare donnée à chaque futur docteur de faire connaître son travail. Merci Christian pour ce précieux encouragement.

Je teins également à remercier Madame Christèle Combes, Maître de conférences à l'ENSIACET et coordinatrice de l'équipe Phosphates-Pharmacotechnie-Biomatériaux, pour m'avoir si bien accueillie dans l'équipe et surtout pour m'avoir permis d'enseigner en qualité de vacataire. Christèle, mille fois merci pour la confiance et le soutien que tu m'as apportés.

A Monsieur Jean-Louis Lacout, Professeur à l'ENSIACET et Madame Michèle Frèche, Maître de conférences à l'ENSIACET, qui ont très bien connu mon père, qu'ils reçoivent ici l'expression de ma gratitude.

Assurément j'adresse toute ma sympathie et mon amitié à Monsieur David Grossin, Maître de conférences à l'ENSIACET qui a toujours répondu présent lorsque j'avais besoin de lui. Merci David de m'avoir tant soutenu pour les enseignements et tant apporté humainement. Ce fut pour moi une chance de t'avoir rencontré.

Que Madame Sophie Cazalbou, Maître de conférences à la Faculté de Pharmacie de Toulouse et Madame Stéphanie Sarda, Maître de conférences à l'IUT de Castres, reçoivent ici

l'expression de mon amitié pour le soutien qu'elles m'ont apporté, en particulier concernant les recherches d'enseignements ou d'encadrement de stagiaires.

Je remercie également toutes les personnes de la partie pharmacie de notre équipe : Anne-Marie, Sophie, Fabien, Audrey, Sandrine, Hélène, Caroline...

Un grand merci revient aussi à Oriana, Marion, Charlotte et Mahboob, qui ont contribué à l'avancement de ce travail au travers de leurs stages que j'ai eu le plaisir de co-encadrer.

Je remercie Gérard Déchambre, Françoise Bosc, Olivier Marsan et Cédric Charvillat pour tout l'aide technique qu'ils m'ont apportée tout au long de ce travail de thèse. Qu'ils trouvent ici l'expression de ma reconnaissance.

J'adresse également mes remerciements à Dominique Bonsirven pour sa gentillesse et sa grande disponibilité. Merci Domi.

J'aimerais aussi remercier tous ceux avec qui j'ai partagé ces trois années de thèse qui incontestablement seront inoubliables. J'adresse ma profonde amitié à Amal qui aura été ma « Best friend » pendant ces années de thèse. Tu as su me rendre la vie de thésard moins stressante. Merci Amal pour tout ça. Je te souhaite beaucoup, beaucoup de réussite dans la poursuite de ton projet professionnel.

Je remercie également Imane et Farid pour le soutien qu'ils m'ont apporté lors de la rédaction de ce mémoire. Je vous souhaite à tous les deux beaucoup de réussite dans la préparation de vos thèses. Trouvez dans ces quelques mots l'expression de ma profonde amitié.

Mes remerciements s'adressent aussi à Sabrina pour s'être déplacée de Limoges pour assister à ma soutenance. Merci pour ton soutien.

J'adresse mes sincères remerciements à notre « chef étoilé », j'ai nommé Patricia. Tu as su transformer la vie de labo en un voyage gastronomique à travers ta passion pour la cuisine. Merci pour tout le soutien que tu m'as apporté.

Je tiens également à remercier Nicolas et je lui souhaite beaucoup de réussite dans la préparation de sa thèse.

Je m'adresse maintenant à la petite dernière Sylvaine et je lui souhaite une très grande réussite dans la préparation de son doctorat.

Merci également aux doctorantes dentistes : Anne et Marie-Alix merci de votre soutien.

J'aimerais également remercier tous ceux avec qui j'ai fait un bout de chemin et qui sont partis : Jean-Philippe, Hélène, Ramona, Solène... Je remercie également les autres thésards du CIRIMAT et plus particulièrement Jaime.

Merci aussi à Séverine (CEMES) avec qui j'ai également pu interagir sur la partie luminescence de ce travail...

Je remercie mes parents pour m'avoir toujours soutenu dans cette étape importante de ma vie. Vous m'avez inculqué la patience, la persévérance et la culture de non renoncement. Tant de fois cela a été difficile, tant de fois vous étiez là à mes côtés. Un grand merci à tous les deux. Voici votre travail, voici votre réussite. J'adresse également à mon grand frère Mohamed ma reconnaissance ; il a toujours su me motiver et me rassurer dans les moments de doutes, avec beaucoup de sagesse et de tendresse que l'on connaît à tous les grands frères de monde. Merci à toi et je te souhaite beaucoup de joie dans ta vie. Je remercie également mes trois sœurs Rasha, Rana et Dalya pour le soutien qu'elles m'ont apporté tout au long de ce travail et la gentillesse dont elles ont fait preuve le jour de ma soutenance. Merci à toutes les trois. Je vous souhaite beaucoup de réussite dans votre vie professionnelle et dans votre vie privée.

Enfin je m'adresse à mes amis Liliane, Marcel, Mon instituteur Jean-michel Lonjou et sa famille. Un grand Merci à tous pour vos témoignages de soutien et d'encouragement. Trouvez ici l'expression de ma profonde gratitude.

Maintenant il ne me reste qu'à souhaiter à tout lecteur la bienvenue dans le merveilleux monde des (bio)nanotechnologies appliquées à la médecine, là où la chimie, la biologie et la physique sont intimement liées, et là où l'imaginaire rattrape peu à peu la réalité.

Très bonne lecture.

SOMMAIRE

Sommaire

Introduction générale	8
Chapitre 1 - Revue bibliographique	12
<i>I Généralités sur le cancer</i>	13
I-1 Bilan historique sur la lutte contre le cancer.....	13
I-2 Définition du cancer.....	16
I-3 Statistiques du cancer.....	17
I-4 Comment faire reculer le cancer ?.....	18
<i>II Les (nano)biotechnologies au service de la médecine</i>	20
II-1 Systèmes lipidiques.....	20
II-1-a les liposomes.....	20
II-1-b Les nanoparticules lipidiques.....	23
II-2 Les nanoparticules de polymères.....	24
II-3 Les nanoparticules d'oxydes : Fe_3O_4 / $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$, SiO_2 , YVO_4 et Gd_2O_3	24
II-4 Les quantum dots.....	26
II-5 Les nanoparticules d'or.....	27
II-6 Les nanotubes de carbone.....	28
<i>III Bilan de l'étude bibliographique</i>	29
Chapitre 2 - Elaboration et caractérisation de nanoparticules colloïdales d'apatite phosphocalcique, dopées à l'euprimum	34
Partie A : Rappel général sur les phosphates de calcium et sur les apatites phosphocalciques	36
<i>I Rappels sur les phosphates de calcium</i>	36
<i>II Rappels préliminaires sur les apatites phosphocalciques</i>	39
<i>III Rappels généraux sur les apatites</i>	40
III-1 Structure cristallographique des apatites.....	40
III-2 Substitutions ioniques dans le réseau.....	43
<i>IV Etude comparative entre l'HAP et les apatites nanocristallines phosphocalciques</i>	44
IV-1 L'hydroxyapatite.....	44
IV-2 Les apatites phosphocalciques nanocristallines.....	48

Partie B : Protocole de synthèse de suspensions colloïdales hybrides à base de nanoparticules d'apatites biomimétiques dopées à l'europlum Eu^{3+}	57
<i>I Synthèse et caractérisations d'une apatite phosphocalcique de référence</i>	57
I-1 Protocole de synthèse d'une apatite phosphocalcique de référence	57
I-2 Diffraction des rayons X sur apatite phosphocalcique de référence	58
I-3 Analyse par spectroscopie FTIR d'une apatite phosphocalcique de référence	61
I-4 Microscopie électronique en transmission (MET)	62
<i>II Synthèse et caractérisations d'une apatite phosphocalcique dopée à l'europlum Eu^{3+}</i>	63
II-1 Protocole de synthèse d'une apatite phosphocalcique dopée à l'europlum Eu^{3+}	63
II-2 Diffraction des rayons X sur une apatite phosphocalcique dopée à l'europlum Eu^{3+}	63
II-3 Spectre FTIR d'une apatite phosphocalcique dopée à l'europlum Eu^{3+}	66
II-4 Microscopie électronique en transmission	67
<i>III Synthèse et caractérisations d'une apatite phosphocalcique colloïdale non dopée</i>	69
III-1 Protocole de synthèse d'une apatite phosphocalcique colloïdale non dopée	69
III-2 Diffraction des rayons X d'une apatite colloïdale non dopée	70
III-3 Spectre FTIR d'une apatite colloïdale non dopée	72
III-4 Microscopie électronique en transmission	74
<i>IV Synthèse et caractérisation d'une apatite phosphocalcique colloïdale dopée à l'europlum Eu^{3+}</i>	75
IV-1 Protocole de synthèse d'une apatite phosphocalcique colloïdale dopée à l'europlum Eu^{3+}	75
IV-2 Diffraction des rayons X sur une apatite phosphocalcique colloïdale dopée à l'europlum Eu^{3+} (1,5% initial)	75
IV-3 Spectre FTIR d'une apatite phosphocalcique colloïdale dopée à l'europlum Eu^{3+} (1,5% initial)	76
<i>V Protocole de synthèse de suspensions colloïdales hybrides à base de nanoparticules d'apatites biomimétiques dopées à l'europlum Eu^{3+} et d'AEP</i>	83
Partie C : Caractérisation physico-chimique de suspensions colloïdales hybrides à base de nanoparticules d'apatite biomimétique dopée à l'europlum Eu^{3+}	86
<i>I Détermination de la limite de substitution des ions Ca^{2+} par les ions Eu^{3+}</i>	86
<i>II Etude de la composition chimique des suspensions colloïdales</i>	94
<i>III Etude des propriétés de luminescence de suspensions colloïdales d'apatite phosphocalcique dopée à l'europlum Eu^{3+}</i>	100
III-1 Rappels sur les propriétés de luminescence des terres rares	101
III-1-a Définition de la luminescence	101
III-1-b Rappels sur les terres rares	102
III-1-c Diagramme d'énergie de l'ion Ln^{3+} libre (illustré avec Eu^{3+})	104

III-1-d Diagramme d'énergie de l'ion Ln^{3+} incorporé dans un solide (illustré avec Eu^{3+})	106
III-1-e Transition entre niveaux	107
a Transition radiative	107
b Transitions non radiatives	108
III-1-f Diagramme d'énergie des ions lanthanides	108
<i>IV Spectres d'excitation de suspensions colloïdales d'apatite dopée à l'euporium Eu^{3+}</i>	110
<i>V Spectres d'émission de suspensions colloïdales d'apatite dopée à l'euporium Eu^{3+}</i>	111
<i>VI Déclin de luminescence, mesure de la durée de vie de luminescence</i>	114
<i>VII Discussion sur l'efficacité de luminescence</i>	119
Partie D : Approfondissement de l'étude de l'interaction entre apatite et AEP	121
<i>I Etude de l'effet de la concentration en AEP</i>	121
<i>II Etude du processus d'adsorption de l'AEP sur une apatite nanocristalline</i>	132
Partie E : Synthèse de nanoparticules colloïdales d'apatite en présence d'un agent de ciblage de cellules cancéreuses : l'acide folique	136
<i>I Introduction</i>	136
<i>II Mise au point du protocole de synthèse de nanoparticules colloïdales d'apatite en présence d'un agent de ciblage de cellules cancéreuses : l'acide folique</i>	139
<i>III Caractérisation de nanoparticules colloïdales synthétisées en présence de FA</i>	141
III-1 Caractérisation par diffraction de rayons X et spectroscopie FTIR	141
III-2 Caractérisation par microscopie électronique en transmission, diffusion dynamique de la lumière et potentiel Zêta	144
III-3 Caractérisation par spectrofluorimétrie	145
<i>IV Etude du processus d'adsorption de l'acide folique (FA) sur une apatite nanocristalline</i>	148
Partie F : Discussion sur la nature physico-chimique des nanoparticules colloïdales préparées	150

Chapitre 3 – Considérations pratiques vers une application biomédicale et tests biologiques préliminaires	154
Partie A : Rappel bibliographique sur les principales barrières biologiques	156
<i>I Barrière épithéliale</i>	156
<i>II Endothélium et éléments du sang</i>	157
II-1 Endothélium	157
II-2 Eléments du sang	159
II-3 Interaction nanoparticule-protéine	160
II-4 Comment « éviter » l'interaction protéine-nanoparticule ?	165
<i>III Membrane plasmique</i>	166
III-1 Rappels sur la membrane plasmique	166
III-2 Transport passif et transport cytotique	170
III-2-a) Transport passif	170
III-2-b) Transport cytotique	170
Partie B : Etude du processus de purification des colloïdes par dialyse	175
Partie C : Ajustement du pH des suspensions colloïdales au pH physiologique	187
<i>I Introduction</i>	187
<i>II Protocole d'ajustement du pH des suspensions colloïdales au pH physiologique</i>	187
<i>III Caractérisation physico-chimique de Sc_{1,5}(2)Eu traité avec HMP</i>	188
Partie D : Etude d'une possible remise en suspension après lyophilisation des colloïdes	193
Partie E : Etude de la dissolution de nanoparticules colloïdales à pH acide (pH 5)	195
Partie F : Etude de la cytotoxicité des nanoparticules colloïdales par test MTT	198
<i>I Protocole d'incubation des suspensions colloïdales dans le milieu de culture</i>	199
<i>II Résultats expérimentaux</i>	199

Partie G : Etude de l'interaction entre nanoparticules colloïdales et macrophages humains	204
Partie H : Etude de l'internalisation des nanoparticules colloïdales luminescentes par des cellules cancéreuses	208
Partie I : Etude préliminaire par microscopie optique couplée à un spectrofluorimètre	211
Conclusion generale	214
Références bibliographiques	217
Annexes	232

INTRODUCTION GENERALE

Aujourd'hui, le Centre International de Recherche sur le Cancer (CIRC) estime à 25 millions le nombre de personnes atteintes d'un cancer dans le monde. En France, depuis 2004, le cancer constitue la première cause de mortalité prématurée, loin devant les maladies cardiovasculaires. Il touche un homme sur deux et une femme sur trois.

Les autorités publiques s'accordent à dire que pour faire reculer le cancer il faut œuvrer autour de trois axes : **la prévention** du grand public concernant les causes sociétales (alcoolisme, tabagisme...) qui favorisent le développement de la maladie, **le traitement** de celle-ci qui passe par un meilleur ciblage des cellules tumorales afin d'éviter la dégradation de tissus sains, et enfin le **diagnostic** pour détecter de manière précoce et précise la maladie afin de proposer au patient le traitement adéquat.

La nécessité d'améliorer les méthodes de traitement et de diagnostic de cancers implique notamment l'élaboration et l'évaluation de nano-systèmes de transport (ou vecteurs) dit « intelligents » capables de déjouer les barrières biologiques du corps humain (épithélium/endothélium, éléments du sang, membrane cellulaire...) afin d'y acheminer un principe actif (dans un objectif thérapeutique) et/ou une sonde (fluorescente, radioactive, magnétique, etc., dans le cas de diagnostics) ; et ce éventuellement de manière ciblée vers les cellules malades, sans altérer les tissus sains.

Le milieu biologique impose par ailleurs, en particulier dans le cas d'une administration envisagée par voie systémique (intraveineuse), diverses contraintes pour le développement de systèmes destinés à une application biomédicale mettant en jeu une interaction directe avec des cellules, et ce que ce soit dans une approche de diagnostic ou de thérapeutique :

- être composé de matériaux biocompatibles et biodégradables, et menant si possible à des métabolites aisément éliminés par le corps hôte,
- être de taille nanométrique (généralement inférieure à 100 nm) pour augmenter le temps de séjour dans la circulation sanguine et aider au passage des barrières biologiques,
- si possible permettre une association avec un agent thérapeutique (principe actif) ou une sonde (éléments luminescents, agents de contraste, éléments radioactifs), voire un agent de ciblage cellulaire.

C'est dans cette optique que ce travail de thèse s'est inscrit : nous nous sommes ici intéressés à *l'élaboration et à la caractérisation physico-chimique de nano-systèmes hybrides à base d'apatites phosphocalciques biomimétiques (proches du minéral osseux), en vue d'applications dans le domaine du diagnostic de cancers, voire de thérapeutique, et faisant principalement appel à une administration systémique.* En fin de thèse, des *premières évaluations biologiques in vitro* ont par ailleurs été entreprises afin d'apprécier, de façon préliminaire, le potentiel de ces nano-systèmes dans le domaine de l'oncologie.

Cette étude s'est basée sur un travail antérieur [Doat (2003)] ayant montré la possibilité de synthétiser, en milieu hydro-alcoolique, des apatites biomimétiques (mais de taille non contrôlée) dopées à l'euporium, et révélant leur intérêt potentiel pour l'imagerie médicale [Doat (2003)]. Cependant les particules préparées présentaient une taille micronique (jusqu'à environ 600 nm) non adaptée à la mise au point de nano-vecteurs ou nanosondes pour applications biomédicales. Cette problématique a récemment été résolue en partie par les travaux récents de nos équipes [Lebugle et al. (2005) ; Chane-ching et al. (2007)] en greffant à la surface des nanocristaux d'apatite un agent dispersant parfaitement biocompatible dérivant d'un phospholipide présent à la surface de membranes cellulaires humaines : le 2-aminoéthylphosphate (AEP). Cependant, à ce stade, la préparation de telles nanoparticules colloïdales faisait appel à l'utilisation d'un protocole complexe utilisant des réactifs (acide phosphorique, chaux fraîchement préparée par calcination de Ca(OH)_2 , ...) dont la manipulation posait de nombreux problèmes d'ordre pratique en vue, à terme, d'une possible industrialisation.

Dans ce contexte notre premier objectif a été de mettre au point un protocole expérimental permettant de *préparer des suspensions colloïdales hybrides, stables dans le temps, à base d'apatites biomimétiques dopées aux terres rares (principalement Eu^{3+}) en partant de sels (de calcium, de phosphate et d'euporium) aisément manipulables et stockables, ne nécessitant pas de pré-traitement spécifique, et permettant alors d'envisager un possible transfert, à terme, à l'échelle industrielle.*

Dans un second temps nous nous sommes intéressés à un *possible greffage, en surface des nanoparticules colloïdales, d'un agent de ciblage : l'acide folique* (ou vitamine B9), en vue de leur conférer un caractère de ciblage cellulaire. Enfin, diverses études préliminaires ont été menées dans ce travail afin de mieux appréhender l'interaction entre ces nano-systèmes hybrides et le milieu biologique, en vue d'établir une « preuve de concept »

concernant la possible utilisation de tels systèmes dans le domaine biomédical.

Ce manuscrit débute par un Chapitre bibliographique illustrant la problématique du cancer et listant les principaux nano-systèmes actuellement à l'étude (voire commercialisés) pour le traitement et/ou le diagnostic de cancers.

A la suite de ce chapitre introductif, nous présenterons dans le Chapitre 2 la mise au point progressive d'un protocole expérimental visant à l'élaboration de nanoparticules colloïdales, éventuellement dopées à l'euporium. Ce chapitre reporte également la caractérisation physico-chimique des particules obtenues, incluant leurs propriétés de luminescence dans le cas de colloïdes dopées à l'euporium.

Dans le Chapitre 3, nous nous attacherons à aborder des problématiques d'ordre plus pratique en vue d'une possible interaction entre ces nanoparticules colloïdales et le milieu biologique.

CHAPITRE 1 :
REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

I) Généralités sur le cancer

I-1) Bilan historique sur la lutte contre le cancer

Pendant des décennies la cellule tumorale était une boîte noire. Les premières descriptions du cancer remontent au XXIII^e siècle avant J.-C. inscrites sur des papyrus égyptiens. Ces derniers préconisaient son traitement par des pommades. Pour Hippocrate (300 avant J.-C.) et Galien (150 après J.-C.), le cancer résultait d'un déséquilibre entre les liquides corporels. Pour son traitement, ces derniers recommandaient une alimentation saine et des saignées abondantes. De 1890 à 1970, les biologistes savaient déjà que la cellule cancéreuse proliférait mais ils ignoraient tout des raisons pour lesquelles une cellule normale devenait cancéreuse. Le cancer était alors traité par la chirurgie « monobloc » qui consistait à retirer la tumeur avec une large zone de tissus sains environnants.

Pour trouver des traitements, la démarche consistait à tester un nombre considérable de substances sur des cellules tumorales *in vitro*. Celles qui stoppaient leur prolifération ou les tuaient, étaient sélectionnées pour des essais chez l'homme. Ces molécules agissaient principalement au niveau du noyau. Elles tuaient sans distinction les cellules à prolifération rapide, telles que celles du sang ou des bulbes pileux, d'où des effets secondaires tels que la chute des cheveux. C'est en 1944 que le premier traitement chimiothérapeutique fut utilisé pour traiter un cancer du sang. La molécule chimique était la caryolysine, un dérivé du gaz moutarde. En 1964, les propriétés antimorales d'un arbre, l'if, ont par ailleurs été découvertes. Son principe actif, le taxol fut isolé en 1966 mais ne sera commercialisé qu'en 1993.

Ce n'est vraiment qu'à partir des années 1970 que les connaissances sur la cellule tumorale se sont précisées. Les chercheurs ont ainsi découvert la capacité des tumeurs à stimuler la croissance de vaisseaux sanguins pour les alimenter. En 1971, le chirurgien Judah Folkman observe qu'en inhibant la croissance des vaisseaux autour de la tumeur on empêche son développement. Les chercheurs ont également mis en évidence les gènes qui régulent le cycle de division normale de la cellule (cf Définition du cancer), et qui agissent soit en augmentant son rythme (proto-oncogènes) soit en le freinant (gènes suppresseurs de tumeurs). Ils ont ainsi constaté qu'une fois mutés le dysfonctionnement de ces gènes provoquait la prolifération anarchique de la cellule malade. Ainsi en 1976, les biologistes Harold Varmus et Michael Bishop découvrent le premier oncogène humain muté d'un gène normal, qui rend la cellule tumorale.

Il faudra attendre 2001 pour que le premier agent anticancéreux « le Glivec » ciblant un oncogène muté soit commercialisé. Son principe actif, une petite molécule conçue en 1993 agit sur une enzyme mutée, une tyrosine kinase, qui pousse la cellule à se diviser. C'est l'équipe du Dr. Brian Drucker qui a eu l'idée de bloquer cette tyrosine kinase. En effet celle-ci possède une structure tridimensionnelle qui présente une sorte de poche responsable de son activité biologique. En insérant, sur le principe de clé-serrure, la petite molécule du principe actif dans la poche de l'enzyme, son activité biologique est stoppée. Les kinases étant impliquées dans de nombreux cancers, les bloquer est une stratégie utilisée aujourd'hui pour lutter contre de nombreux cancers (cancer du sein, cancer colorectal...). Pour ses travaux, ce spécialiste de la leucémie myéloïde chronique a reçu en 2009 le prix Lasker de la recherche clinique.

Toutefois les kinases impliquées ne sont pas identiques d'un cancer à un autre. Ainsi le Glivec ne fonctionne que contre la leucémie myéloïde chronique. Par ailleurs une cellule cancéreuse est instable par nature. Son taux de mutation est assez élevé. Ainsi le Glivec au bout d'un certain temps peut s'avérer inefficace, lorsque la cellule cancéreuse a muté. Il n'est donc pas rare que le patient en cours de thérapie ciblée développe des résistances à l'agent thérapeutique. Un autre agent anticancéreux faisant partie des thérapies ciblées, l'Herceptin qui agit contre le cancer du sein (anticorps ciblant le récepteur HER₂ surexprimé dans le cas de cancers du sein), connaît lui aussi le même problème que le Glivec. Pour palier cet inconvénient il faudrait combiner des thérapies ciblant plusieurs rouages de la cellule cancéreuse. La Figure 1 reporte les 9 anticancéreux (répartis en fonction de coût de traitement associé) les plus prescrits en France en 2008 dans le secteur public. Quatre d'entre eux sont des thérapies ciblées (Mabthéra, Avastin, Herceptin, Taxotère). A elles seules, les thérapies ciblées représentent plus de la moitié (59%) des coûts.

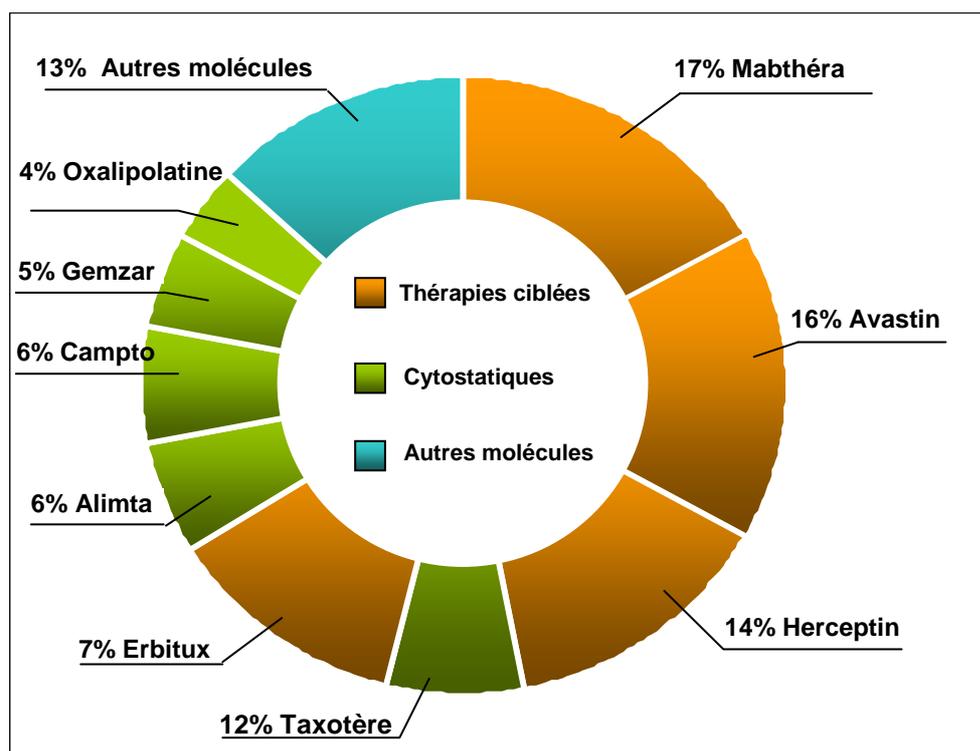


Figure 1 : Les 9 anticancéreux les plus prescrits en France en 2008 (répartition en fonction des coûts de traitement). *Source INCA (Institut national du cancer)*

Ainsi (outre l'aspect scientifique) l'un des enjeux dans le développement et la démocratisation de ces thérapies ciblées est également leur financement. En effet le coût moyen de ces thérapies ciblées se situe autour de 50 000 € par an et par patient. Ce chiffre est cinq à dix fois plus élevé que les chimiothérapies non ciblées. L'écart risque de se creuser avec la fin prochaine du brevet de chimiothérapies très utilisées telles que le Taxotère, qui permettra de fabriquer des médicaments génériques moins chers contenant ces molécules. En France, le nombre de patients traités est passé de 178 000 en 2002 à plus de 250 000 en 2008. Ceci représente déjà un coût de 970 millions d'euros. Selon le Journal of National Cancer Institut pour prolonger notablement, à l'aide des thérapies ciblées, la durée de vie de 550 000 Américains, il faudra dépenser plus de 440 milliards de dollars par an.

I-2) Définition du cancer

Chaque minute, dans notre organisme plus de 200 millions de cellules défectueuses sont détruites pour être remplacées par de nouvelles cellules. Ce phénomène d'élimination dénommé mort cellulaire programmée (MCP) ou « Apoptose » est à la base même de la survie et du développement harmonieux de tout organisme pluricellulaire. Il régit l'existence d'un équilibre dynamique entre la prolifération cellulaire, qui assure la croissance et le maintien de l'organisme, et la mort cellulaire essentielle pour l'élimination des cellules superflues ou potentiellement dangereuses pour l'organisme.

Dans le cas d'un cancer, la cellule défectueuse refuse l'ordre de « se suicider » et prolifère à l'infini. On définit ainsi le cancer (du latin cancer, « crabe ») comme une prolifération anarchique et incontrôlée des cellules endommagées. Ce dérèglement s'explique par le fait que cette maladie s'attaque aux gènes régulant la croissance et la différenciation cellulaire. Ceux-ci peuvent être classés en trois catégories :

- Les *oncogènes* : Dans le cas d'un cancer les oncogènes, régulateurs positifs de la prolifération cellulaire, deviennent hyperactifs.

- Les *gènes suppresseurs de tumeurs* : Ce sont des régulateurs négatifs de la prolifération cellulaire (en quelque sorte des freins), et deviennent inactifs chez une cellule cancéreuse.

- Les *gènes réparateurs de l'ADN* : Ils ont pour rôle, comme leur nom l'indique, de détecter et de réparer toute lésion de l'ADN. Ils deviennent à leur tour inactifs.

Cette cascade de dysfonctionnements aboutit à une multiplication anarchique de la cellule cancéreuse. Celle-ci va pouvoir se développer de trois manières différentes :

- 1- soit elle suit un développement local, jusqu'à la formation de tumeurs qui vont engendrer la compression des organes voisins, l'envahissement et/ou la destruction des tissus ;

- 2- soit la cellule se développe au niveau régional pour affecter cette fois-ci les ganglions lymphatiques où logent les cellules du système immunitaire. Ceci va engendrer également la formation de tumeurs ;

- 3- soit celles-ci peuvent à leur tour se développer à distance pour former des métastases. Ce développement anarchique des cellules cancéreuses conduit à des altérations des fonctions vitales (respiration, digestion et excrétion) qui peuvent mener dans les cas les plus avancés au décès du patient.

I-3) Statistiques du cancer

Aujourd'hui le Centre International de Recherche sur le Cancer (CIRC) estime qu'il y a 25 millions de personnes atteintes d'un cancer dans le monde. Selon son dernier rapport de 2008 (World Cancer Report) le nombre de malades a doublé entre 1970 et 2000. Plus de 12 millions de nouveaux cas de cancers ont été diagnostiqués en 2008. Durant cette même année, 7 millions de malades ont trouvé la mort.

Le cancer touche un homme sur deux et une femme sur trois. Selon l'Institut national de Veille Sanitaire (InVS), l'établissement public chargé de surveiller en permanence l'état de santé de la population, le nombre de nouveaux cas de cancer était de 320 000 en 2005. Parmi les cancers les plus répandus la même année, on trouve le cancer de la prostate chez l'homme et les cancers mammaires chez la femme (Figure 2). En 25 ans l'occurrence du cancer a quasiment doublé : +93% chez l'homme et +84% chez la femme. Malgré une baisse de risque de décès d'un cancer de 25%, l'InVS prévoit une augmentation de 10,8% de nouveaux cas de cancer qui seront diagnostiqués pour l'année 2009. Selon ces statistiques, près de 147 000 patients atteints de cancer décéderont des suites de leur maladie.

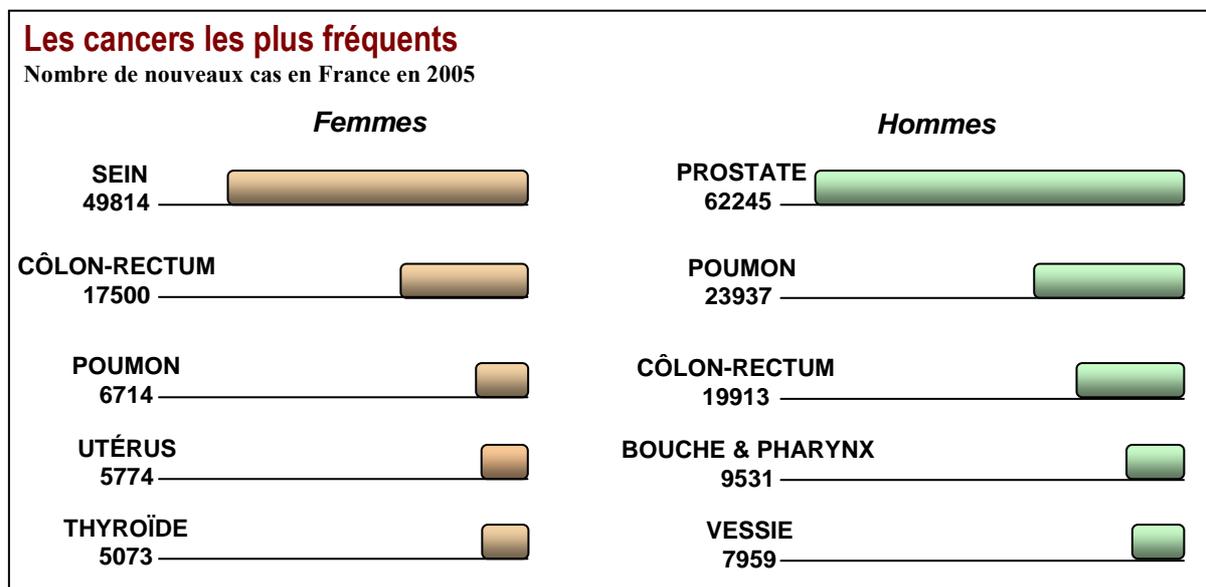


Figure 2 : Statistiques des cancers en France pour l'année 2005. Source InVS (Institut national de Veille Sanitaire)

I-4) Comment faire reculer le cancer ?

Les autorités publiques s'accordent à dire qu'il faut travailler sur trois grands axes intimement liés :

- la **prévention** auprès du grand public : Selon un rapport de 2007 (résumé disponible sur le site français FMRC) publié par le fond mondial de recherche contre le cancer (WCRF) et l'institut Américain de recherche sur le cancer (AIRC), il existe une corrélation entre la réduction des cas de cancer et une hygiène de vie saine (alimentation équilibrée, activité sportive régulière, consommation modérée d'alcool, et absence de tabagisme). Ainsi dans ce rapport, les experts soutiennent qu'un cancer sur deux pourrait être évité. Malheureusement lorsque le cancer est déclaré, la prévention ne suffit plus. Aussi celle-ci doit être complétée par des efforts en recherche fondamentale et appliquée ;

- le **traitement** pour mieux cibler les cellules tumorales et éviter toute dégradation des tissus sains. En effet aujourd'hui il existe une multitude de traitements (chirurgie, chimiothérapie, radiothérapie, curiethérapie, immunothérapie, greffe...) qui très souvent doivent être complétés par des soins dits « de support » qui ont pour rôle de gérer la douleur ou les effets secondaires d'un traitement afin de garantir au mieux au patient une meilleure qualité de vie.

- le **diagnostic** pour détecter de manière précoce et précise la maladie afin de proposer au patient le traitement adéquat. Dans ce domaine il existe aussi un large éventail d'outils de diagnostic : examen clinique (auscultation, analyses urinaires et sanguines), endoscopie pour explorer une cavité (estomac, bronche, côlon), radiographie pour examiner les poumons et les os, échographie pour visualiser les organes et effectuer des prélèvements, mammographie pour explorer les seins, IRM pour parcourir le cerveau, la moelle osseuse et les parties molles... Lorsqu'un cancer est suspecté, ces outils de diagnostic doivent être secondés par une analyse histologique (biopsie) du tissu pathogène pour confirmer ou infirmer l'examen préalable. En effet il n'est pas rare de constater que certaines analyses préliminaires peuvent être des faux résultats positifs (présence d'un cancer suggéré alors qu'il n'en est rien) ou négatifs (le cancer n'est pas détecté). Ce genre d'anomalie a déjà été souligné par un groupe de travail américain le « U.S Preventive Service Task Force » qui a estimé qu'en 2002 aux Etats-Unis, 10% à 20% de cancers de la prostate n'ont pas été détectés par le test APS (Antigène Prostatique Spécifique).

La nécessité d'améliorer le traitement et le diagnostic du cancer implique la création de systèmes de transports de principes actifs ou vecteurs dit « intelligents », capables de déjouer les barrières biologiques (épithélium/endothélium, membrane cellulaire, éléments du sang) du corps humain afin d'y acheminer le principe actif dans le cas du traitement et/ou la sonde (fluorescente, radioactive, magnétique) dans le cas du diagnostic, éventuellement de manière ciblée vers la cellule malade sans altérer les tissus sains.

En effet, malgré leur efficacité, certains principes actifs sont abandonnés dû à leur forte déperdition vers d'autres tissus entraînant des effets toxiques importants [Andrieux et al. (2003)]. Ce problème est illustré dans le cas des glioblastomes qui sont des tumeurs primitives du système encéphalique au pronostic dramatique, dont les traitements thérapeutiques n'ont que peu évolué en trente ans. Cet échec thérapeutique est relié notamment à la présence de barrières hémato-encéphaliques (BHE) qui occasionnent une déperdition importante d'agents chimiothérapeutiques entraînant une toxicité systémique.

Ce ciblage « passif » du principe actif vers le site d'action peut-être amélioré, par le concept du « magic bullet », imaginé dès le 19^{ème} siècle par le savant Paul Ehrlich, qui consiste à « transporter » le principe actif ou la sonde, de son site d'administration jusqu'à son site d'action. Aujourd'hui ce concept trouve toute sa résonance grâce aux progrès réalisés dans la recherche galénique et le développement des nanotechnologies. En effet celles-ci ont permis de concevoir des vecteurs nanométriques capables d'acheminer le principe actif ou l'agent de contraste de son site d'administration jusqu'à son site d'action, en le protégeant de toute altération et en contrôlant sa libération dans le temps et dans l'espace [Andrieux et al. (2003)].

A ce stade, il est important de mentionner la présence de différentes barrières biologiques (épithélium/endothélium, membrane cellulaire, éléments du sang) qu'un vecteur doit franchir pour atteindre la cellule cible. Ces aspects seront traités en détails dans l'introduction du Chapitre 3, où nous nous attacherons à comprendre en quoi ces barrières peuvent être un obstacle pour le vecteur, et quelles sont les caractéristiques que ce dernier doit généralement mettre en œuvre pour franchir ces barrières biologiques.

Dans la section ci-après, nous nous proposons de rappeler les principaux systèmes (que ce soit dans le domaine du traitement ou du diagnostic) qui sont aujourd'hui à l'étude et/ou commercialisés. En bilan de cette étude bibliographique, nous dégagerons un cahier de charge des caractéristiques souhaitées pour un vecteur destiné à une application médicale.

II) Les (nano)biotechnologies au service de la médecine

II-1) Systèmes lipidiques

Les lipides occupent ici une place de choix car ils sont présents dans la membrane plasmique de la cellule. Les lipides s'organisent soit sous la forme de liposomes soit sous la forme de nanosphères ou nanocapsules lipidiques [Couvreur et Vauthier (2006)].

II-1-a) les liposomes

Leurs caractères biocompatible et biodégradable, a largement motivé leur développement comme vecteur [Maruyama et al. (1999)]. Les liposomes se présentent sous la forme de sphères, qui peuvent être constituées d'une à plusieurs bicouche(s) de phospholipides, similaires aux phospholipides présents dans les membranes cellulaires, organisées en phases lamellaires. Les liposomes sont synthétisés à partir de films de phospholipides (ou glycérophospholipides), dispersés en solution aqueuse. Leur taille est contrôlée par l'extrusion des suspensions liposomiales à travers des membranes de porosités contrôlées [Couvreur et Vauthier (2006)]. Leur diamètre varie ainsi de quelques dizaines de nanomètres à quelques dizaines de microns.

Tout comme pour les phospholipides de la membrane plasmique, leur disposition originale s'explique à la fois par leurs caractères hydrophile et hydrophobe, dus respectivement à la portion (glycérol + phosphate) et aux chaînes carbonées qui les composent (Figure 3).

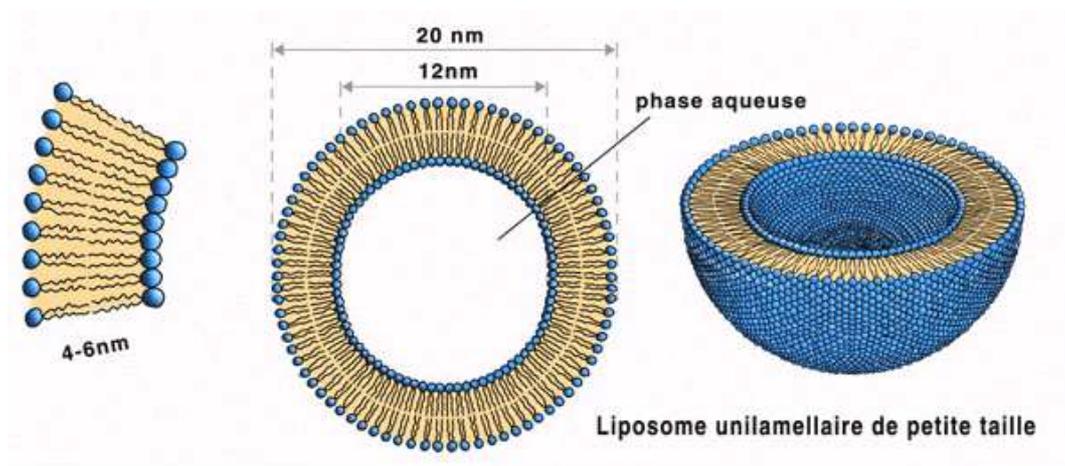


Figure 3 : Associations de phospholipides - Liposomes

D'une part, cette architecture offre à la fois un compartiment aqueux dans lequel des principes actifs hydrophiles [Andrieux et al. (2003)] (ou encore des sondes [Häfeli et al. (1991)]), peuvent être introduits, et un compartiment hydrophobe entre les bicouches dans lequel des principes actifs lipophiles pourront être introduits. D'autre part, comme pour les phospholipides des membranes cellulaires, les phospholipides des liposomes possèdent des chaînes aliphatiques qui leur permettent également de se déformer, facilitant ainsi leur passage à travers les espaces situés entre les cellules.

En fonction de leur capacité de ciblage vers des cellules tumorales, certains auteurs [Andrieux et al. (2003)] parlent de liposomes de première, deuxième ou troisième génération, et cette distinction peut probablement être élargie aux autres types de nano-systèmes étudiés. Les liposomes de première génération n'ont aucune capacité de ciblage. Aussitôt après injection par voie intraveineuse ils sont interceptés par les opsonines qui alertent les cellules (macrophages) de système SPM (en premier lieu les cellules de Kupffer du foie et une zone marginale de la rate). On parle de ciblage naturel du territoire hépatosplénique [Couvreux et Vauthier (2006)]. Cet adressage naturel vers le foie ou la rate est particulièrement intéressant lorsque l'on veut traiter ou diagnostiquer des cellules tumorales présentes au niveau du foie (ex : une métastase hépatique). Cependant lorsqu'il s'agit de cibler des cellules hors du territoire hépatosplénique, ces liposomes injectés tels quels trouvent rapidement leur limite [Andrieux et al. (2003)].

Cette limite a pu être repoussée par les liposomes dits « de deuxième génération ». En effet il s'agit de liposomes de première génération auxquels sont greffés à leur surface des molécules de PEG (on parle alors de liposomes « peggylés »), pour empêcher leur opsonisation et leur destruction par les cellules du système SPM et donc les cellules de Kupffer et de la rate. Ces liposomes de deuxième génération échappent ainsi aux macrophages du système SPM par leur caractère dit « furtif ». Cette furtivité augmente considérablement le temps de circulation dans le flux sanguin et la probabilité de traverser les tissus tumoraux, qui sont plus vascularisés et donc plus perméables, pour atteindre les cellules malades (Figure 4). On parle de ciblage « passif ».

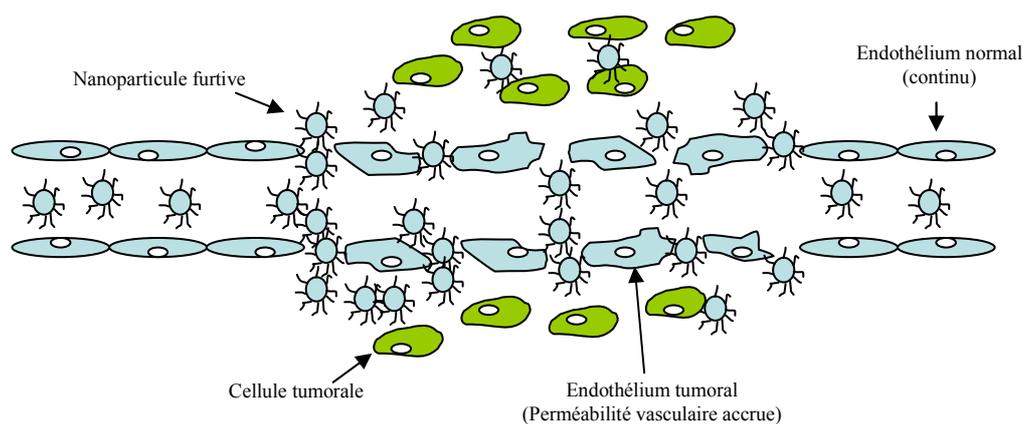


Figure 4 : Diffusion de nanoparticules « furtives » à travers un endothélium tumoral

Cependant malgré ce « bond technologique », de tels vecteurs de deuxième génération restent néanmoins incapables de cibler spécifiquement une cellule ayant une pathologie donnée (cancéreuse, infectieuse...) d'où le développement de vecteurs de troisième génération.

L'enjeu pour ces liposomes de troisième génération est d'arriver à reconnaître les cellules malades, ou encore parmi des cellules malades celles qui présenteraient la pathologie sur laquelle le principe actif doit agir spécifiquement. Ce ciblage « intelligent » exige la présence de ligands ou « agent de ciblage » (anticorps, peptides, sucres, acide folique [Hilgenbrink et Low (2005)]) qui seront greffés à la surface du vecteur « peggylé », et qui auront pour mission de « piloter » ce dernier jusqu'à la cellule cible. De manière imagée, sous le principe de clé-serrure, le ligand (clé) ne pourra interagir qu'avec des récepteurs (serrures) présents à la surface de la cellule cible, qui lui seront spécifiques. Ainsi le vecteur de troisième génération, par l'intermédiaire de son ligand, pourra être internalisé par la cellule cible pour y libérer le principe actif qu'il contient ou permettre, dans le cas d'un diagnostic, la visualisation de celle-ci.

Ce concept est très prometteur, puisque des liposomes « peggylés » chargés en amphotéricine B (antibiotique) sur lesquelles a été greffé un anticorps « le 34A » spécifique aux glycoprotéines de surface exprimées au niveau luminal de l'endothélium vasculaire pulmonaire se sont avérés très actifs dans les aspergilloses pulmonaires expérimentales [Otsubo et al. (1998)].

De ce travail considérable, 6 types de liposomes sont commercialisés actuellement dont l'Ambisome® (un antifongique), en Europe et au États-Unis [Fukumori et Ichikawa (2005)]. Le Tableau 1 reporte quelques exemples de vecteurs commercialisés à base de liposomes [CNRS International magazine].

Nom commercial	Principe actif	Peggylé	Agent de ciblage	Application(s)
Doxil®	doxorubicine	oui	non	Cancer ovarien
Caelyx®	doxorubicine	oui	non	Cancer du sein Cancer ovarien

Tableau 1 : Quelques vecteurs commercialisés à base de Liposomes

II-1-b) Les nanoparticules lipidiques

Les nanoparticules lipidiques ont également une place de choix dans leur utilisation comme nanovecteurs de principes actifs [Couvreur et Vauthier (2006)]. En effet, comme évoqué précédemment, 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 (~100 nm) [Couvreur et Vauthier (2006)] (Figure 5). 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.

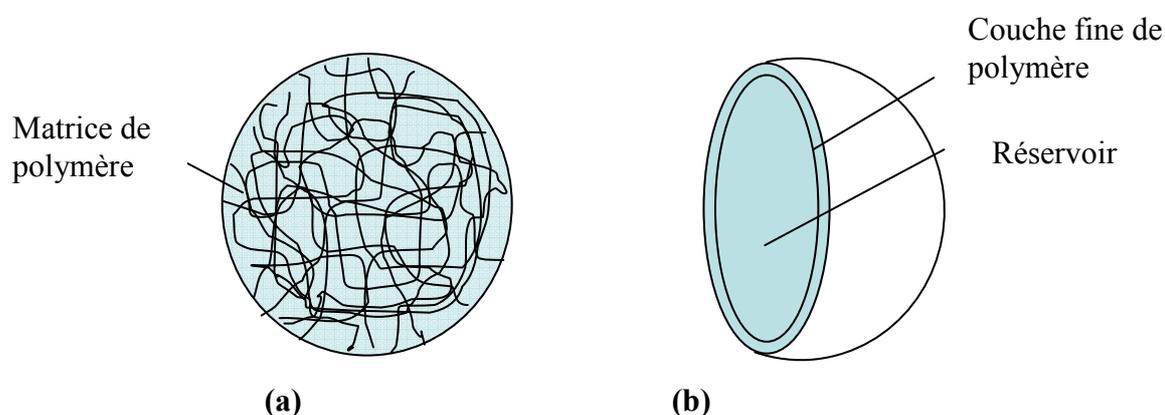


Figure 5 : Nanoparticules sous la forme de nanosphère (a) et de nanocapsule (b)

II-2) Les nanoparticules de polymères

Les nanoparticules de polymères, sont synthétisées par des méthodes de polymérisation/polycondensation de polymères biodégradables (l'acide polylactique (PLA), l'acide polylactique-co-glycolique (PLGA), le chitosane, le poly-epsilon-caprolactone...) utilisés dans l'industrie alimentaire ou encore dans le domaine de la chirurgie (fils de suture...) [Fukumori et Ichikawa (2005)]. Les polymères peuvent être également naturels, à base d'albumine [Wartlick et al. (2006)] ou de gélatine [Kaul et al. (2002)]. Comme pour les nanoparticules lipidiques, 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 quelque nanomètres d'épaisseur [Couvreur et Vauthier (2006)]. Leur taille est généralement inférieure à 300 nm [Fukumori et Ichikawa (2005)]. Du PEG peut être greffé à leur surface, et ils sont plutôt utilisés dans le traitement du cancer.

II-3) Les nanoparticules d'oxydes : Fe_3O_4 / $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$, SiO_2 , YVO_4 et Gd_2O_3

Les cristaux de magnétite (Fe_3O_4) ou de maghémite ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) sont souvent rencontrés en nanomédecine. Ces nanoparticules d'oxyde de fer sont appelées SPIO (Superparamagnetic iron oxide particles) lorsque leur taille est comprise entre 50 nm et 500 nm, et USPIO (Ultra-small superparamagnetic iron oxide particles) lorsque leur taille est inférieure à 50 nm. Ces nanoparticules sont synthétisées par co-précipitation à partir de sels de fer (chlorures, nitrates ou encore sulfates). Pour prévenir leur agglomération dans le milieu biologique et leur capture par les cellules du système SPM, leur surface peut être recouverte de polymères de type PEG [Moghimi et al. (2001)], dextran [Weissleder et al. (1989)], chitosane [Donadel et al. (2008)], PEI (polyéthylèneimine) [Steitz et al. (2007)], ou encore par des phospholipides [Duan et al. (2008)]. Pour assurer un ciblage spécifique vers les cellules tumorales, des ligands (petites molécules (type acide folique), peptides, protéines, anticorps) peuvent être également greffés. Le tableau 2 montre quelques exemples d'applications aussi bien dans le domaine du traitement par hyperthermie, que dans le domaine du diagnostic par

IRM (imagerie par résonance magnétique). D'ailleurs, deux types de formulations de particules SPIO sont actuellement commercialisées sous le nom de Feridex® et Resovist®.

Agents de ciblage	Récepteurs	Application	Références
<u>Petites molécules :</u> -Acide folique -Méthotrexate	Récepteurs folates Récepteurs folates	Cancer du sein (imagerie) Cancer du cerveau (imagerie et thérapie)	[Sun et al. (2006)] [Kolher et al. (2005)]
<u>Peptides :</u> RGD Chlorotoxin	A ν β 3 integrin MMP-2	Cancer du sein (imagerie) Cancer du cerveau (imagerie et thérapie)	[Montet et al. (2006)] [Veisoh et al. (2005)]
<u>Aptameres :</u> A 10 RNA aptamere	Prostate-spécifique	Cancer de la prostate (imagerie)	[Wang et al. (2008)]
<u>Protéines :</u> Annexin V Transferrin	Phosphatidylserine Recepteurs de transferrin	Apoptose (imagerie) Cancer du sein (imagerie)	[Schellenberger et al. 2004] [Kresse et al. (1998)]
<u>Anticorps :</u> Herceptin	Her2/neu	Cancer du sein (imagerie et thérapie)	[Funovics et al. (2004)]

Tableau 2 : Exemples d'applications pour les nanoparticules d'oxydes de fer

D'autres nanoparticules « oxydes » sont également en cours de développement. On trouve notamment des systèmes à base de SiO₂, YVO₄ ou Gd₂O₃.

Les nanoparticules de silice et de vanadate sont synthétisées respectivement par procédé sol-gel [Stöber et al. (1976)] et par co-précipitation [Buissette et al. (2005)]. Elles sont plutôt destinées à l'imagerie par fluorescence. Leur taille est généralement de l'ordre de 20 nm. Celles-ci sont rendues luminescentes en incorporant dans leur matrice des terres rares, typiquement de l'euprium trivalent (Eu³⁺). En effet l'ion Eu³⁺ introduit dans une matrice minérale, possède une luminescence stable dans le temps. Dans le cas des vanadates, ces nanoparticules sont ensuite recouvertes d'une couche protectrice de silice pour limiter les désexcitations non radiatives (cf Chapitre 2) de la terre rare, et pour permettre leur

fonctionnalisation notamment par des fonctions amines. Celles-ci pourront par la suite jouer le rôle de bras (« linker ») au bout duquel pourra être accroché, par de liaisons covalentes, d'éventuels agents dispersants et/ou de ciblage.

Les nanoparticules d'oxyde de gadolinium, quant à elles, trouvent un intérêt à la fois pour l'imagerie (fluorescence et IRM) et pour la thérapie. Celles-ci sont généralement constituées d'un cœur d'oxyde de gadolinium (2-4 nm) entouré d'une coquille en polysiloxane (1-3 nm) dans laquelle des molécules organiques peuvent être introduites (ex : Fluorescien isothiocyanate (FITC)) [Fizet et al. (2009), Faure et al. (2009)]. Ces nanoparticules peuvent en outre être fonctionnalisées par des agents dispersants de type PEG afin d'assurer leur stabilité colloïdale en milieu biologique [Fizet et al. (2009), Faure et al. (2009)].

II-4) Les quantum dots

Leur développement s'inscrit plutôt dans le domaine du diagnostic par imagerie par fluorescence. En effet, dans ce domaine, les sondes actuellement utilisées sont des molécules organiques de type rhodamine, fluorescéine, isothiocyanate, pyrène, anthracène [Weston et al. (1990)]. Or ces molécules présentent plusieurs inconvénients :

- Celles-ci se dégradent rapidement sous irradiation, entraînant une décroissance rapide de l'intensité de fluorescence et donc un temps d'observation relativement court (généralement de l'ordre de quelques microsecondes) [Song et al. (1995)]. On parle de photobleaching.

- Leur spectre d'émission présente des bandes larges pouvant se chevaucher avec d'autres bandes d'émission appartenant à des fluorophores (ex : nicotinamide, collagène, élastine) naturellement présents dans les tissus biologiques, responsables de l'autofluorescence des tissus [Bornhop et al. (2001)].

- Les longueurs d'ondes auxquelles ces molécules s'excitent ou émettent changent avec le milieu chimique local (ex : pH, interaction avec les ions voisins...).

Pour palier ces inconvénients, certains auteurs ont développé des semi-conducteurs (taille comprise entre 1 et 10 nm) fluorescents appelés « quantum dots », formés de

nanocristaux minéraux combinant des éléments des groupes II et VI (ex: CdS, CdSe, CdTe) ou encore des groupes III et V (ex: GaAs, InP). Les quantum dots présentent la particularité d'avoir une longueur d'onde d'émission qui varie en premier lieu en fonction de leur diamètre (fonction de la taille de leur boîte quantique). Ils présentent donc une variété de couleurs d'émission. Cependant ces quantum dots appliqués « nus » tels quels peuvent être dégradés par photo-oxydation. C'est pourquoi ceux-ci sont recouverts de couches protectrices transparentes de type ZnS, TOPO (trioctylphosphine oxide). On parle dans ce cas de semi-conducteurs fluorescents « cœur-coquille ». Néanmoins ces couches protectrices sont hydrophobes et leur application en milieu biologique est compromise. Pour contourner cette difficulté, ces quantum dots sont encapsulés dans des couches de phospholipides [Dubertret et al. (2002)] ou encore recouverts de silice [Yang et al. (2004)]. Ces couches protectrices permettent par la suite d'envisager par exemple un greffage à leur surface d'agents dispersants et/ou d'agents anticancéreux.

Ces quantum dots révèlent néanmoins des inconvénients : leur luminescence est « aléatoire », elle disparaît et réapparaît. On parle de phénomène de scintillement. De plus, le temps de vie de luminescence est faible de l'ordre de 20 ns, ce qui n'est pas adapté pour des observations de longue durée. D'autre part leur application dans le domaine médical est controversée de par la présence d'éléments toxiques qui rentrent dans leur composition tels que le cadmium. Enfin, les modes d'élimination naturelle de ces composés demeurent méconnus.

II-5) Les nanoparticules d'or

Dès l'antiquité l'or a suscité l'intérêt des médecins Indous, Chinois et Egyptiens pour sa vertu thérapeutique [Bhattacharya et al. (2007)]. Il était utilisé pour traiter les désordres nerveux et l'épilepsie [Shwa (1999)]. Aujourd'hui avec le développement des nanotechnologies, les nanoparticules d'or suscitent également un intérêt grandissant pour leur application dans le domaine médical. En effet à l'échelle nanométrique l'or change de couleur, il passe de la coloration jaune qu'on lui connaît à une coloration rouge violacée. Ce changement est lié au phénomène de résonance plasmon de surface, et constitue un outil de caractérisation prometteur pour l'imagerie médicale [Feldheim et Foss 2002]. La réduction

de taille joue également sur la réactivité chimique de l'or et les propriétés d'adsorption de molécules.

Les nanoparticules d'or sont synthétisées par réduction de précurseurs d'or en présence de « capping agents » [Henglein (1989)]. Pour améliorer leur dispersion, les nanoparticules sont recouvertes d'une couche de silice SiO₂ [Liu et al. (2005)] ou encore de chitosane [Huang et al. (2004)]. A ce stade, ces nanoparticules pourront être fonctionnalisées par des fonctions thiols, amines qui ont une très grande affinité avec les atomes d'or. Bhattacharya et al. (2007) ont montré la possibilité de greffer à la surface de nanoparticules d'or du PEG et de l'acide folique. Les tests biologiques montrent que ces nanoparticules sont internalisées par les cellules cancéreuses.

II-6) Les nanotubes de carbone

Les nanotubes de carbone ont été mentionnés pour la première fois dans la littérature scientifique en 1976 par [Oberlin et al. (1976)]. Cependant leur structure (mono-paroi et multi-parois) n'a pu être décrite qu'en 1991 par Ijima [Ijima (1991)]. Depuis, les recherches menées sur ces nano-objets se sont concentrées sur leurs propriétés mécaniques, thermiques et électriques. C'est en 2002 que [O'Connell et al. (2002)] ont signalé la présence de « band gap » de fluorescence pour les nanotubes mono-paroi. C'est ainsi que ceux-ci ont suscités un intérêt grandissant dans le domaine de l'imagerie. Néanmoins, au même titre que les quantum dots, ils sont controversés pour des applications dans le domaine médical et font encore l'objet d'intenses recherches.

III) Bilan de l'étude bibliographique

Sur la base de l'étude bibliographique précédente, et prenant en compte des contraintes de biocompatibilité/biodégradabilité, nous pouvons lister un certain nombre de caractéristiques souhaitables pour un système destiné à la thérapie et/ou au diagnostic, en particulier *dans un objectif de mise au point de suspensions injectables (voie intraveineuse) de nano-systèmes* :

- a) Être composé de matériaux **biocompatibles** et **biodégradables** ; et les métabolites issus de leur dégradation doivent pouvoir être pris en charge par le corps hôte,
- b) Présenter une **taille nanométrique, typiquement inférieure ou égale à 100 nm**, et une bonne **stabilité** physico-chimique afin de :
 - permettre sa circulation dans les capillaires sanguins les plus fins, tout en évitant une embolie,
 - faciliter le passage des barrières biologiques (épithélium/endothélium, éléments du sang, membranes plasmiques) ; voire présenter un caractère furtif lié à une très faible taille de particules, limitant alors fortement la reconnaissance par les macrophages (foie/rate),
 - faciliter l'internalisation du système par endocytose dans la cellule cible.
- c) Pouvoir permettre une association avec un principe actif pour la thérapie et/ou une sonde (agents de contraste, éléments radioactifs, éléments fluorescents) pour le diagnostic, voire d'un agent de ciblage cellulaire.

Au vu de ces différents points, il nous a semblé judicieux de nous pencher dans ce travail de thèse sur l'étude de **nano-systèmes à base d'apatites phosphocalciques nanocristallines biomimétiques** (de caractéristiques proches de celles rencontrées au niveau du minéral osseux), et d'en examiner le potentiel **pour des applications bio-médicales n'ayant plus trait à l'os, mais mettant en jeu une interaction directe avec des cellules, que ce soit dans une approche de diagnostic de cancers ou de thérapeutique.**

Les nanocristaux de telles apatites biomimétiques présentent une composition chimique globale pouvant généralement être décrite par la formule :



où le symbole \square représente une lacune (en sites Ca ou OH). Ces apatites, dérivées de l'hydroxyapatite $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, sont bien connues à ce jour pour leurs applications dans l'ingénierie tissulaire de l'os.

Récemment, la possibilité de synthétiser en milieu hydro-alcoolique et à 37°C des apatites biomimétiques (de taille non contrôlée) dopées à l'euporium a été démontrée [Doat (2003)]. Rappelons que ces ions présentent plusieurs avantages :

- ils peuvent être excités à basse énergie, dans le domaine du visible (464 nm) ou proche du visible (392 nm), permettant d'envisager l'étude de tissus biologiques sans les altérer,
- leurs spectres d'excitation et d'émission se caractérisent par des bandes relativement fines et distinctes,
- ils présentent une durée de vie de luminescence importante, de l'ordre de la milliseconde, en comparaison aux sondes conventionnelles (rhodamine, fluorescéine...) dont la durée de vie est de l'ordre de la nanoseconde. Cette caractéristique permet a priori :
 - d'une part de réaliser des observations prolongées de cellules ou tissus biologiques.
 - d'autre part d'autoriser leur utilisation en microscopie confocale en temps résolu (ou « temps retardé »), évitant ainsi l'autofluorescence du tissu biologique, dont la durée de vie est courte, de l'ordre de la nanoseconde (Figure 6).
- leur toxicité est faible [Haley (1965)].

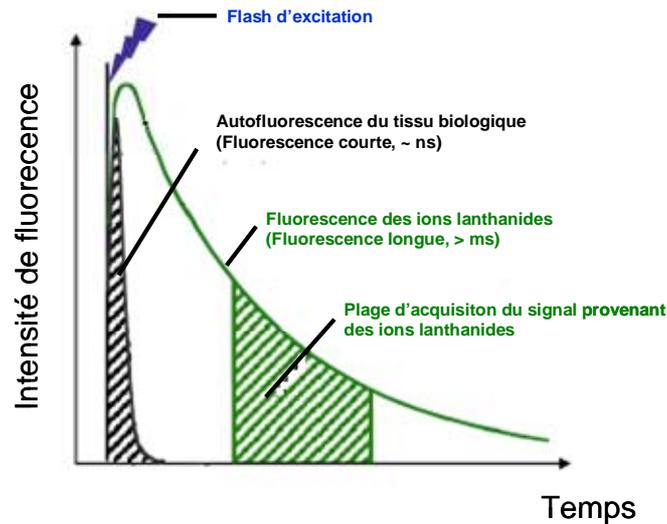


Figure 6 : Durées de vie de luminescence - Intérêt des lanthanides pour analyses en temps retardé

Dans cette étude [Doat (2003)], des tests réalisés *in vitro* sur des cellules cancéreuses pancréatiques humaines ont montré par microscopie confocale et sous excitation (488 nm) qu'une partie des particules d'apatite étaient internalisables, mettant ainsi en évidence l'intérêt potentiel des systèmes apatitiques pour l'imagerie médicale.

Cependant dû à leur forte réactivité de surface, les nanocristaux d'apatite ont une forte tendance à l'agglomération. L'un des enjeux faisant suite aux travaux de Doat (2003) était donc d'améliorer la formulation de ces nanocristaux et permettre l'obtention de nanoparticules individualisées. Cette problématique a pu être levée par les travaux récents de nos équipes [Lebugle et al. (2005) ; Chane-ching et al. (2007)] en greffant à la surface des nanocristaux d'apatite phosphocalcique un agent dispersant parfaitement biocompatible (correspondant à la tête polaire de la phosphatidyléthanolamine, un phospholipide présent à la surface de membranes cellulaires humaines) : le 2-aminoéthylphosphate (AEP). Ces travaux ont montré que la présence d'AEP en surface des cristaux pouvait limiter l'agglomération des nanocristaux par répulsion électrostatique et ainsi obtenir une formulation colloïdale.

Cependant, à ce stade, ces nanoparticules colloïdales étaient synthétisées à partir de réactifs (acide phosphorique et chaux fraîchement préparée par décomposition de $\text{Ca}(\text{OH})_2$) dont la manipulation posait des difficultés en vue d'une éventuelle industrialisation :

- la nécessité décomposer le $\text{Ca}(\text{OH})_2$ juste avant la réaction de synthèse (en effet CaO présente une forte hygroscopie, menant rapidement au mélange $x\text{CaO} \cdot y\text{Ca}(\text{OH})_2$)
- manipulation de composés dangereux : H_3PO_4 et CaO
- difficulté de stockage des solutions primaires

Dans ce contexte notre premier objectif a été de *synthétiser* puis *caractériser* des suspensions colloïdales hybrides à base de nanoparticules d'apatites biomimétiques dopées aux terres rares (principalement Eu^{3+}) en partant de sels (de calcium, de phosphate et d'euporium) aisément manipulables, stockables et ne nécessitant pas de pré-traitement spécifique, et permettant alors d'envisager un possible transfert, à terme, à l'échelle industrielle. Dans un deuxième temps notre objectif a consisté à *greffer à leur surface un agent de ciblage* de cellules tumorales pour leur conférer un caractère de ciblage de haute spécificité. Nous avons choisi l'acide folique qui présente plusieurs avantages :

- il est parfaitement biocompatible (il s'agit de la vitamine B9, utilisée par les cellules pour leur métabolisme normal),
- comme montré dans notre étude bibliographique (voir section précédente) [Sun et al. (2006)], l'acide folique est reconnu par des récepteurs membranaires dits « récepteurs folates » qui lui sont spécifiques et qui sont surexprimées dans de divers cas de cancers (ovaire, rein, sein...),
- par rapport aux autres types d'agents de ciblages (anticorps, peptides), c'est une petite molécule, d'où un plus faible impact sur la stabilité de suspensions/formulations,
- son association avec la surface de nanoparticules peut être réalisée aussi bien par des liaisons covalentes que par des liaisons ioniques, en fonction de la nature du vecteur qui lui est associé [Bhattacharya et al. (2007)].

Enfin, diverses études préliminaires ont été menées afin de mieux appréhender l'interaction avec le milieu biologique. Dans ce cadre :

- des tests d'évaluation de la cytotoxicité (tests MTT) ont été réalisés sur deux types cellulaires (cellules mésenchymateuses souches humaines et cellules de cancer du sein), et ce aussi bien en présence ou en absence d'acide folique adsorbé,
- une étude du potentiel pro-inflammatoire des nanoparticules colloïdales préparées a été initiée par suivi de la possible libération de radicaux libres oxygénés (RLO) par des monocytes/macrophages humains,
- des tentatives d'observation des nanoparticules par microscopie optique ont été menées,

Par ailleurs, nous nous sommes aussi penchés sur la purification des suspensions colloïdales par procédé de dialyse, ainsi que sur la possibilité de lyophiliser puis de remettre en suspension les colloïdes préparés, en vue de faciliter un possible stockage a long terme. Nous avons également examiné le devenir de la suspension après contact avec de l'albumine ou du fluide biologique simulé (SBF), ou après mise en contact avec un milieu acide (pH 5) se rapprochant des conditions post-endocytose.

CHAPITRE 2 :

ELABORATION ET CARACTERISATION DE
NANOPARTICULES COLLOIDALES
D'APATITES PHOSPHOCALCIQUES
DOPÉES A L'EUROPIUM

Ce Chapitre est dédié à la mise au point d'un protocole ***d'élaboration*** des nanoparticules colloïdales à base d'apatites phosphocalciques nanocristallines, ainsi qu'à la ***caractérisation physico-chimique*** des échantillons préparés.

Dans un premier temps, nous donnerons quelques rappels bibliographiques, complémentaires de ceux du Chapitre 1, mais portant plus spécifiquement sur les phosphate de calcium et les apatites.

Nous aborderons ensuite la partie expérimentale liée à la synthèse et à la caractérisation des échantillons ; puis nous conclurons ce chapitre en résumant les informations obtenues sur les nano-systèmes développés dans ce travail et en proposant un modèle descriptif des nanoparticules hybrides élaborées.

Partie A : Rappel général sur les phosphates de calcium et sur les apatites phosphocalciques

I) Rappels sur les phosphates de calcium

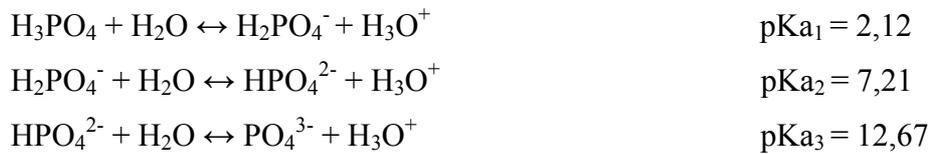
Les phosphates de calcium jouent un rôle important dans divers secteurs d'activité, notamment en pharmacie, en chirurgie, en chromatographie, en catalyse ou encore dans l'industrie des engrais. Ils constituent une famille de composés : les orthophosphates de calcium, qui présentent des compositions chimiques et des structures cristallines très variées. En fonction de leur nature, ils peuvent être obtenus soit par voie humide (précipitation, hydrolyse...) soit par voie sèche à haute température. Le Tableau 3 regroupe les différents orthophosphates de calcium et donne le rapport atomique Ca/P. Ces composés correspondent soit à des phases cristallines, soit à des phases amorphes.

Orthophosphates de calcium	Formule chimique	Acronyme	Ca/P
Phosphate monocalcique anhydre ⁽¹⁾	Ca(H ₂ PO ₄) ₂	MCPA	0,5
Phosphate monocalcique monohydraté ⁽¹⁾	Ca(H ₂ PO ₄) ₂ , H ₂ O	MPCM	0,5
Phosphate dicalcique anhydre (monétite) ⁽¹⁾	CaHPO ₄	DCPA	1,00
Phosphate dicalcique dihydraté (brushite) ⁽¹⁾	CaHPO ₄ , 2H ₂ O	DCPD	1,00
Phosphate octocalcique triclinique ⁽¹⁾	Ca ₈ (PO ₄) ₄ (HPO ₄) ₂ , 5H ₂ O	OCPt	1,33
Phosphate octocalcique apatitique ⁽¹⁾	Ca ₈ (HPO ₄) _{2,5} (PO ₄) _{3,5} (OH) _{0,5}	OCPa	1,33
Phosphate octocalcique amorphe ⁽¹⁾	Ca ₈ (PO ₄) ₄ (HPO ₄) ₂ , nH ₂ O	OCPam	1,33
Phosphate tricalcique α ou β ⁽²⁾	Ca ₃ (PO ₄) ₂	TCP(α, β)	1,50
Phosphate tricalcique apatitique ⁽¹⁾	Ca ₉ (PO ₄) ₅ (HPO ₄)(OH)	TCPa	1,50
Phosphate tricalcique amorphe ⁽¹⁾	Ca ₉ (PO ₄) ₆ , nH ₂ O	ACP	1,50
Hydroxyapatite	Ca ₁₀ (PO ₄) ₆ (OH) ₂	HAP	1,67
Oxyapatite	Ca ₁₀ (PO ₄) ₆ O	OXA	1,67
Phosphate tétracalcique	Ca ₄ (PO ₄) ₂ O	TTCP	2,00

Tableau 3 : Les différents orthophosphates de calcium ⁽¹⁾ obtenus par voie humide, ⁽²⁾ obtenus par voie sèche).

De manière générale, les phosphates de calcium (stœchiométriques), à l'exception du phosphate monocalcique, présentent une solubilité faible dans l'eau [Hagen (1985)]. En tenant compte de cette propriété la plupart de ces composés peuvent être préparés par précipitation en milieu aqueux. La neutralisation successive des différentes acidités de l'acide

orthophosphorique (H_3PO_4) conduit aux différents sels de calcium de cet acide. Les constantes d'acidité de l'acide phosphorique dans l'eau sont les suivantes (à 25°C) :



La Figure 7 donne le domaine de prédominance des espèces chimiques phosphatées en solution aqueuse, en fonction du pH.

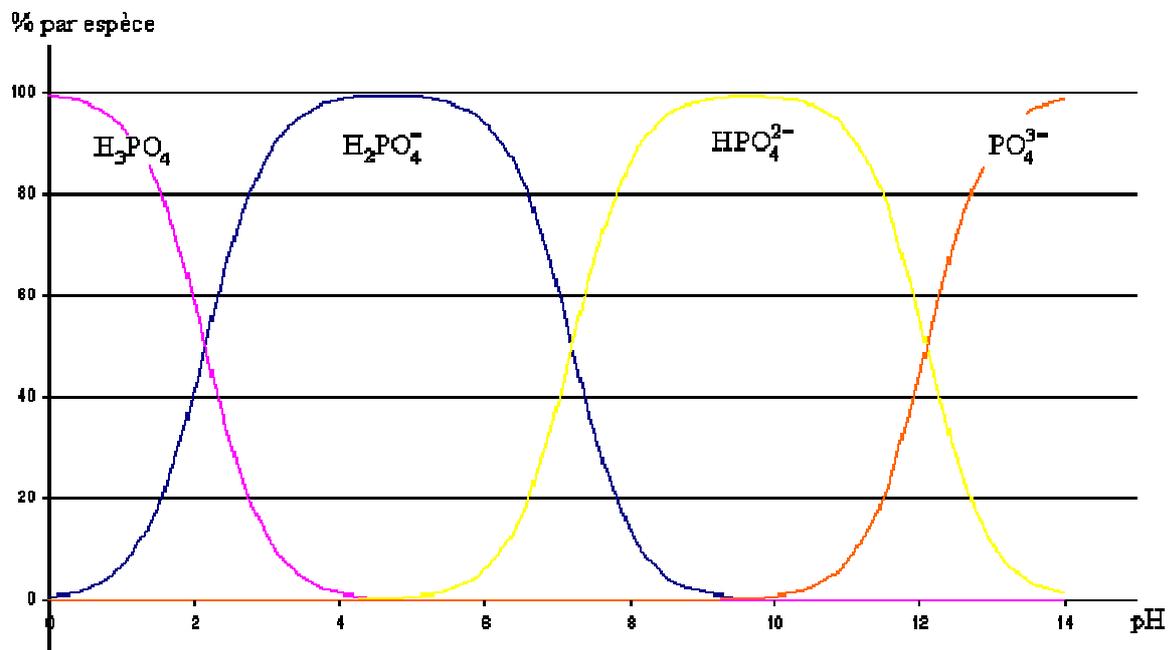


Figure 7 : Prédominance des espèces chimiques phosphatées en solution aqueuse en fonction du pH

Ainsi, la neutralisation de la première, deuxième et troisième acidité de l'acide orthophosphorique permet d'obtenir la plupart des orthophosphates de calcium comme le montre la figure suivante (Figure 8).

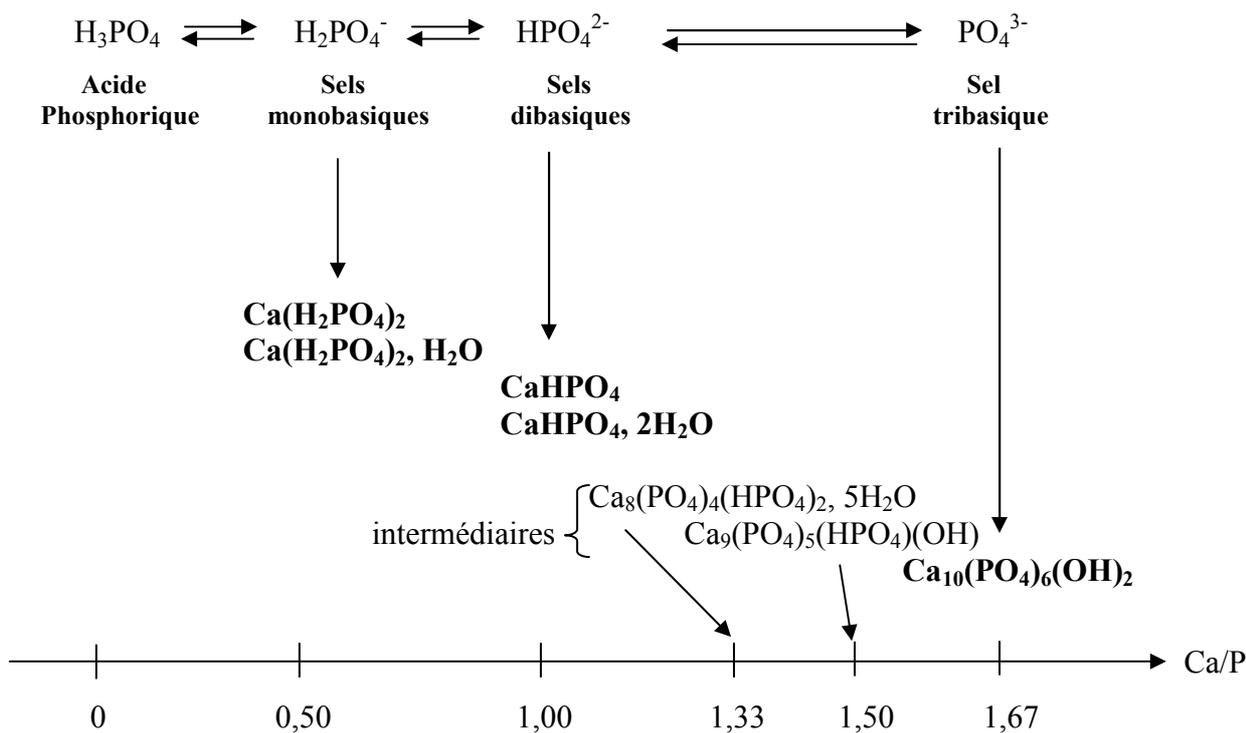


Figure 8 : Les différents orthophosphates de calcium précipités en milieu aqueux

L'hydroxyapatite stœchiométrique, stable thermodynamiquement, constitue un modèle souvent retenu bien que très « simplifié » du minéral osseux (Tableau 4) [Elliot (1994)]. Ce composé n'est pas présent en soi dans les systèmes biologiques ; néanmoins son étude peut s'avérer utile dans la compréhension des mécanismes de croissances et de synthèse de tissu osseux. La synthèse d'apatites non-stœchiométriques nanocristallines est cependant préférable pour appréhender les phénomènes de biominéralisation car ces composés présentent alors des caractéristiques très proches de celles des apatites biologiques d'intérêt (caractère biomimétique).

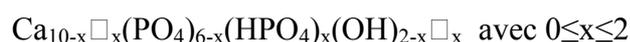
Eléments chimiques (en pourcentage massique)	Email	Dentine	Os	Hydroxyapatite
Ca	37,6	40,3	36,6	39,9
P	18,3	18,6	17,1	18,5
CO ₂	3	4,8	4,8	-
Na	0,7	0,1	1	-
K	0,05	0,07	0,07	-
Mg	0,2	1,1	0,6	-
Sr	0,03	0,04	0,05	-
Cl	0,4	0,27	0,1	-
F	0,01	0,07	0,1	-

Tableau 4 : Composition chimique de différents systèmes biologiques et l'hydroxyapatite stœchiométrique [Elliot (1994)].

Après avoir rappelé les principales caractéristiques des apatites phosphocalciques, ce qui est l'objet de la section ci-dessous, nous ferons une étude comparative des données cristallographiques et spectroscopiques de l'hydroxyapatite stœchiométrique (HAP) et des apatites nanocristallines lacunaires.

II) Rappels préliminaires sur les apatites phosphocalciques

Comme évoqué dans le chapitre précédent, notre choix de nano-système à visée biomédicale s'est porté sur des nanoparticules à base d'apatite phosphocalcique lacunaire biomimétique, proche du minéral osseux, dont la formule chimique globale peut généralement se décrire par la formule suivante :



En effet, il convient de rappeler que les apatites biologiques peuvent être définies, dans la plupart des cas, comme des apatites phosphocalciques carbonatées plus ou moins lacunaires [Phakey et Leonard (1970)], avec de nombreux éléments traces complétant leur formule chimique, et dont la teneur peut varier d'un système biologique à un autre. Par exemple, dans

l'os, les apatites sont lacunaires et carbonatées. Pour un os long, leur formule globale s'écrit [Legros (1986)] :



Au contraire, dans l'émail dentaire les apatites ont une composition chimique beaucoup plus proche de l'hydroxyapatite stœchiométrique [Rey (1995)], répondant à la formule :



Ceci traduit l'adaptabilité des apatites phosphocalciques à leur fonction : le minéral osseux, remodelable et réservoir d'ions, est formé de nanocristaux apatitiques lacunaires présentant une solubilité relativement importante, alors que l'émail dentaire est constitué d'une phase apatitique proche de la stœchiométrie, très bien cristallisée, et très insoluble afin de résister aux agressions externes (pH faible, bactéries...).

III) Rappels généraux sur les apatites

III-1) Structure cristallographique des apatites

Le terme apatite a été donné à un groupe de minéraux, il y a près d'un siècle et demi. Ce nom, vient du grec *απαταν* (décevoir) : le minéral « apatite » était souvent confondu avec d'autres minéraux ayant des propriétés optiques voisines tels que l'aigue-marine, l'améthyste ou l'olivine. De manière générale, les apatites constituent une famille de composés isomorphes de formule générale :



où :

- Me^{2+} représente généralement un cation divalent (Ca^{2+} , Ba^{2+} , Pb^{2+} , Sr^{2+} , ...),
- XO_4^{3-} un anion trivalent (PO_4^{3-} , VO_4^{3-} , AsO_4^{3-}),
- Y^- un anion monovalent (OH^- , Br^- , Cl^- , F^-).

Ces composés cristallisent dans le système hexagonal (groupe d'espace $P6_3/m$) (Figure 9). L'arrangement quasi-compact des tétraèdres XO_4^{3-} constitue le squelette de la structure. D'ailleurs aucune possibilité de lacune n'a été mise en évidence jusqu'à présent en ce qui concerne ces sites XO_4^{3-} . Cet assemblage rigide définit deux types de tunnels, parallèles à l'axe (Oz), dans lesquels sont localisés les ions Me^{2+} . Le premier type (tunnel I), de diamètre proche de 2,5 Å, est occupé par des cations Me^{2+} notés Me_I^{2+} (polyèdres matérialisés en rouge). Ces cations sont au nombre de 4 par maille et sont localisés dans des sites présentant une symétrie C_3 . Le second type (tunnel II), de diamètre plus grand que le précédent (3 à 4,5 Å) contient les 6 autres cations Me^{2+} notés Me_{II}^{2+} . Ils sont situés à la périphérie du tunnel et occupent des sites de symétrie C_s . Les cations Me_{II}^{2+} sont situés aux niveaux $\frac{1}{4}$ et $\frac{3}{4}$ de la maille suivant l'axe z, et forment des triangles équilatéraux alternés autour de l'axe hélicoïdal. Les ions Y^{-1} sont situés le long de cet axe (axe des tunnels II) à une position proche ou égale au barycentre des triangles équilatéraux (en fonction de la nature de l'ion) ; par ailleurs ces ions sont relativement peu « liés » au reste de la structure. Notons que la présence de ces tunnels offre une mobilité remarquable aux ions qu'ils renferment, et autorise des substitutions aisées au sein du réseau [Elliot (1994)]. Ces substitutions sont rappelées dans la partie suivante.

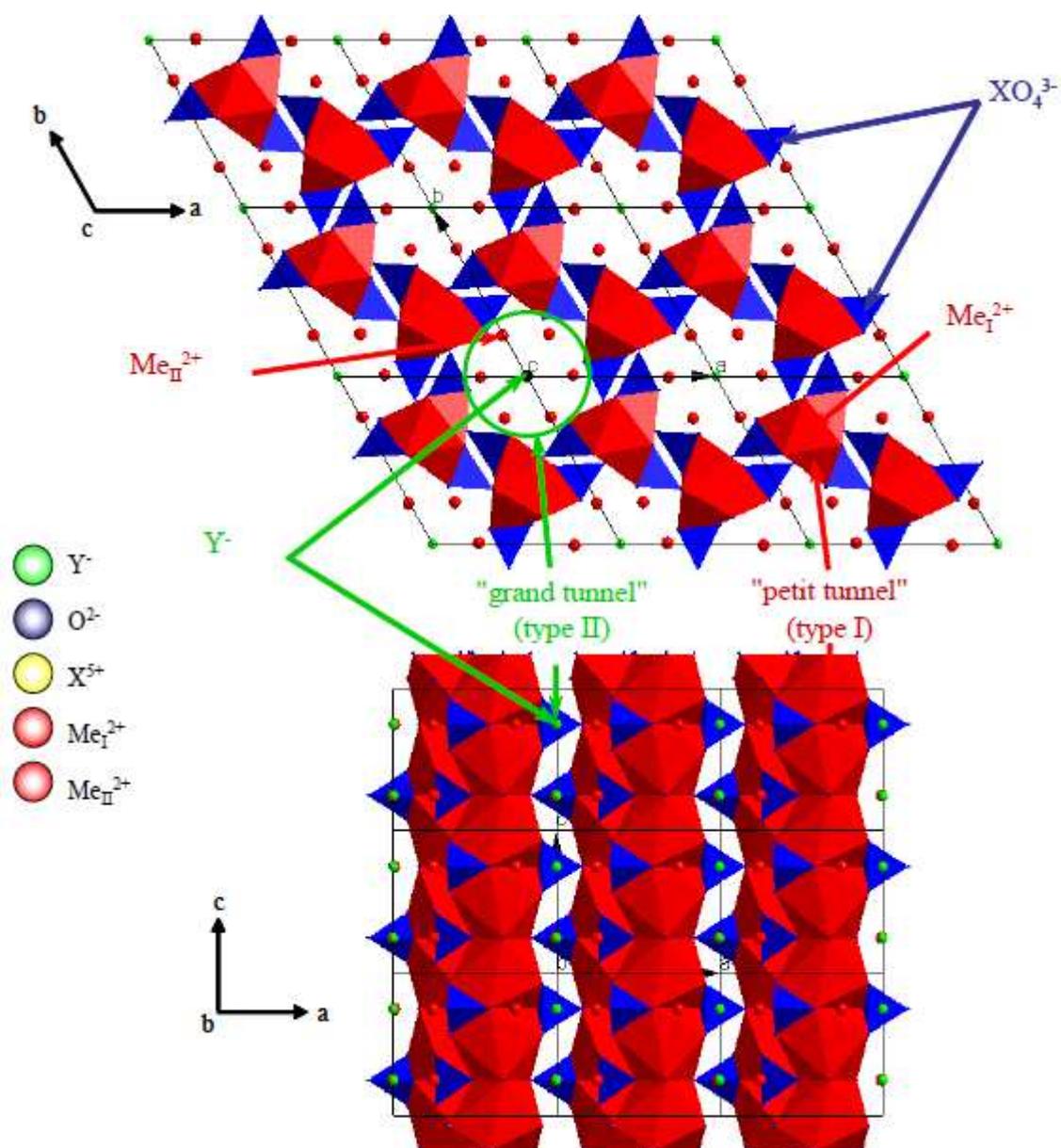


Figure 9 : Structure cristalline de l'apatite (groupe d'espace $P6_3/m$)

III-2) Substitutions ioniques dans le réseau

Le réseau apatitique offre plusieurs types de substitutions, dont voici les principales :

a) Premier type de substitution :

Dans ce type de substitution, certains ions sont substitués par des ions de même charge mais de taille différente (Tableau 5).

Exemples d'ions à substituer	Substitué par
Ca ²⁺ PO ₄ ³⁻ OH ¹⁻	Sr ²⁺ , Cd ²⁺ , Ba ²⁺ , Pb ²⁺ AsO ₄ ³⁻ , VO ₄ ³⁻ , MnO ₄ ³⁻ F ¹⁻ , Cl ¹⁻ , Br ¹⁻

Tableau 5 : Substitutions entre ions de mêmes charges mais de tailles différentes

Notons que ces échanges peuvent conduire à une légère déformation de la maille. Ainsi, la substitution des ions Me²⁺ ou XO₄³⁻ conduit à une variation des paramètres a et c dans le même sens ; alors que la substitution d'ions Y¹⁻ conduit à une variation des paramètres a et c en sens inverse.

b) Deuxième type de substitution :

Dans ce cas, l'échange peut se faire entre des ions de charges différentes (Tableau 6).

Exemples d'ions à substituer	Substitué par
Ca ²⁺ PO ₄ ³⁻ OH ⁻	<ul style="list-style-type: none"> • des cations monovalents : Na⁺, K⁺... • des cations trivalents : Eu³⁺, La³⁺, Al³⁺... • des lacunes : □ • des groupements bivalents : CO₃²⁻, HPO₄²⁻, SO₄²⁻... • des groupement tétravalents : SiO₄⁴⁻, GeO₄⁴⁻... • des ions bivalents : CO₃²⁻, O²⁻... • des lacunes : □

Tableau 6 : Substitutions entre ions de charges différentes et/ou de tailles différentes

Ce type de substitution nécessite une compensation de charges qui peut être réalisée par une substitution couplée et/ou par création de lacune(s). Concernant la substitution de certains ions Ca^{2+} par des ions trivalents de terres rares, tels que Eu^{3+} qui nous intéressent ici, plusieurs types de mécanismes de compensation de charges peuvent être envisagés. Cette question sera reprise en détail ultérieurement dans ce chapitre.

IV) Etude comparative entre l'HAP et les apatites nanocristallines phosphocalciques

IV-1) L'hydroxyapatite

- **Formule chimique :**

L'hydroxyapatite stœchiométrique a pour formule chimique :



- **Structure cristallographique :**

L'HAP cristallise dans le système hexagonal (groupe spatial $P6_3/m$) avec les paramètres cristallographiques suivants [Kay et al. (1964)] (JCPDS n°9-432) :

$$a = b = 9,418 \text{ \AA} \quad c = 6,884 \text{ \AA} \quad \alpha = \gamma = 90^\circ, \beta = 120^\circ$$

La maille cristalline contient un motif $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$. Sa structure peut être décrite ici en considérant un empilement hexagonal de groupements PO_4^{3-} . Comme nous le mentionnions précédemment dans le cas général des composés de type apatites, dans le cas plus spécifique des apatites phosphocalciques qui nous intéresse ici, ce sont ces ions phosphates qui composent le « squelette » du réseau cristallin, et qui délimitent alors les deux types de tunnels parallèles à l'axe (Oz) dont nous mentionnions déjà l'existence précédemment [Young (1973)]. Dans le cas de telles apatites phosphocalciques, en particulier de l'HAP stœchiométrique, la Figure 10 reporte alors une représentation de la structure sous la forme d'une projection sur le plan de base (001).

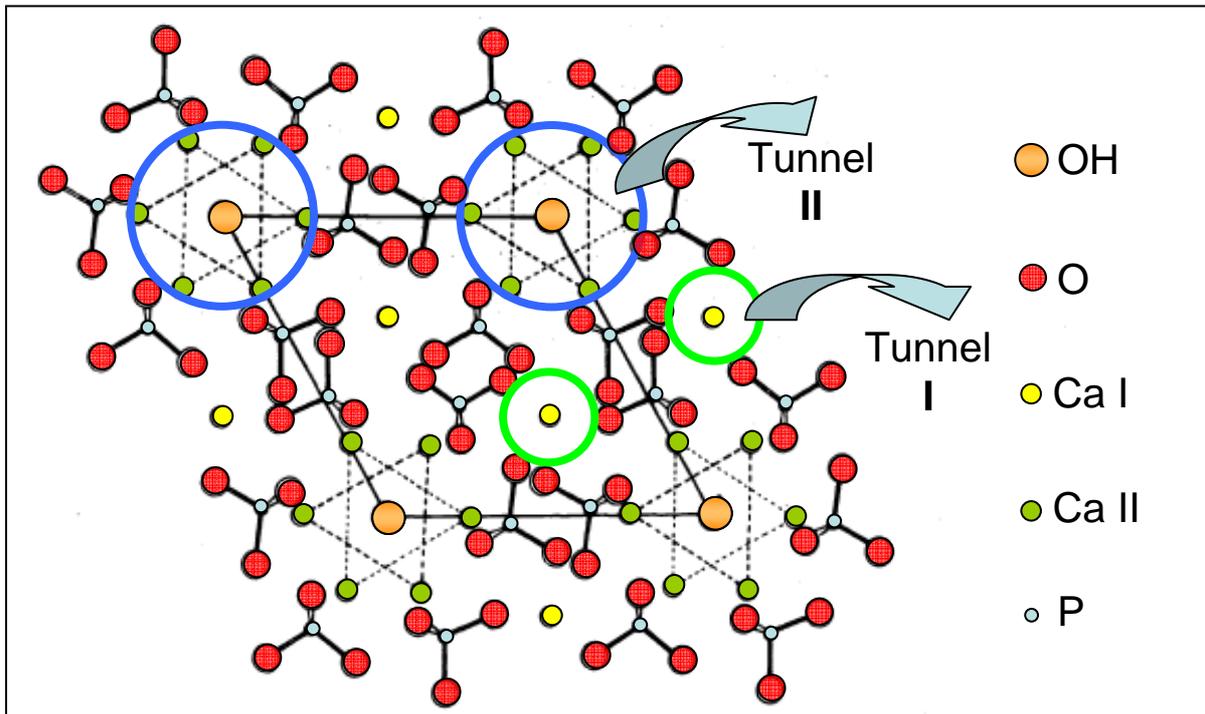


Figure 10 : Projection sur le plan de base (001) de la maille HAP [Young (1973)]

Le premier type de tunnel (tunnel I), présentant ici un diamètre de 2Å, coïncide avec l'axe ternaire de la structure. Il est entouré par 6 groupements PO_4^{3-} et occupé par des ions calcium, notés Ca I. Chacun de ces tunnels I contiennent 2 ions Ca I à la côte $z = 0$ et la côte $z = 1/2$.

Le second type de tunnel (tunnel II), de diamètre 3Å et dont l'axe correspond à l'axe sénaire hélicoïdal du réseau, est formé par 6 atomes d'oxygènes des groupements phosphates et 6 ions de calcium, notés Ca II. Trois ions Ca II sont à la côte $z = 1/4$ et les trois autres restant sont à la côte $z = 3/4$. Chacun de ces tunnels II sont également occupés de façon axiale par 2 ions OH^- situés à la côte $z = 1/4$ et la côte $z = 3/4$.

Ces deux types de tunnels confèrent ainsi à l'HAP des propriétés d'échangeurs d'ions à hautes températures et d'accepteurs de petites molécules (O_2 , H_2O , glycine...) [Montrejaud et al. (1973) ; Rey et al. (1978), Rey (1984)].

- **Diagramme de diffraction de rayons X de l'HAP :**

Le diagramme de diffraction de rayons X de l'HAP (Figure 5) présente des raies fines caractéristiques d'un composé très bien cristallisé.

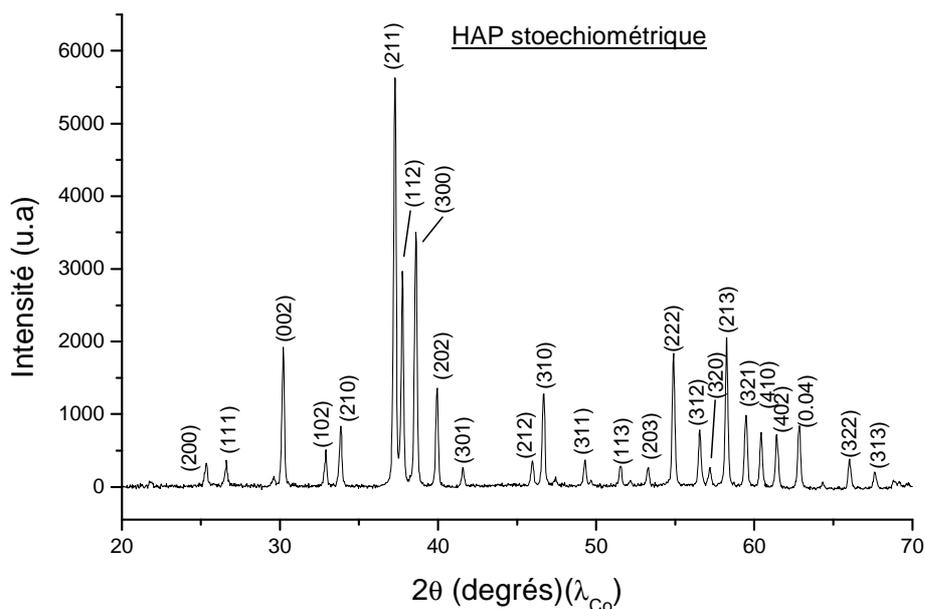


Figure 11 : Diagramme de diffraction de rayons X de l'HAP

- **Spectre FTIR de l'HAP :**

Le spectre IR de l'HAP présente des bandes fines, ce qui peut être relié au caractère très bien cristallisé de ce composé (confirmé par DRX). Il est reporté sur la Figure 12 ; les positions, intensités et attributions des bandes caractéristiques sont indiquées dans le Tableau 7:

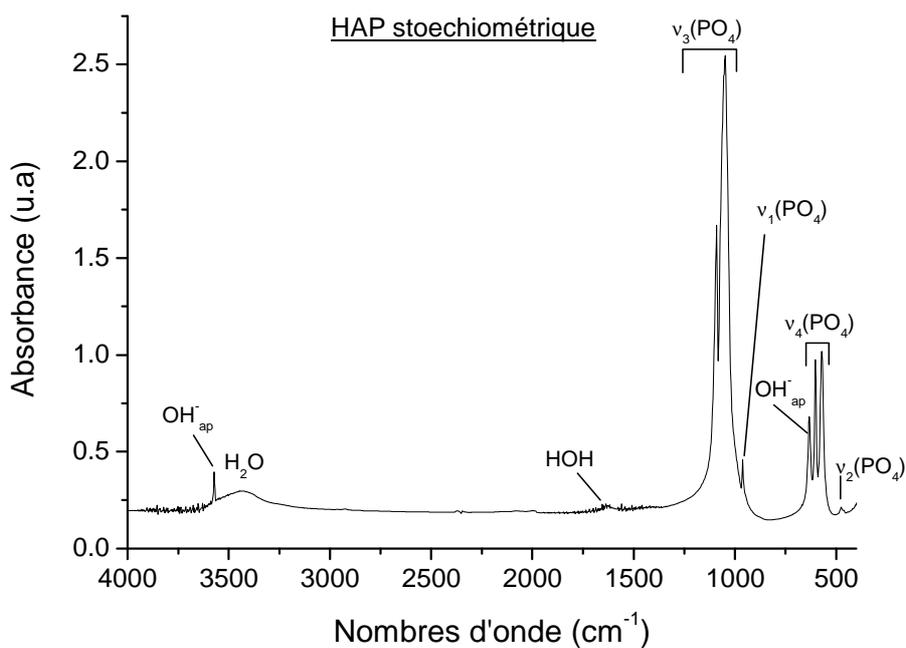


Figure 12 : Spectre FTIR de l'HAP

Nombre d'onde (cm ⁻¹)	Attribution	Intensité
3572	(v _s) OH ⁻	Moyenne
1089	(v ₃) PO ₄ ³⁻	Forte
1051	(v ₃) PO ₄ ³⁻	Très forte
961	(v ₁) PO ₄ ³⁻	Faible
631	OH ⁻	Faible
601	(v ₄) PO ₄ ³⁻	Moyenne
570	(v ₄) PO ₄ ³⁻	Moyenne
474	(v ₂) PO ₄ ³⁻	Faible
464	(v ₂) PO ₄ ³⁻	Faible

Tableau 7 : Positions et attributions des bandes FTIR de l'HAP

- **Taille et morphologie des cristallites :**

L'HAP peut être décrite par des cristaux de taille micronique et de formes variables (aiguilles, plaquettes...) qui dépendent des conditions (température, pH...) de synthèse et de post-traitement (calcination...).

- **Voies d'élaboration :**

L'HAP peut être synthétisée par de nombreuses voies d'élaboration. L'une des méthodes la plus utilisées est la double décomposition du nitrate de calcium Ca (NO₃)₂.4H₂O et du dihydrogénophosphate d'ammonium (NH₄) H₂PO₄ [Hayek et al. (1963) ; Trombe et al. (1972) ; Arends et al. (1987)]. Celle-ci a lieu en milieu aqueux et alcalin (11 ≤ pH ≤ 12). Cette double décomposition suit l'équation chimique suivante :



De nombreux travaux ont été consacrés à l'étude de l'influence du temps de maturation et de la température. Liu et al. (2001) ont ainsi montré que le temps de maturation nécessaire à l'obtention d'une HAP diminue avec l'augmentation de la température.

Cette méthode par double décomposition produit un gel de phosphate de calcium peu cristallisé qui est ensuite lavé puis séché ou lyophilisé. L'HAP bien cristallisée est ensuite obtenue après traitement thermique à 1000°C.

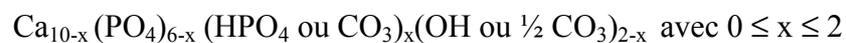
- **Réactivité chimique :**

L'HAP présente une grande stabilité thermodynamique. Son produit de solubilité est le plus faible du système $\text{Ca}(\text{OH})_2\text{-H}_3\text{PO}_4$, avec $K_s \cong 10^{-117} \text{ (mol/l)}^9$ à 25°C [Mc Dowell et al. (1977)]. Sa décomposition thermique n'intervient qu'à des températures élevées (1300°C) en l'absence de vapeur d'eau. Du fait de cette très grande stabilité thermique, des céramiques à base d'HAP peuvent être élaborées. Ce composé présente en outre d'excellentes propriétés de biocompatibilité et une certaine bioactivité (elle est ostéoconductrice c'est-à-dire qu'elle facilite le développement de tissu osseux après implantation en site osseux). De ce fait, l'HAP trouve de nombreuses applications dans le domaine biomédical, tout particulièrement en chirurgie osseuse (substituts osseux, recouvrement de prothèses).

IV-2) Les apatites phosphocalciques nanocristallines

- **Formule chimique :**

Ces composés peuvent généralement être décrits par la formule chimique globale :



Cette formule chimique souligne la différence de composition avec l'HAP. En effet on constate la présence de lacunes en sites Ca et OH.

- **Structure cristallographique :**

Les différentes recherches menées sur l'élaboration des ces nanocristaux ont permis de déceler la présence d'ions (calcium, phosphates, carbonates...) localisés dans des environnements chimiques ne correspondant pas aux sites cristallographiques habituellement trouvés dans l'hydroxyapatite. Ces environnements sont nommés « environnements non-apatitiques ». Divers travaux, en particulier menés lors de la dernière décade, ont montré que ces ions « non-apatitiques » étaient principalement localisés dans une couche hydratée en surface des nanocristaux ; au contraire, le cœur des nanocristaux est constitué d'ions présents dans des environnements apatitiques (notons cependant qu'une non-stœchiométrie est

généralement rencontrée dans ce cœur apatitique) (Figure 13) [Eichert et al. (2007)]. C'est à partir de cette couche hydratée non-apatitique, contenant principalement des ions Ca^{2+} , HPO_4^{3-} et CO_3^{2-} et des molécules d'eau, que le cœur apatitique du nanocristal se développerait au cours du processus de « maturation » c'est-à-dire de vieillissement en solution. Cette couche disparaîtrait au fur et à mesure que l'état de maturation du cristal serait plus élevé [Hina (1996)].

Dans ce contexte, chaque nanocristal peut être décrit par un cœur apatitique entouré d'une couche superficielle hydratée dont la structure et la composition reste encore à l'étude (Figure 13 (a)). A cette couche hydratée sont donc associés des ions minéraux « non-apatitiques » (Ca^{2+} , HPO_4^{3-} et CO_3^{2-}). Aisément mobilisables, ces ions minéraux sont soupçonnés de participer aux échanges ioniques *in vivo* (rôle dans l'homéostasie) et d'être responsables de la réactivité de surface des nanocristaux d'apatites biomimétiques (Figure 13 (b)) [Hina (1996)].

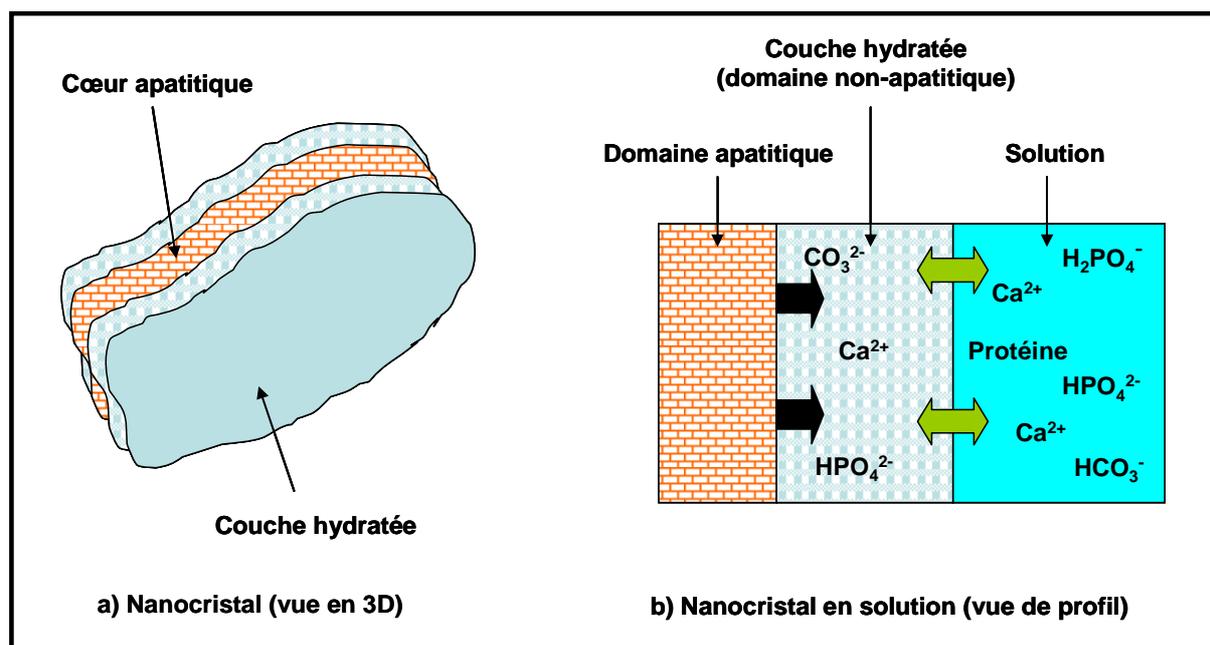


Figure 13 : Description schématique d'un nanocristal d'apatite phosphocalcique (a), en interaction avec le milieu biologique (b) [Eichert et al. (2007)]

- **Diagramme de diffraction de rayons X de nanocristaux d'apatite phosphocalcique :**

Le diagramme de diffraction de rayons X obtenu ici (Figure 8) est composé de raies larges caractéristique d'un composé de faible état de cristallinité.

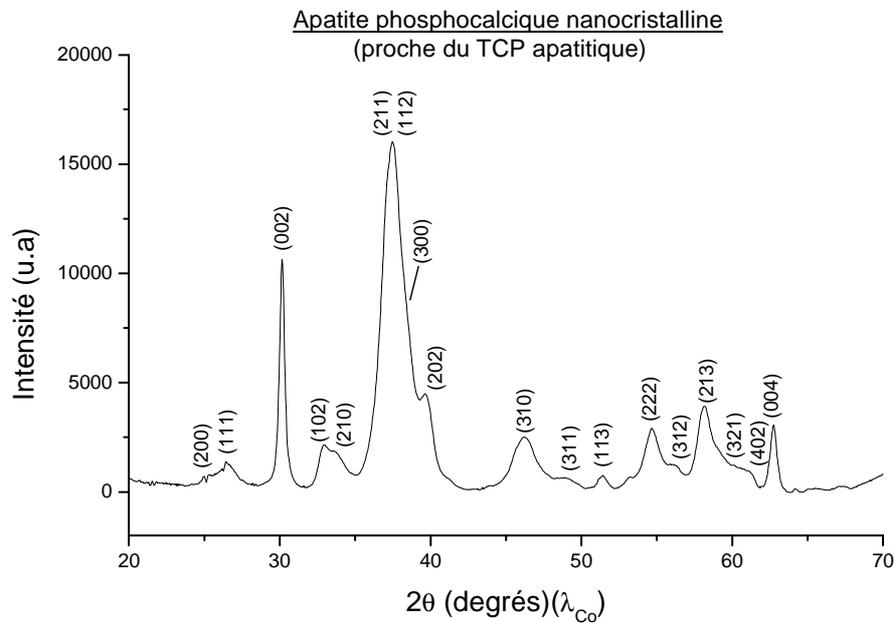


Figure 14 : Diagramme de diffraction de rayons X pour une apatite nanocristalline (proche du phosphate tricalcique apatitique, TCP ap)

- **Spectre FTIR pour une apatite phosphocalcique carbonatée :**

Afin de visualiser également les bandes IR relatives des ions carbonates, nous avons choisi de reporter ici l'exemple d'un spectre FTIR d'une apatite nanocristalline carbonatée (taux de carbonatation ~ 6% massique). Le spectre est reporté sur la Figure 15.

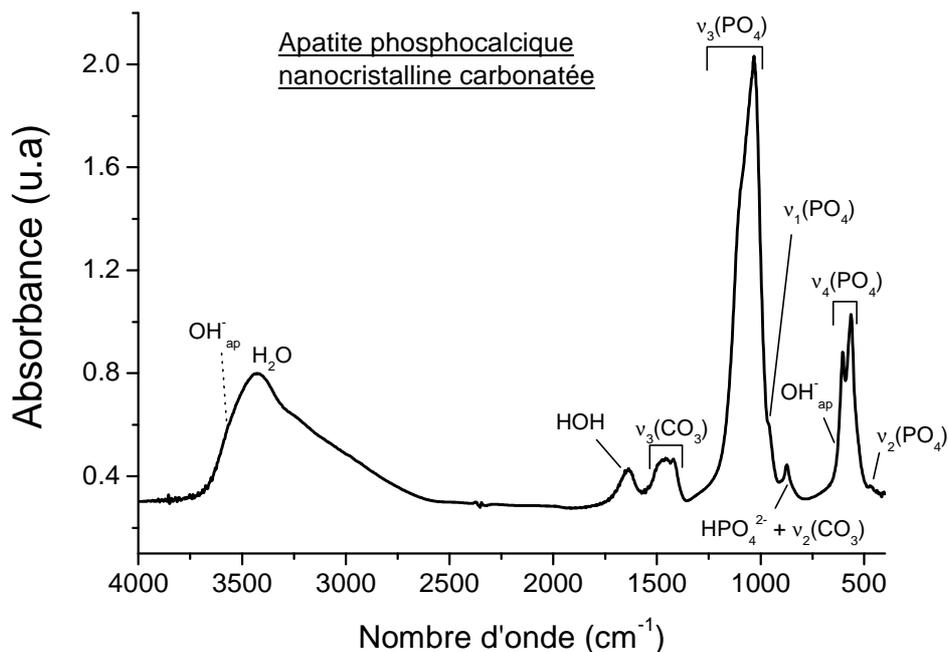


Figure 15 : Spectre IR d'une apatite nanocristalline carbonatée (6% massique CO_3)

Ce spectre IR présente des bandes plus larges que celles de l'HAP, correspondant à un composé de plus faible cristallinité (confirmé par DRX). La présence d'ions HPO_4^{2-} apatitiques observés à 875 cm^{-1} correspond ici à l'hydrolyse interne de certains ions PO_4^{3-} [Heughebaert et al. 1982].

De plus, on observe des bandes additionnelles qui ne peuvent être attribuées à des groupements phosphate présents dans un environnement apatitique. Ces bandes additionnelles sont très bien observées dans le domaine de vibration $\nu_4\text{ PO}_4^{3-}$ où l'on observe deux épaulements à 533 et 617 cm^{-1} , qui ont respectivement été attribués à PO_4^{3-} et HPO_4^{2-} en environnement non-apatitique (Figure 16) (leurs intensités sont rappelées dans le Tableau 8). Pour HPO_4^{2-} cette attribution peut également être confirmée par dosages chimiques [Combes et al. 2001]. Il est également intéressant de noter que la proportion de ces groupements non-apatitiques diminue au cours de la maturation en solution. Ces diminutions semblent être liées au développement progressif du cœur apatitique au détriment de la couche hydratée. Une augmentation au cours de la maturation est également observée pour la teneur en ions OH^- [Eichert 2001].

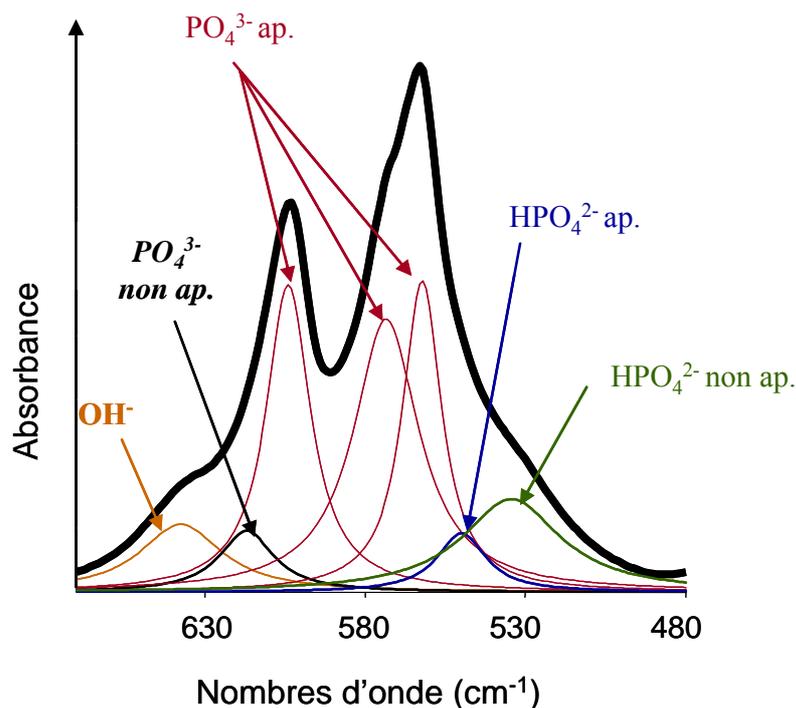


Figure 16 : Décomposition (FTIR) du domaine de vibration autour de la ν_4 PO_4^{3-}

Nombre d'onde (cm^{-1})	Attribution	Intensité
632	OH^-	Faible
617	PO_4^{3-} non-apatitique	Epaulement
603	$(\nu_4) \text{PO}_4^{3-}$	Moyenne
575	$(\nu_4) \text{PO}_4^{3-}$	Moyenne
562	$(\nu_4) \text{PO}_4^{3-}$	Moyenne
551	HPO_4^{2-}	Epaulement
533	HPO_4^{2-} non-apatitique	Epaulement

Tableau 8 : Positions, attributions des bandes FTIR autour du domaine de la ν_4 PO_4^{3-}

Notons que dans le cas d'apatites carbonatées, en marge des bandes habituellement observées par FTIR, une bande additionnelle est également observée dans la zone ν_2 des ions CO_3^{2-} , à 866 cm^{-1} , et cette bande a été attribuée dans la littérature à des ions CO_3^{2-} localisés dans des environnements non-apatitiques.

Il est également intéressant de rappeler que des analyses FTIR menées sur des gels d'apatites nanocristallines peu maturés (caractérisation à l'état humide) ont montré des similitudes avec l'OCP (triclinique). Cette analogie spectrale peut en particulier être visualisée au niveau du mode de vibration ν_3 des ions PO_4^{3-} . En effet on y retrouve la plupart des bandes de l'OCP à l'exception des bandes à 917 et 1295 cm^{-1} correspondant à HPO_4^{2-} .

Cette relative ressemblance des spectres IR entre l'OCP et les nanocristaux humides peu maturés va dans le sens du modèle de couche hydratée proposé Figure 13. En effet la structure de l'OCP triclinique peut être décrite comme une succession de couches apatitiques et de couches hydratées, ces dernières contenant des ions Ca^{2+} , tous les ions HPO_4^{2-} de l'OCP et des molécules d'eau [Elliot (1994)]. Cependant, dans le cas des apatites nanocristallines, la couche hydratée serait directement exposée en surface du cristal et non intercalée entre deux couches apatitiques.

Pour terminer ce rappel concernant le spectre IR des d'apatites nanocristallines, la bande d'absorption large et intense dans le domaine $3700 - 2700 \text{ cm}^{-1}$ ainsi que celle à 1640 cm^{-1} témoignent de la présence d'eau (eau adsorbée en surface et eau « structurale » de la couche hydratée). Enfin les groupements OH^- apatitiques se caractérisent par deux bandes vers 3572 et 632 cm^{-1} (déjà évoquée précédemment). Notons que la bande à 3572 cm^{-1} est difficilement observable par spectroscopie FTIR pour des apatites faiblement cristallisées et riches en eau [Eichert 2001]. Dans ce cas, la spectroscopie Raman est alors une technique plus adaptée. De plus, tout comme pour la bande à 630 cm^{-1} évoquée précédemment, son intensité augmente avec le degré de maturation de l'apatite, témoignant de l'augmentation de la teneur en ions OH^- .

- **Taille et morphologie des cristallites :**

Comme indiqué précédemment, les apatites biomimétiques sont constituées de cristaux de tailles nanométriques (typiquement 15 à 25 nm en longueur et 6 à 9 nm en largeur). Elles se présentent généralement sous forme de plaquettes allongées le long de l'axe (Oz), et de très faible épaisseur.

- **Voie d'élaboration :**

La voie d'élaboration habituelle pour ces nanocristaux est également la double décomposition de nitrate de calcium $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ et d'un sel de phosphate, par exemple le dihydrogénophosphate d'ammonium $(\text{NH}_4)\text{H}_2\text{PO}_4$. Celle-ci généralement a lieu en milieu aqueux et à pH physiologique assuré par une concentration en ion phosphate très supérieure à la quantité stœchiométrique (et jouant donc un effet tampon lié au pKa du couple $\text{H}_2\text{PO}_4^- / \text{HPO}_4^{2-}$). Le temps de maturation est déterminé en fonction de la (non-)stœchiométrie souhaitée [Eichert 2001]. Notons cependant qu'un pH alcalin et/ou une température de synthèse plus élevée que l'ambiante permettent de se rapprocher de la stœchiométrie.

- **Réactivité chimique :**

En comparaison avec l'HAP, les apatites phosphocalciques nanocristallines sont nettement plus réactives, ce qui peut être mis en évidence (et mis à profit) par des échanges ioniques rapides de surface ou des phénomènes d'adsorption de molécules organiques. De plus, ces composés sont lacunaires, leur structure est donc moins cohésive et moins stable que l'HAP, ce qui conduit à une plus grande solubilité [Eichert et al. (2007)].

Dans le cadre de notre travail, les nanocristaux d'apatite sont appelés à constituer la base des systèmes à visée diagnostique/thérapeutique envisagés. Par conséquent, ils doivent présenter un état de maturité (au sens physico-chimique que nous avons déjà utilisé précédemment) suffisamment élevé afin de présenter une relative stabilité thermodynamique et éviter ainsi que les caractéristiques physico-chimiques de ces systèmes n'évoluent trop rapidement au cours de leur contact prolongé avec le milieu biologique. Dans ce contexte, les protocoles de synthèse envisagés ont fait appel à une précipitation d'apatite à une température supérieure à la température ambiante, jusqu'à 100°C ; une augmentation de température étant un des moyens d'augmenter l'état de maturation de la phase apatitique. Dans le même ordre d'idée, nous avons choisi de travailler ici à un pH alcalin, le pH étant un autre paramètre dont l'augmentation favorise l'obtention d'une phase apatitique plus proche de la stœchiométrie et donc plus stable.

Par ailleurs, la forte réactivité chimique des apatites nanocristallines doit être « contrôlée » afin de limiter l'agglomération entre nanocristaux adjacents (qui mènerait à des particules microniques rendant leur internalisation très difficile par les cellules tumorales) et ainsi obtenir des nanoparticules de taille moyenne inférieure à, typiquement, 100 nm. La voie envisagée pour contrôler la taille moyenne des nanoparticules d'apatite (une nanoparticule étant un petit agglomérat de nanocristaux) a consisté à greffer, en surface de l'apatite, une molécule organique biocompatible et jouant un rôle de type tensio-actif.

Ces choix se sont notamment basés sur une étude préalablement réalisée au sien du laboratoire (avec T supérieure à l'ambiante, pH alcalin) [Lebugle et al. (2005) ; Chane-ching et al. (2007)] et ayant montré la possibilité d'obtenir des nanoparticules à base apatitique en utilisant le 2-aminoéthylphosphate (AEP) comme « agent dispersant ». En effet cette molécule possède plusieurs avantages :

- elle est parfaitement biocompatible car il s'agit de la tête polaire d'un phospholipide présent à la surface de membranes cellulaires (la phosphatidyléthanolamine),

- la présence d'un groupement phosphate lui permet un fort effet complexant avec les ions Ca^{2+} présents à la surface des nanocristaux,
- la présence d'un groupement ammonium NH_3^+ aux pH considérés, permet une répulsion électrostatique.

Ce travail précédent a permis d'obtenir une suspension colloïdale de nanocristaux d'apatite phosphocalcique. Le principe de la synthèse consistait alors à faire précipiter l'apatite très rapidement, en milieu aqueux, en présence d'AEP (sous la forme d'ions AEP^-) et à pH alcalin (pH 9), à partir d'acide phosphorique et de chaux fraîchement préparée (afin de contrôler le nombre exact de moles de calcium). Les trois réactifs étaient alors introduits dans les proportions 3 : 3 : 1 (Ca : AEP : P), et la suspension colloïdale était obtenue après « vieillissement » du mélange réactionnel en étuve à 80°C pendant 16 heures. Dans ces suspensions, la phase apatitique s'est avérée présenter une composition chimique très proche de celle du TCP apatitique, $\text{Ca}_9(\text{PO}_4)_5(\text{HPO}_4)(\text{OH})$; par ailleurs, des bandes FTIR caractéristiques de complexes alliant Ca et AEP ont été observés, probablement mettant en jeu des ions Ca^{2+} localisés en surface des cristaux d'apatite.

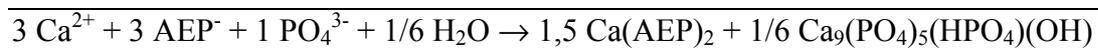
Si l'utilisation d'AEP comme agent stabilisant (permettant de réduire la taille moyenne des agglomérats d'apatite) s'est avérée concluante à l'issue de cette étude préliminaire, le protocole expérimental employé à ce stade (manipulation d'acide phosphorique concentré et de chaux fraîchement calcinée) *posait potentiellement des difficultés pratiques en vue d'une possible industrialisation de tels nano-systèmes.*

Ce constat a donc motivé la recherche de protocole(s) alternatif(s) visant à préparer cette fois des colloïdes à base de nanocristaux apatitiques mais **partant de réactifs aisément manipulables (faible dangerosité, facilité de stockage, faible toxicité...)**. Par ailleurs, une meilleure compréhension de l'interaction entre molécules d'AEP et nanocristaux d'apatite était nécessaire afin de mieux appréhender le mode de contrôle de la taille des nanoparticules à base apatitique ; enfin l'effet de divers paramètres expérimentaux sur les caractéristiques des suspensions (et des nanoparticules elles-mêmes) se devait d'être évalué en détail.

Ces différents points ont représenté la base de ce travail de thèse visant à systématiser l'étude de la préparation et de la caractérisation de suspensions colloïdales de nanoparticules hybrides constituée d'apatite biomimétique et d'AEP.

A l'aube de ce travail de thèse, la possibilité de préparer à 80°C de tels colloïdes (exempts d'euporium) à partir de sels de calcium (nitrate) et de phosphate (hydrogénophosphate d'ammonium) et d'AEP a été montrée dans le cadre d'un stage de

licence professionnelle (Amal Bouladjine). Dans ce travail, que j'ai assisté en début de thèse, les proportions 3 : 3 : 1 pour Ca : AEP : P préalablement employées par Lebugle et Chane-Ching [Lebugle et al. (2005) ; Chane-ching et al. (2007)] ont généralement été conservées [Bouladjine et al. (2009)]. Ces proportions correspondent en effet à la quantité « théorique » d'ions Ca^{2+} permettant *à la fois* de former du TCP apatitique et d'interagir avec les molécules monovalentes d'AEP (sous la forme d'ions AEP^-), ce qui peut se traduire schématiquement par le bilan suivant (en considérant ici la formation de complexes de type $\text{Ca}(\text{AEP})_2$) :



En d'autres termes, ceci traduit le « partage » théorique des ions calcium entre les ions phosphates (pour former de l'apatite) et les ions AEP^- .

Ce travail de stage d'Amal Bouladjine a servi de **point de départ** pour la partie de cette thèse relative à l'élaboration de suspensions colloïdales, dont il est question dans la section suivante.

Partie B : Protocole de synthèse de suspensions colloïdales hybrides à base de nanoparticules d'apatites biomimétiques dopées à l'euporium Eu^{3+}

Notre démarche expérimentale a consistée dans un premier temps à synthétiser une apatite phosphocalcique non colloïdale et non dopée qui nous a servi comme échantillon de référence. En utilisant ce même protocole de synthèse, nous avons par la suite préparé une apatite phosphocalcique analogue mais en présence d'ions euporium Eu^{3+} afin de vérifier l'incorporation éventuelle de Eu^{3+} dans la matrice minérale.

I) Synthèse et caractérisations d'une apatite phosphocalcique de référence

I-1) Protocole de synthèse d'une apatite phosphocalcique de référence

La synthèse de l'échantillon de référence a été conduite dans les mêmes conditions que celles décrites par A. Bouladjine [Bouladjine et al. (2009)] pour la préparation de colloïdes, sauf que dans le cas présent servant de « référence non colloïdale » nous avons retiré du protocole l'AEP pour ne pas former de colloïdes. Cette synthèse a consistée à co-précipiter rapidement en milieu aqueux et à pH 9 dans les proportions molaires 3 : 1 pour Ca : P, des sels de calcium et de phosphate. Plus précisément, une solution A a été constituée à partir de 4,87 mmol de nitrate de calcium $[\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}]$, dissous dans 12,5 ml d'eau désionisée. Une solution B a été préparée à partir de 1,62 mmol de di-ammonium hydrogénophosphate $[(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4]$ dissous dans 12,5 ml d'eau désionisée. Après dissolution complète des sels de départ, le pH des deux solutions A et B obtenues a été réajusté à 9 avec une solution d'ammoniaque concentré $[\text{NH}_4\text{OH}]$. Sous agitation magnétique la solution A a ensuite été rapidement versée dans la solution B. Il se forme instantanément un précipité blanc à partir du mélange réactionnel que nous avons appelé solution C. Son pH est également réajusté à 9 avec une solution de NH_4OH . Après 15 minutes d'agitation magnétique la solution C est « vieillie » ou « maturée » à 80°C pendant 16 heures dans une étuve. Une fois cette étape de maturation en étuve terminée, le précipité est lavé 6 fois par centrifugation à l'eau désionisée puis séché pendant 3 jours par procédé de lyophilisation. Après séchage le précipité blanc est récupéré sous forme de poudre pour être caractérisé par diffraction des rayons X,

spectroscopie IR et microscopie électronique en transmission. Les résultats sont présentés ci-dessous.

I-2) Diffraction des rayons X sur apatite phosphocalcique de référence :

Le diagramme de diffraction de rayons X (Figure 17) relatif à cette apatite de référence (après lyophilisation) reporte la présence de raies bien définies, caractéristiques d'une phase apatitique phosphocalcique présentant un haut degré de cristallinité.

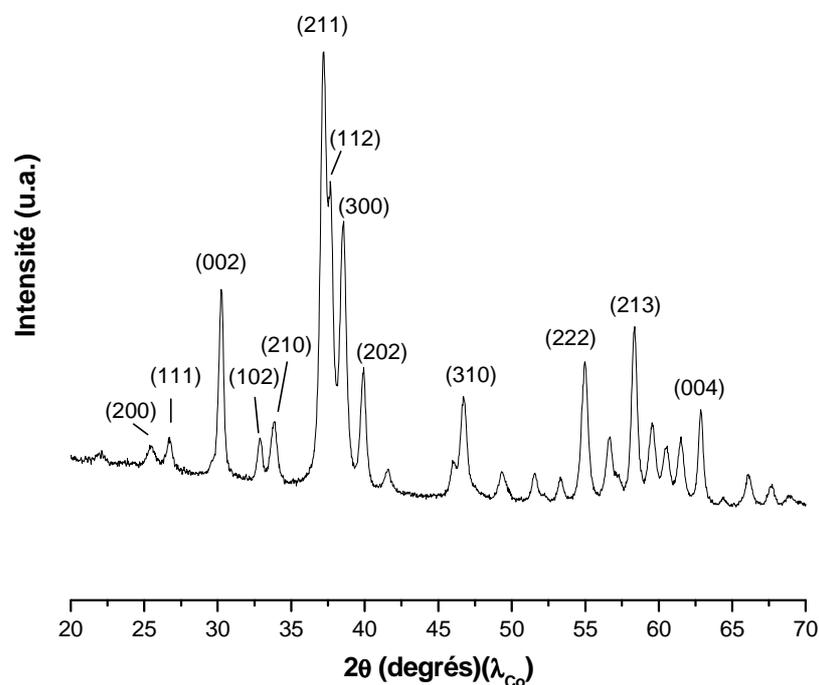


Figure 17 : Diagramme de diffraction des rayons X d'une apatite phosphocalcique de référence non colloïdale, non dopée à l'euprasiolite, préparée à 80°C (seuls les pics les plus intenses ont été indexés ici)

La largeur des raies et leur dissymétrie ne permettent pas une détermination précise des dimensions de la maille. Cependant comme l'a suggéré Glimcher [Glimcher 1981] pour des apatites faiblement cristallisées, la mesure de la largeur à mi-hauteur des raies (002) et (310) permet d'accéder, en première approximation (et en négligeant les micro-contraintes) à la taille moyenne apparente des cristallites grâce à la formule de Scherrer [Scherrer (1918)] rappelée ci-dessous :

$$L_{hkl} = \frac{0,94 \times \lambda}{\cos \theta \times \sqrt{\Delta_r^2 - \Delta_0^2}}$$

où :

- 0,94 est la constante de Scherrer
- $L(\text{Å})$ est la taille apparente dans la direction perpendiculaire au plan de la diffraction (hkl)
- $\lambda (\text{Å})$ est la longueur d'onde du rayonnement X ($\lambda_{\text{Cok}\alpha} = 1,78892 \text{ Å}$)
- θ est l'angle de diffraction correspondant à la raie (hkl) considérée
- Δ_r (rad) est la largeur à mi-hauteur de la raie (hkl) de diffraction
- Δ_0 (rad) est la largeur à mi-hauteur de la même raie de diffraction d'une hydroxyapatite stœchiométrique bien cristallisée. Elle a été déterminée sur une HAP calcinée à 900°C. Elle est égale à 0,00128 rad pour la raie (002) et 0,00140 rad pour la raie (310)

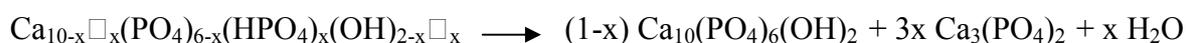
Pour la raie (002) la taille apparente est la longueur de la cristallite suivant l'axe (Oz). En revanche pour la raie (310) la taille apparente correspond à un rapport moyen entre son épaisseur et sa largeur. Le Tableau 9 reporte les dimensions apparentes des cristallites de l'apatite phosphocalcique de référence. Ces valeurs sont du domaine nanométrique ; notons cependant que, en absence d'inhibiteurs de croissance cristalline, les particules (agglomérats) que forme une telle apatite sont de taille micronique témoignant d'un fort état d'agglomération des cristaux.

L (002) (nm)	L (310) (nm)
32	22

Tableau 9 : Dimensions apparentes des cristallites pour une apatite phosphocalcique de référence non colloïdale, non dopée, préparée à 80°C

Nous avons également évalué par diffraction des rayons X le rapport atomique Ca/P de l'apatite phosphocalcique de référence. Pour cela nous avons calciné à 1000°C pendant 15

heures une partie de la poudre obtenue. En effet dans ces conditions l'apatite phosphocalcique se décompose en un mélange d' HAP et de β TCP suivant la réaction :



Le rapport des intensités des raies les plus intenses de l'HAP (vers 37°) et du β TCP (vers $36,10^\circ$) permet de retrouver, en première approximation, la valeur de « x » suivant l'équation :

$$\frac{1-x}{3x} \propto \frac{I(\text{HAP})}{I(\beta\text{TCP})}$$

Ainsi, dans le cas présent, on constate que le diagramme de diffraction des rayons X après calcination (Figure 18) ne présente pas de raie à $36,10^\circ$ caractéristique du β TCP. Cela signifie que x est donc très proche de 0 et que par conséquent le rapport atomique Ca/P de l'apatite phosphocalcique de référence (non colloïdale, non dopée) est pratiquement égale à 1,67, caractéristique de l'HAP.

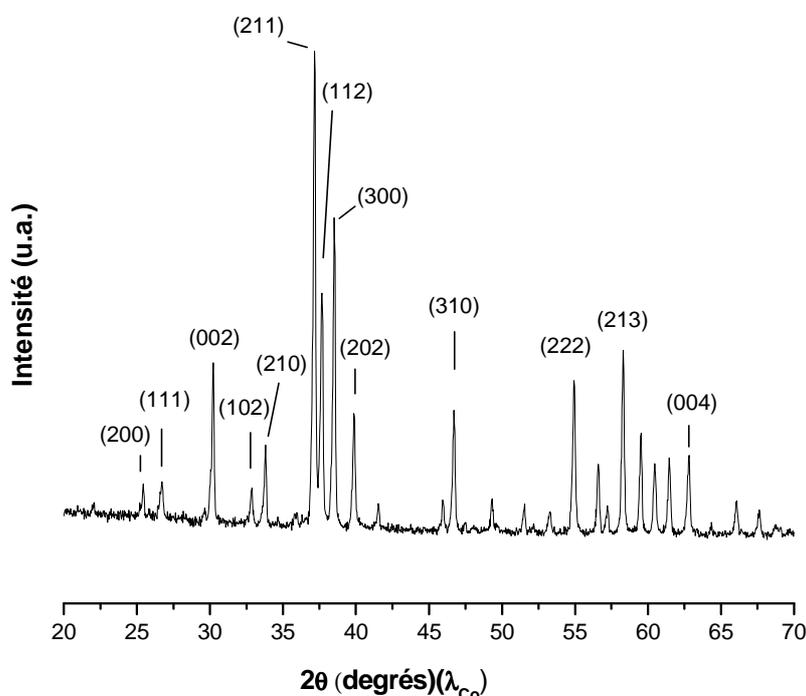


Figure 18 : Diagramme de diffraction des rayons X d'une apatite phosphocalcique de référence (non colloïdale, non dopée) calcinée à 1000°C pendant 15 heures

I-3) Analyse par spectroscopie FTIR d'une apatite phosphocalcique de référence

Le spectre FTIR de cette apatite de référence lyophilisée présente des bandes d'absorption bien résolues caractéristiques d'une phase apatitique bien cristallisée, ce qui est en accord avec les données de DRX (Figure 12). Ces bandes sont caractéristiques des groupements phosphate et hydrogénophosphate dans un environnement apatitique, ainsi que de OH^- et H_2O . Concernant les groupes phosphatés, en effet, dans les domaines $450\text{-}630\text{ cm}^{-1}$ et $800\text{-}1300\text{ cm}^{-1}$ on observe respectivement les bandes de vibration ν_4 et ν_3 des ions PO_4^{3-} . La présence des ions HPO_4^{2-} est confirmée par la bande à 875 cm^{-1} . Les bandes à 3572 et 632 cm^{-1} sont caractéristiques des ions OH^- dans un environnement apatitique. En addition à ces bandes, on note la présence d'une petite bande vers 1500 cm^{-1} qui témoigne d'une légère carbonatation de l'échantillon ($< 1\%$ massique CO_3) par le CO_2 présent dans l'air. Par ailleurs on retrouve la bande d'absorption large et intense dans le domaine $3700\text{ - }2700\text{ cm}^{-1}$ ainsi que celle à 1640 cm^{-1} caractéristiques de la présence d'eau associée à l'échantillon.

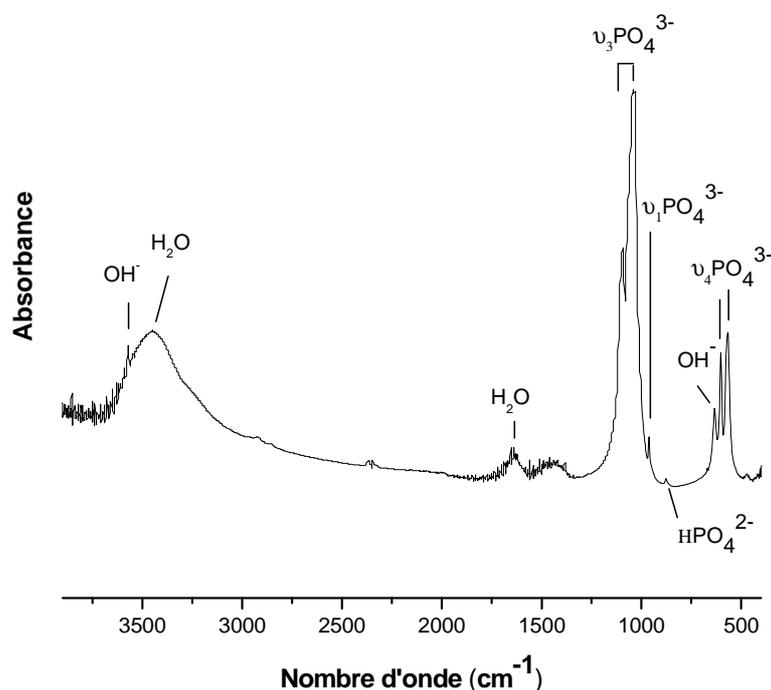


Figure 19 : Spectre FTIR d'une apatite phosphocalcique de référence non colloïdale, non dopée, et préparée à 80°C

I-4) Microscopie électronique en transmission (MET)

Des observations par microscopie électronique en transmission (MET) ont également été réalisées sur la poudre obtenue afin d'évaluer la morphologie et la taille des particules en présence (Figure 20). Nous observons ici des particules « primaires » (agglomérats) submicroniques formées de l'empilement de particules plus petites (se présentant sous une forme sphéroïdale et de dimension moyenne se situant autour de 30 nm). L'état d'agglomération, déjà observable macroscopiquement, témoigne de la forte réactivité de surface des particules en présence. Précisons ici qu'A. Bouladjine [Bouladjine et al. (2009)] avait également montré par granulométrie laser que les particules d'apatite phosphocalcique (synthétisées dans les mêmes conditions opératoires que notre apatite de référence) étaient de taille micronique, avec une distribution granulométrique large et bimodale comprise entre 40 et 120 μm .

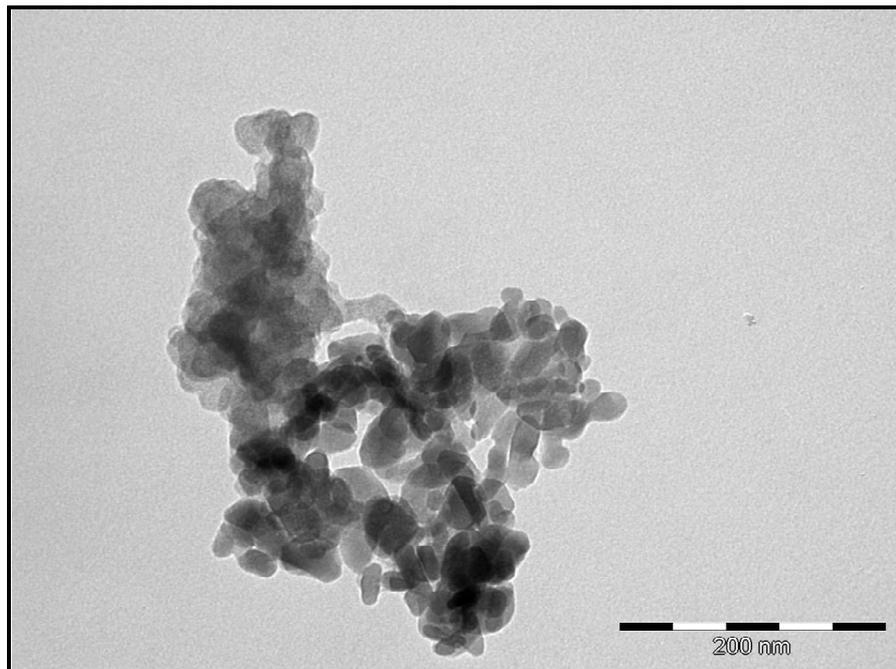


Figure 20 : Cliché de MET d'une apatite phosphocalcique de référence non colloïdale, non dopée, et préparée à 80°C

II) Synthèse et caractérisation d'une apatite phosphocalcique dopée à l'euporium Eu^{3+}

II-1) Protocole de synthèse d'une apatite phosphocalcique dopée à l'euporium Eu^{3+}

Cette apatite dopée à Eu^{3+} a été synthétisée dans les mêmes conditions opératoires que l'apatite phosphocalcique de référence à l'exception de la substitution de quelques pourcentages atomiques des ions Ca^{2+} par Eu^{3+} pour la solution A. Plus précisément, celle-ci a été constituée à partir d'un total de 4,87 mmol de nitrate de calcium et de nitrate d'euporium [$\text{Eu}(\text{NO}_3)_3, 6\text{H}_2\text{O}$] dissous dans 12,5 ml d'eau désionisée. Nous avons choisi dans un premier temps de travailler avec un rapport atomique $\text{Eu}/(\text{Ca}+\text{Eu})$ initial (introduit en solution) égal à 1,5%. En effet Doat (2003) avait montré dans le cas d'apatites phosphocalciques synthétisées en milieu hydro-alcoolique qu'au-delà de 2% il y avait apparition de phases secondaires [$\text{Eu}(\text{OH})_3$ et/ou EuPO_4].

II-2) Diffraction des rayons X sur une apatite phosphocalcique dopée à l'euporium Eu^{3+}

De la même manière qu'avec l'apatite phosphocalcique non dopée de référence, le diagramme DRX obtenu ici pour une apatite dopée à l'euporium ne présente pas de phase(s) secondaire(s) (Figure 21). Il reporte les raies de diffraction caractéristiques d'une phase apatitique bien cristallisée, bien que la résolution des raies apparaisse légèrement plus faible que pour l'apatite non dopée (Figure 17). Ceci est particulièrement visible avec la raie (112) qui est très bien définie avec l'échantillon de référence non dopé, alors qu'avec l'apatite dopée celle-ci n'apparaît que sous forme d'un épaulement. Ces résultats indiquent un élargissement des raies de diffraction en présence d'euporium, ce qui suggère une taille de cristallites plus faible (effet inhibiteur de croissance cristalline) et/ou l'apparition de micro-contraintes liées à l'incorporation de Eu dans la phase apatitique et provoquant une distorsion locale du réseau (rappelons cependant ici que les rayons ioniques des ions Ca^{2+} et Eu^{3+} sont très voisins, soit 1.00 Å pour Ca^{2+} et 0.95 Å pour Eu^{3+} d'après [Shannon et Prewitt (1969)]).

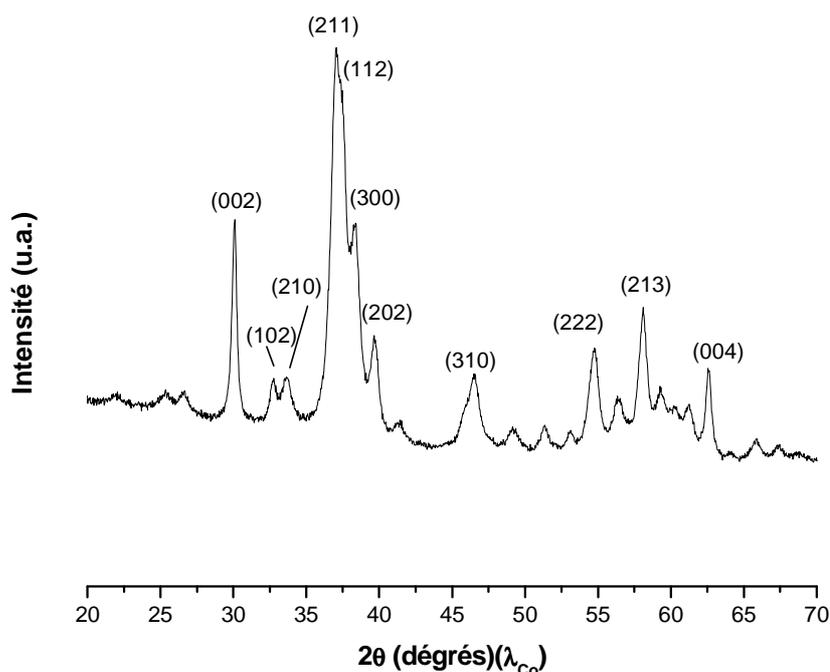


Figure 21 : Diagramme de diffraction des rayons X d'une apatite non colloïdale, dopée à l'euporium Eu^{3+} (1,5% Eu initial par rapport au Ca) préparée à 80°C

Comme pour l'apatite de référence nous avons estimé les dimensions apparentes des cristallites avec la formule de Scherrer [Scherrer (1918)] (Tableau 10). On constate alors que les dimensions apparentes ainsi évaluées sont inférieures aux valeurs déterminées pour une apatite de référence non dopée (exempte d'euporium) préparée dans les mêmes conditions (voir Tableau 9).

L (002) (nm)	L (310) (nm)
27	10

Tableau 10 : Dimensions apparentes des cristallites d'une apatite non colloïdale, dopée à l'euporium Eu^{3+} (1,5% Eu initial par rapport au Ca) préparée à 80°C

Notons que la présence d'euporium dans l'échantillon lyophilisé a par ailleurs été démontrée par excitation de la poudre à 254 nm avec une lampe U.V., où nous avons observé (Figure 22) la luminescence rouge caractéristique de l'ion Eu^{3+} . L'absence de pics secondaires sur le diffractogramme X tend alors à indiquer que l'euporium a bien été incorporé dans la matrice apatitique.

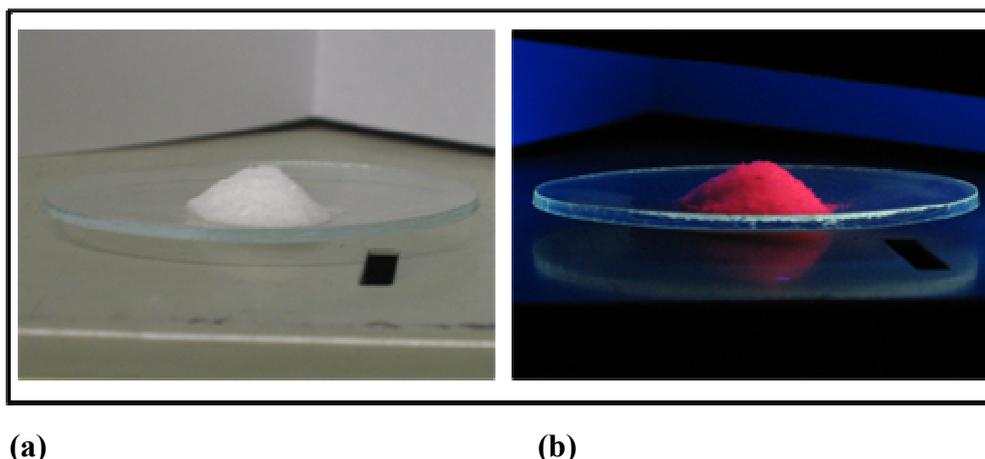


Figure 22 : Test de présence de Eu^{3+} dans l'apatite dopée Eu (a : avant excitation / b : après excitation à 254 nm avec une lampe U.V)

Comme précédemment pour l'apatite de référence non colloïdale et non dopée, nous avons souhaité ici estimer la valeur du rapport molaire $(\text{Ca}+\text{Eu})/\text{P}$ à partir de l'analyse de diffraction des rayons X d'une de la poudre ayant été calcinée à 1000°C pendant 15 heures (Figure 23). Cependant, dans ce cas, la localisation de l'euporium (soit dans l'HAP soit dans le βTCP) après calcination doit alors être prise en compte. Sur la base des travaux de Lazoriak et al. (1989), Doat (2003) avait émis l'hypothèse que l'euporium se substituait principalement au calcium dans la structure du βTCP lors de la calcination. Elle a également montré qu'au-delà d'un rapport atomique $\text{Eu}/(\text{Ca}+\text{Eu})$ initial de 5,55% dans l'apatite phosphocalcique, l'euporium avait atteint la limite de substitution au calcium dans la structure βTCP et formait alors une phase supplémentaire correspondant à EuPO_4 .

Dans notre cas, de la même manière que pour l'échantillon de référence, on constate que l'on ne détecte pas la raie la plus intense du βTCP à $36,10^\circ$. Ceci montre donc que l'apatite phosphocalcique dopée à Eu^{3+} avec 1,5% Eu dans le mélange initial présente une composition chimique proche de la stœchiométrie.

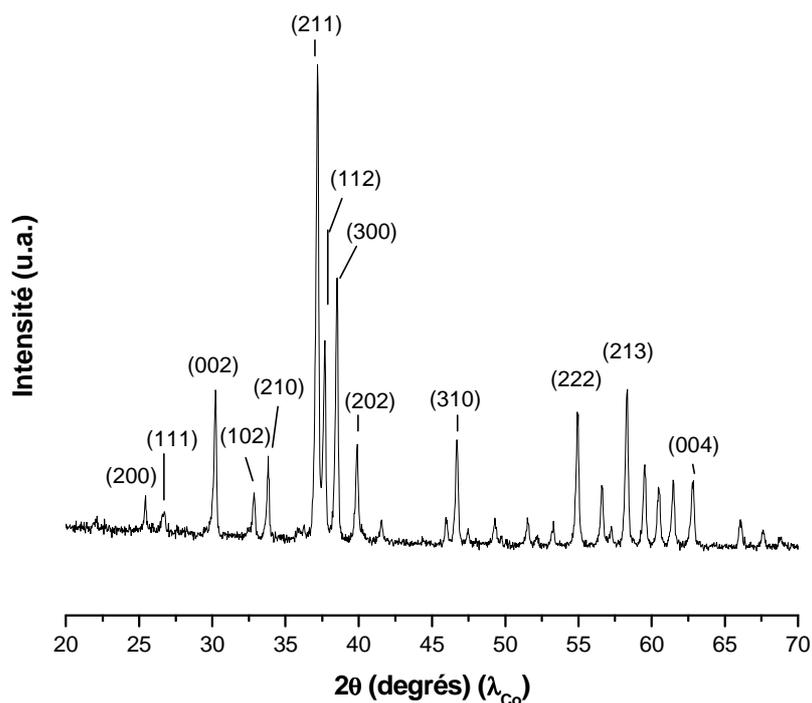


Figure 23 : Diagramme de diffraction des rayons X d'une apatite non colloïdale, dopée à Eu^{3+} (1,5% Eu initial), préparée à 80°C puis calcinée à 1000°C pendant 15 heures

II-3) Spectre FTIR d'une apatite phosphocalcique dopée à l'euporium Eu^{3+}

Le spectre FTIR obtenu ici est caractéristique d'une phase apatitique de basse cristallinité (Figure 24). On retrouve les mêmes bandes caractéristiques des groupements phosphate et hydrogénophosphate, OH^- et H_2O . Aucune bande supplémentaire n'est détectée (à l'exception de celle d'un faible pic à 1384 cm^{-1} attribué à des ions nitrates résiduels). On ne détecte donc pas de phase secondaire, ce qui est en accord avec le diagramme de diffraction des rayons X (Figure 21). Par ailleurs on constate que les bandes IR sont de résolution moindre et plus large que pour l'apatite de référence non dopée. Ceci rejoint les conclusions issues des analyses de diffraction des rayons X concernant les modifications (taille de cristallites et/ou micro-contraintes) de la phase apatitique engendrées par l'incorporation de l'euporium.

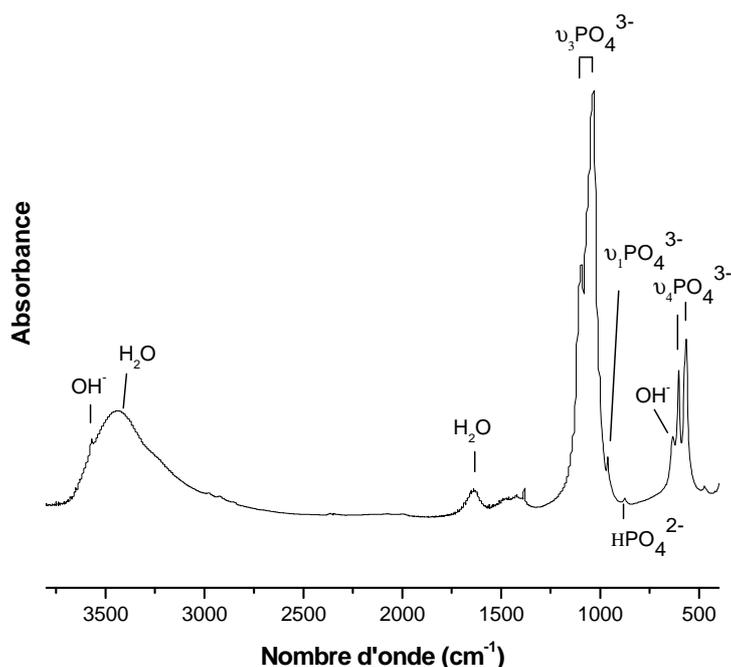


Figure 24 : Spectre FTIR d'une apatite non colloïdale, dopée à l'euporium Eu^{3+} (1,5% Eu initial) préparée à 80°C

II-4) Microscopie électronique en transmission

Les observations de microscopie électronique en transmission (voir préparation des échantillons MET en Annexe) montrent, de même que pour l'apatite de référence non dopée, que les échantillons sont constitués de particules formées par des associations de cristaux, ces derniers présentant une taille moyenne de l'ordre de 40 nm et une morphologie plutôt ovoïde (Figure 25), donc plus allongée que celle observée pour l'apatite de référence non dopée. De plus notons qu'aucune autre morphologie supplémentaire n'a été détectée par MET, ce qui vient confirmer la présence d'une phase unique, en accord avec les données de diffraction des rayons X et de spectroscopie IR.

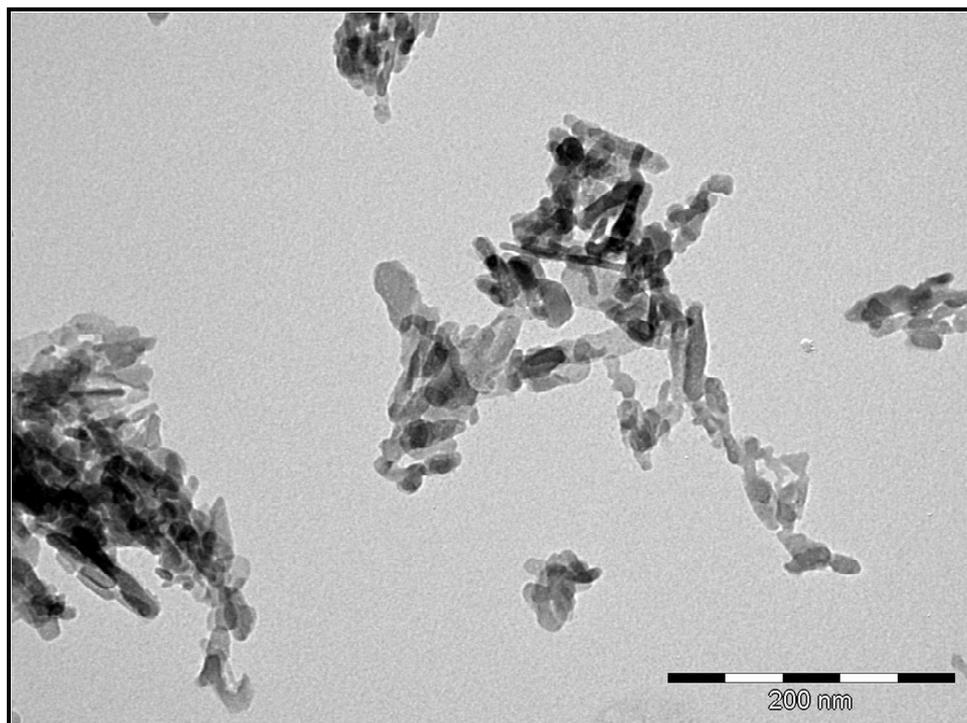


Figure 25 : Cliché de MET d'une apatite non colloïdale, dopée à l'euporium Eu^{3+} (1,5% Eu initial) et préparée à 80°C

A l'issue de ce travail initial nous avons constaté qu'il était possible de synthétiser, à 80°C , une apatite phosphocalcique non colloïdale, éventuellement dopée à l'euporium, en partant de sels de calcium (et euporium le cas échéant) et de phosphate. Par ailleurs avec un taux de dopage correspondant au rapport molaire initial $\text{Eu}/(\text{Ca}+\text{Eu}) = 1,5\%$, nous avons noté qu'il était possible d'incorporer l'euporium dans la phase apatitique, sans détection de phase secondaire par DRX ou par spectroscopie FTIR.

A la suite de cette étude nous avons donc cherché à reproduire ces deux synthèses précédentes (non dopée puis dopée Eu) mais cette fois-ci en condition colloïdale.

III) Synthèse et caractérisation d'une apatite phosphocalcique colloïdale non dopée

III-1) Protocole de synthèse d'une apatite phosphocalcique colloïdale non dopée

Comme nous le mentionnions à la fin du Chapitre 1, pour passer en condition colloïdale nous avons rajouté un agent stabilisant/dispersant, l'AEP, dans les proportions 3 : 3 : 1 (Ca : AEP : P).

Plus précisément, nous avons préparé trois solutions de départ : une solution A a été constituée à partir de 4,87 mmol de nitrate de calcium $[\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}]$, dissous dans 6,25 ml d'eau désionisée. Une solution B a été préparée à partir de 1,62 mmol de di-ammonium hydrogénophosphate $[(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4]$ dissous dans 6,25 ml d'eau désionisée. Enfin une solution C a été constituée à partir de 4,87 mmol d'AEP dissous dans 12,5 ml d'eau désionisée. Après dissolution complète des sels de départ, la solution A a été versée dans la solution C pour former un premier mélange « Ca + AEP » que nous avons appelé solution D. Son pH ainsi que celui de la solution B ont été réajustés à 9 avec une solution de NH_4OH concentrée. Sous agitation magnétique la solution D a ensuite été ajoutée à la solution B pour former le mélange réactionnel final que nous avons appelé solution E.

Notons que, tout comme pour l'apatite de référence, on observe la formation instantanée d'un précipité blanc. La solution E est laissée sous agitation magnétique pendant 15 minutes après avoir réajusté son pH à 9 avec NH_4OH . Par la suite la solution E a été laissée « maturer » à 80°C pendant 16 heures dans une étuve.

Une fois cette étape de maturation terminée, nous avons obtenu une suspension colloïdale translucide et fluide (Figure 26). Compte-tenu du caractère colloïdale de la suspension, celle-ci a ici été purifiée par procédé de dialyse (ce procédé fera l'objet d'une étude détaillée dans le Chapitre 3) dans le but d'éliminer tout les réactifs n'ayant pas réagi ainsi que les contre-ions (NO_3^- , NH_4^+). La suspension dialysée a ensuite été lyophilisée puis caractérisée par diffraction des rayons X, spectroscopie FTIR et microscopie électronique en transmission.



Figure 26 : Suspension **colloïdale** d'une apatite non dopée préparée à 80°C

III-2) Diffraction des rayons X d'une apatite colloïdale non dopée

Le diagramme de diffraction des rayons X obtenu ici est caractéristique d'une phase apatitique de très faible cristallinité, proche d'une apatite biologique, par exemple rencontrée dans le minéral osseux (Figure 27). En comparaison avec l'apatite de référence, cette observation met en évidence un effet inhibiteur joué par l'AEP sur la croissance cristalline de l'apatite. Un tel effet inhibiteur a par ailleurs déjà été mis en évidence pour d'autres molécules phosphatées, phosphonatées ou carboxylées dans la littérature [Sallis (1998)] et peut généralement s'expliquer par l'occupation de certains sites de croissance par ces molécules. Par ailleurs aucune autre phase secondaire n'est détectée.

Les dimensions apparentes des cristallites ont également été évaluées avec la formule de Scherrer [Scherrer (1918)]. Les résultats sont présentés dans le tableau suivant :

L (002) (nm)	L (310) (nm)
12	5

Tableau 11 : Dimensions apparentes des cristallites d'une apatite colloïdale non dopée préparée à 80°C

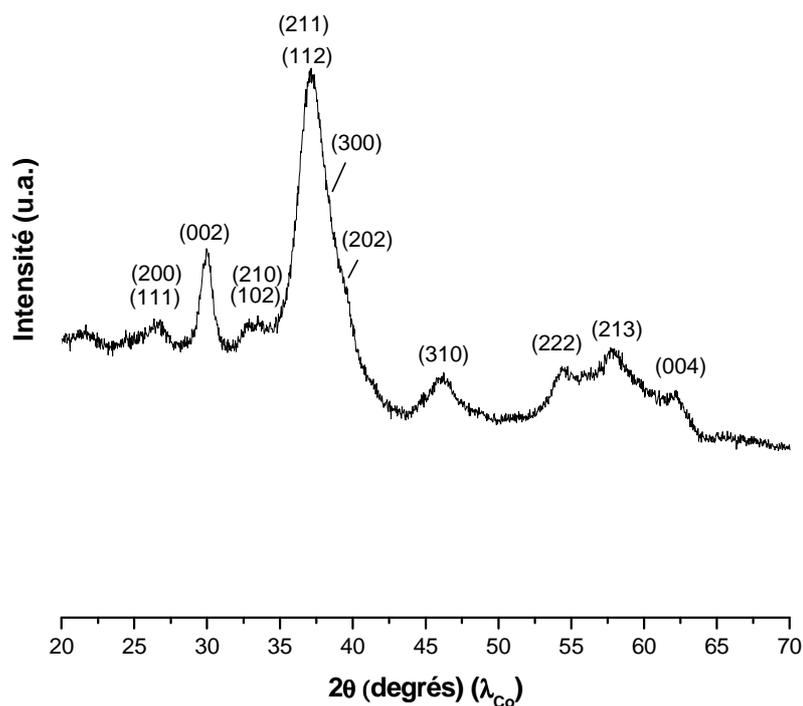


Figure 27 : Diffraction des rayons X d'une apatite **colloïdale** non dopée

Nous constatons que ces dimensions sont nettement plus faibles que celles retrouvées pour l'apatite de référence (dopée ou non à l'euprimum). Ceci confirme donc de l'effet inhibiteur de croissance cristalline de l'apatite joué par l'AEP que nous avons mentionnée ci-dessus.

Notons que la molécule d'AEP présente deux valeurs de pKa (5,8 et 10,5) qui se situent de part et d'autre du pH de synthèse de notre étude, proche de 9. Par conséquent, chaque molécule d'AEP présentera la formule semi-développée $\text{NH}_3^+ \text{-CH}_2 \text{-CH}_2 \text{-O-P(O)(O}^-\text{)}_2$ dans nos conditions expérimentales, soit une charge globale « -1 ».

Domaine de pH	pH < 5,8	5,8 < pH < 10,5	pH > 10,5
Formule	$\text{NH}_3^+ \text{-CH}_2 \text{-CH}_2 \text{-OP(O)(OH)O}^-$	$\text{NH}_3^+ \text{-CH}_2 \text{-CH}_2 \text{-OP(O)(O}^-\text{)}_2$	$\text{NH}_2 \text{-CH}_2 \text{-CH}_2 \text{-OP(O)(O}^-\text{)}_2$
Charge globale	AEP ⁰	AEP ⁽⁻⁾	AEP ⁽²⁻⁾

Tableau 12 : Formules semi-développées de l'AEP en fonction du pH (d'après [Christoffersen (1981)])

Dans ce contexte, l'occupation de sites de surface (sur les nanocristaux d'apatite) par des molécules d'AEP est alors vraisemblable, menant alors à une moindre progression de la croissance cristalline.

Par ailleurs les mesures de diffusion dynamique de la lumière (DLS) que nous avons réalisées dans le cadre du stage d'A. Bouladjine [Bouladjine et al. (2009)] sur ces colloïdes ont montré que les nanoparticules avaient une distribution monomodale avec un diamètre hydrodynamique moyen de 30 nm.

Contrairement à l'apatite de référence où le rapport atomique Ca/P peut être en premier lieu évalué par diffraction des rayons X après calcination (1000°C pendant 15h) à partir des proportions relatives d'HAP stœchiométrique et de β TCP formés ; en condition colloïdale cela est beaucoup plus complexe de par la présence d'AEP dont la dégradation à 1000°C produit alors un composé phosphaté additionnel (de par la présence de phosphate dans la molécule d'AEP) apte à modifier les proportions relatives en HAP/ β TCP post-calcination. Dans ce cas le rapport Ca/P est donc été uniquement déterminé par dosages chimiques, et celui-ci s'est avéré être proche de 1,33 (valeur notamment caractéristique de l'OCP apatitique). Notons que des analyses par spectroscopie Raman ont par ailleurs validé l'absence d'ions OH⁻ apatitiques détectables, indiquant une quantité très faible des ces ions dans les tunnels apatitiques.

III-3) Spectre FTIR d'une apatite colloïdale non dopée

Le spectre FTIR obtenu ici (Figure 28) est caractéristique d'une apatite de faible cristallinité (ce qui se traduit ici par des bandes IR larges et faiblement résolues), en accord avec les résultats de diffraction des rayons X. Ce point tend donc à confirmer le rôle inhibiteur joué par l'AEP sur l'apatite.

Les attributions de la majorité des bandes d'absorption observées restent identiques au cas de l'apatite de référence non colloïdale ; cependant une analyse plus approfondie montre la présence de bandes ou épaulements supplémentaires : en particulier, une bande additionnelle est observée à 754 cm⁻¹. Une telle bande avait déjà été observée par Zahidi (1984) dans le cas d'AEP mis en présence d'ions calcium et avait pu être attribuée à la liaison P-O-(C) dans le composé CaAEP préparé en milieu hydro-alcoolique et à pH basique. De plus

l'épaulement observé dans le domaine 3200-2775 cm^{-1} est également attribuable à la présence des groupements ammonium des molécules d'AEP associées aux nanoparticules.

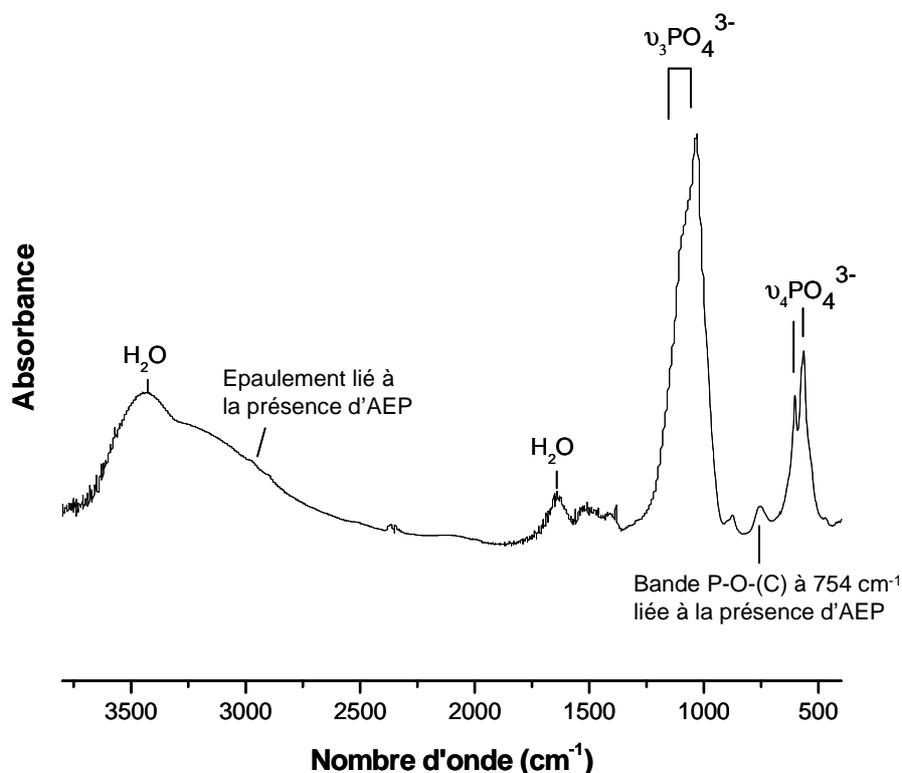


Figure 28 : Spectre FTIR d'une apatite phosphocalcique **colloïdale** non dopée préparée à 80°C

Afin d'étudier plus en détail ces aspects, nous avons également enregistré les spectres FTIR de l'AEP pur, du précipité $\text{Ca}(\text{AEP})_2 \cdot n\text{H}_2\text{O}$ préparé séparément (avec $n \sim 2,8$). La comparaison des spectres de ces deux composés avec celui de l'apatite colloïdale non dopée montre en effet une absence de correspondance spectrale entre le colloïde et l'AEP pur, mais au contraire une bonne correspondance des bandes ammonium (1530 cm^{-1}) et P-O-(C) (754 cm^{-1}) avec le spectre du colloïde. Par conséquent, il semble que l'on puisse conclure à la présence de complexes faisant intervenir Ca^{2+} et AEP^- (rappelant $\text{Ca}(\text{AEP})_2$) en association avec les nanoparticules colloïdales. Cependant, l'absence de phases secondaires détectables par DRX suggère qu'il ne se forme pas une phase cristallisée $\text{Ca}(\text{AEP})_2 \cdot n\text{H}_2\text{O}$ séparée.

Nous reviendrons en fin du chapitre sur ces considérations ayant trait à la localisation probable des molécules d'AEP, et proposerons un modèle descriptif pour les nanoparticules colloïdales obtenues.

III-4) Microscopie électronique en transmission

Les observations de microscopie électronique en transmission menées (au même grossissement de x200 000 que pour l'échantillon de référence) sur la poudre obtenue après lyophilisation du colloïde montrent que les nanocristaux présentent la même morphologie arrondie que dans l'échantillon de référence non dopé. Par ailleurs l'évaluation de la taille moyenne des particules à partir des micrographies MET indique un même ordre (~17 nm) que les tailles moyennes apparentes des cristallites évaluées par la formule de Scherrer [Scherrer (1918)]. Ceci démontre qu'en condition colloïdale (c'est-à-dire ici en présence d'AEP), les nanoparticules sont formées de nanocristaux de plus petites tailles qu'en condition non colloïdale dû à l'effet inhibiteur joué par l'AEP lors du processus de maturation de l'apatite.

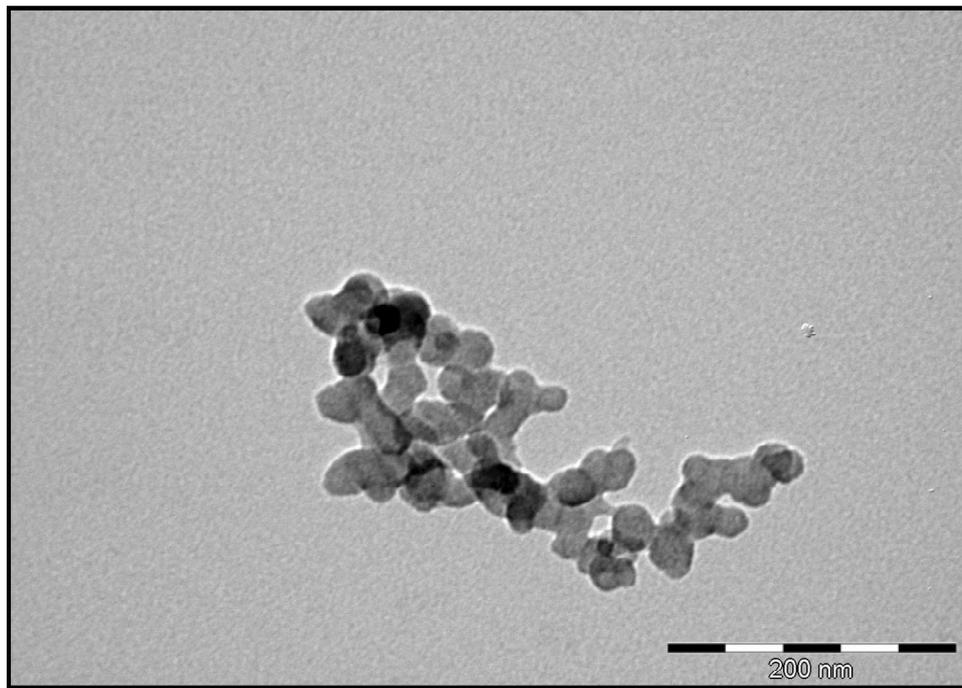


Figure 29 : Cliché de MET d'une apatite phosphocalcique non dopée **synthétisée en condition colloïdale**

IV) Synthèse et caractérisation d'une apatite phosphocalcique colloïdale dopée à l'euporium Eu^{3+}

IV-1) Protocole de synthèse en vue de l'obtention d'une apatite phosphocalcique colloïdale dopée à l'euporium Eu^{3+}

Le protocole de cette synthèse diffère du précédent *uniquement* par la substitution de quelques pourcentages atomiques de nitrate de Ca^{2+} par du nitrate d' Eu^{3+} . La solution A a ainsi été préparée à partir d'un total de 4,87 mmol de nitrates de calcium et euporium en gardant le même rapport atomique $\text{Eu}/(\text{Ca}+\text{Eu})$ initial de 1,5%. Ici, la température de maturation en étude a été maintenue à 80°C, pendant 16 h.

Au cours de la phase de précipitation, aucun changement particulier (apparence des solutions, valeurs des pH) n'a été remarqué. Cependant à l'issue de l'étape de maturation en étuve, nous n'avons *pas* obtenu une suspension colloïdale fluide, contrairement au cas sans euporium. A l'inverse, la suspension s'est avérée totalement gélifiée. Pour tenter de comprendre ce phénomène, nous avons dialysé cette suspension puis lyophilisée et caractérisée par diffraction des rayons X et par spectroscopie IR.

IV-2) Diffraction des rayons X sur une apatite phosphocalcique colloïdale dopée à l'euporium Eu^{3+} (1,5% initial)

Nous constatons par diffraction des rayons X que la suspension ainsi préparée, avec 1,5% molaire initial d'euporium par rapport au calcium, correspond toujours à une phase apatitique et aucune autre phase cristallisée n'a été détectée ici. Cependant, celle-ci présente ici un état de cristallinité très faible comme en témoigne la Figure 30. En comparaison avec la synthèse exempte d'euporium, les pics de diffraction sont ici très mal résolus. Ceci témoigne de l'effet perturbateur de l'euporium déjà remarqué dans le cas d'apatites phosphocalciques non colloïdales dopées à l'euporium.

La présence de l'euporium a également été confirmée par la détection nette d'une luminescence rouge orangée après excitation avec une lampe U.V (excitation à 254 nm).

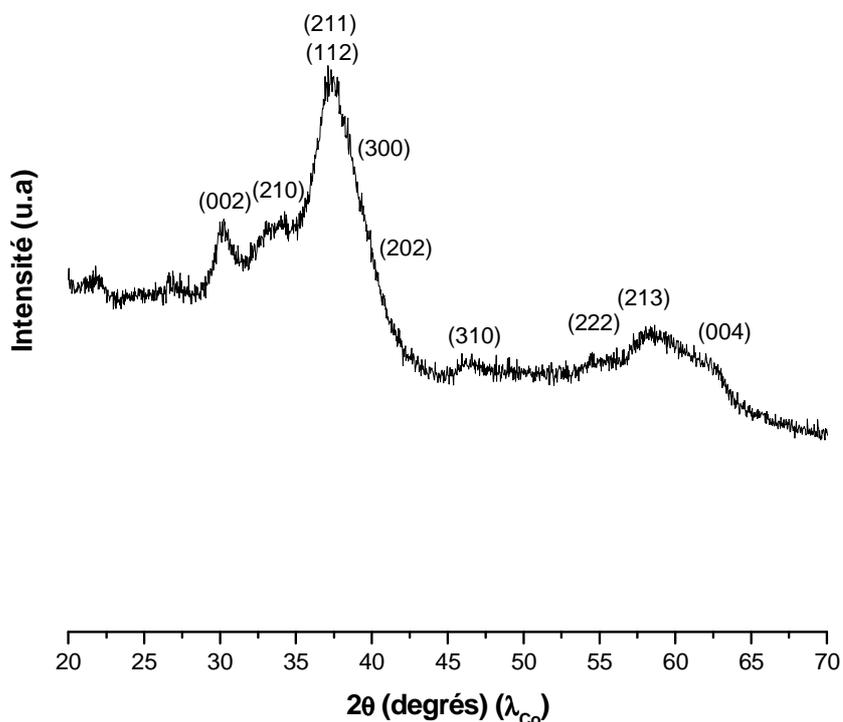


Figure 30 : Diagramme de diffraction des rayons X d'une apatite phosphocalcique **colloïdale** dopée à l'euporium Eu^{3+} (1.5% molaire initial) préparée à 80°C

IV-3) Spectre FTIR d'une apatite phosphocalcique colloïdale dopée à l'euporium Eu^{3+} (1,5% initial)

Les observations constatées ci-dessus par diffraction des rayons X sont corroborées par les analyses par spectroscopie FTIR, menant à des bandes larges et très mal résolues (Figure 31). Cependant on observe, outre les bandes relatives à l'apatite, des bandes additionnelles à 543 et à 992 cm^{-1} qui ne correspondent pas à des bandes apatitiques. Par ailleurs on constate que les intensités des bandes dans le domaine de vibration $\nu_3(\text{PO}_4^{3-})$ sont clairement modifiées, ce qui suggère la présence d'autres bandes additionnelles dans cette zone qui s'ajoutent aux bandes $\nu_3(\text{PO}_4^{3-})$ de la phase apatitique. Tout comme pour la synthèse colloïdale réalisée en absence d'euporium, la présence de complexes entre Ca^{2+} et AEP^- est confirmée par la bande d'absorption infrarouge observée à 754 cm^{-1} caractéristique de la liaison P-O-(C) dans les complexes de type $\text{Ca}(\text{AEP})_2$, ainsi que par l'épaulement dans le

domaine 3200-2775 cm^{-1} . On remarque également que la bande à 1530 cm^{-1} attribuable au groupe ammonium de l'AEP est atténuée par la présence d'un épaulement à 1453 cm^{-1} dû à des bandes additionnelles.

Suite à ces observations, nous avons émis l'hypothèse que la présence de ces diverses bandes additionnelles est due probablement à une mauvaise purification de la suspension. En effet il est important de noter qu'un état de gélification très prononcé de la suspension s'avère problématique pour l'efficacité de la dialyse : le milieu gélifié de la suspension peut alors ralentir considérablement l'élimination des contre-ions et des réactifs qui n'ont pas réagi, menant à leur plus longue subsistance dans la suspension.

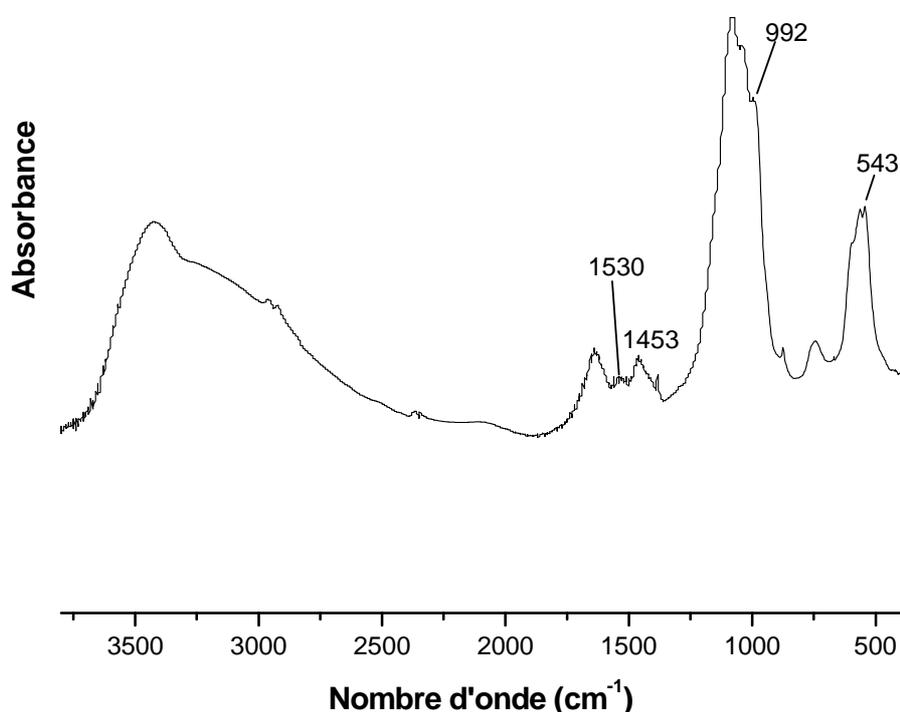


Figure 31 : Spectre FTIR d'une apatite phosphocalcique **colloïdale dopée** à l'euporium Eu^{3+} (1.5% molaire initial) préparée à 80°C

Nous avons alors tenté de comprendre les raisons d'une telle gélification de la suspension, observée dans ces conditions expérimentales (maturation à 80°C pendant 16h, pH 9, $\text{Eu}(\text{Ca}+\text{Eu})$ initial : 1.5%, $\text{AEP}/(\text{Ca}+\text{Eu}) = 1$) ; et ce dans le but de proposer des modifications de protocole expérimental permettant l'obtention de suspensions colloïdales fluides (la gélification gênant en effet la purification de la suspension et ne permettant pas d'obtenir au final un système fluide potentiellement injectable).

Pour cela, une des informations qui constitue un point de départ est l'état de cristallinité particulièrement faible de la suspension lyophilisée dopée à l'euporium. Cette observation est probablement directement liée à l'incorporation des ions euporium au sein de la matrice apatitique. Il est possible que la substitution du calcium par l'euporium ait un effet non négligeable sur les propriétés thermodynamiques de la phase apatitique, menant possiblement à une limitation de la vitesse d'évolution de la composition chimique des nanocristaux vers la stœchiométrie. Ces derniers étant alors moins matures et donc plus réactifs, ceci expliquerait la gélification de la suspension par une tendance accrue à des interactions inter-cristallines. Cette hypothèse devra cependant être validée (ou invalidée) par une étude thermodynamique dédiée à l'étude de cette substitution Ca/Eu (étude en cours en collaboration avec le Peter A. Rock thermochemistry laboratory de l'université UC Davis, USA).

De façon pratique, une façon de compenser cette diminution de maturité pourrait alors consister à favoriser une évolution vers la stœchiométrie en augmentant la température de maturation et/ou le pH de synthèse (pH des solutions intermédiaires et pH final du mélange réactionnel). En effet, une augmentation de l'un au moins de ces deux paramètres est connue pour faire évoluer les apatites phosphocalciques plus rapidement vers la stœchiométrie.

Une autre hypothèse pourrait par ailleurs expliquer la gélification. Celle-ci est liée au fait que l'euporium est dissous, dans notre protocole, en même temps que le calcium dans la solution A, et cette solution est alors versée dans la solution qui contient l'AEP. On peut donc penser que l'AEP puisse éventuellement se complexer de préférence avec l'euporium et serait alors moins disponible pour former les complexes entre Ca^{2+} et AEP^- nécessaires à la stabilité des particules colloïdales. Pour éviter cela, l'euporium pourrait alors être dissous dans une solution séparée. Pendant cette dissolution de l'euporium, la solution A (solution de calcium) pourrait alors être versée dans la solution d'AEP. Par la suite après avoir réajusté le pH à 9 avec NH_4OH , le mélange obtenu (solution D) pourrait être laissé à agiter pendant 30 minutes pour favoriser la formation de complexes entre Ca^{2+} et AEP^- . Après ce temps écoulé, la solution d'euporium pourrait enfin être ajoutée au mélange D.

Une troisième modification de protocole peut également être considérée : afin de limiter les interactions entre cristaux adjacents et donc la gélification de la suspension, on peut en effet envisager d'augmenter le volume total de la suspension.

Prenant en compte l'ensemble de ces considérations, nous avons donc procédé à diverses synthèses additionnelles, en faisant varier un à un chaque paramètre en gardant identique le reste du protocole (Tableau 13). A l'issue de chaque synthèse nous nous sommes

attachés à voir si l'on obtenait, à l'issue de la synthèse, une suspension fluide ou gélifiée. Dans le cas de l'obtention d'une suspension fluide, nous avons alors observé visuellement combien de temps elle restait fluide (« stabilité » dans le temps avant de gélifier). Enfin nous avons également vérifié la reproductibilité de ces observations dans chaque cas, en répétant chaque test plusieurs fois. Ces résultats sont présentés dans le tableau ci-après.

Paramètre modifié	Etat de la suspension	Stabilité dans le temps avant gélification	Reproductibilité des observations
pH = 9,5 (à 80°C)	fluide	1 à 2 jours	oui
Température de maturation = 100°C	fluide	1 à 2 jours	oui
Ajout de l'euprotium après mise en contact préliminaire entre Ca²⁺ et AEP (à 80°C)	gélifiée	-	oui
Volume total de la suspension multiplié par 2 (à 80°C)	fluide	Quelques heures (~ 5 heures)	moyenne

Tableau 13 : Effets des paramètres pH, température, moment d'ajout de l'euprotium et volume total de la suspension

A l'issue de ces divers essais, on constate qu'une légère augmentation du pH ainsi qu'une augmentation de la température permettent d'obtenir une suspension colloïdale fluide stable pendant quelques jours (à l'issue de quoi une gélification se produit). Ceci suggère qu'en faisant varier ces paramètres on favorise l'obtention d'une phase apatitique plus proche de la stœchiométrie (composée de nanocristaux moins immatures), donc plus stable thermodynamiquement. Dans ces conditions, il semble raisonnable de supposer que les nanocristaux ainsi formés sont moins susceptibles de s'agglomérer entre eux dès leur formation (en vue de diminuer leur énergie de surface par exemple), et donc qu'ils sont plus susceptibles d'interagir avec les molécules d'AEP. On compense alors en quelque sorte l'effet perturbateur/inhibiteur de l'euprotium sur la croissance cristalline de la phase apatitique. On constate en revanche que l'ordre d'introduction de l'euprotium dans la suspension n'a pas d'effet et qu'a priori l'euprotium ne perturbe pas la formation de complexes entre Ca²⁺ et AEP⁻. Enfin nous obtenons également une suspension fluide en divisant sa concentration par 2. Néanmoins on constate dans ce cas très rapidement que la suspension gélifie après son

refroidissement total. Ce qui laisse penser que la dilution conjuguée à l'agitation thermique limite temporairement l'interaction entre les cristaux. Notons cependant que sa reproductibilité est moyenne malgré des conditions identiques.

Au regard de ces résultats, nous avons réalisé par la suite une synthèse d'une suspension dopée à l'euporium et en présence d'AEP *en combinant les trois paramètres (pH, température, dilution)*. Nous avons alors obtenu, après maturation (à 100°C pendant 16h, à pH 9.5), une suspension colloïdale fluide et stable dans le temps (au-delà de six-mois) dopée à l'euporium (1.5% initial par rapport au calcium, valeur expérimentale : 2%), et ce de manière reproductible. Les données de diffraction des rayons X (Figure 32), spectroscopie FTIR (Figure 33) et microscopie électronique en transmission (Figure 34) obtenues sur la suspension dialysée puis lyophilisée sont reportées ci-après.

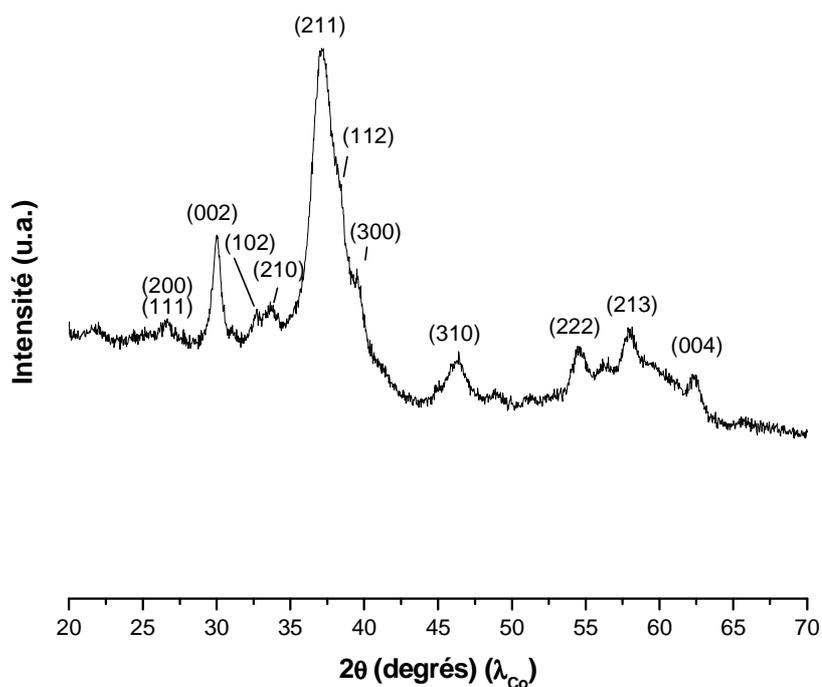


Figure 32 : Diagramme de diffraction des rayons X d'une apatite phosphocalcique dopée à l'euporium Eu^{3+} (1.5% initial) **en condition colloïdale** (avec pH 9,5, à 100°C et dilution par 2)

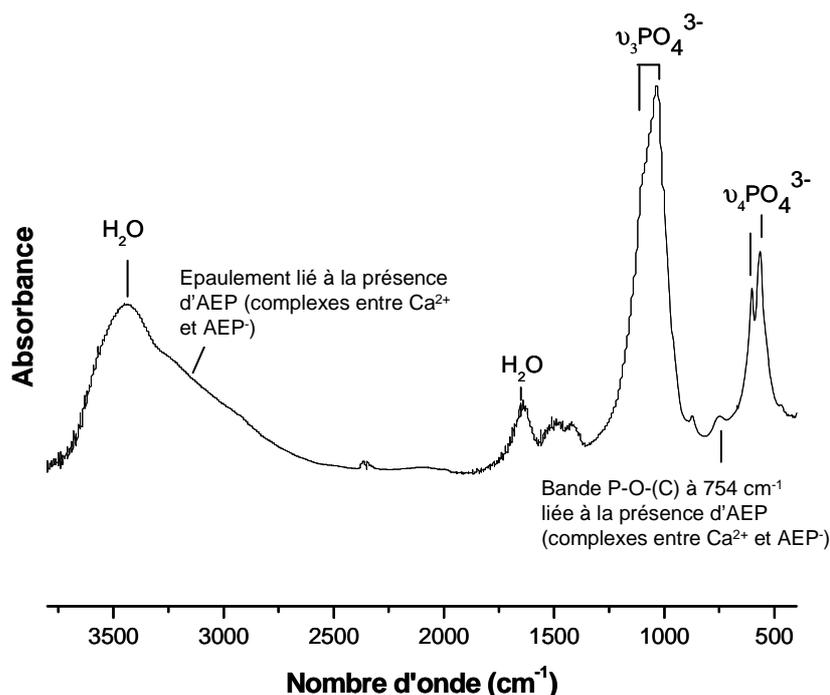


Figure 33 : Spectre FTIR d'une apatite phosphocalcique dopée à l'euporium Eu^{3+} (1.5% initial) **colloïdale** (avec pH 9,5, à 100°C et dilution par 2).

Ces caractéristiques cristallographiques et spectroscopiques confirment que les particules en suspension sont principalement constituées d'une phase apatitique de caractéristiques proches de celles du minéral osseux. Par ailleurs aucune phase secondaire cristallisée n'est détectée, et la présence de l'euporium dans l'échantillon a là encore pu être démontrée par le test de luminescence sous U.V.. Par microscopie électronique en transmission, on constate par ailleurs que les nanoparticules colloïdales ont une forme ellipsoïdale (longueur moyenne de l'ordre de 25 ± 3 nm, largeur moyenne d'environ 7 ± 1 nm). L'absence d'autre morphologie détectable tend également à confirmer l'absence de phase(s) secondaire(s).

Des mesures de diffusion de la lumière (DLS, cf Annexe) réalisées avant dialyse avec ce protocole expérimental modifié (Figure 35) montrent que les nanoparticules ont une distribution granulométrique monomodale relativement étroite caractérisée par un diamètre hydrodynamique moyen d'environ 30 nm, lorsque la courbe est analysée en « Intensité », ce qui est en bon accord avec les observations de microscopie MET (Figure 34). Signalons par ailleurs que le diamètre moyen obtenu lorsque la courbe granulométrique est analysée en « Nombres » passe à ~ 18 nm. Cependant, compte-tenu de l'anisotropie de forme des particules observées par MET, les données de granulométrie explicitées en termes d'intensité

de lumière diffusée s'avèrent plus intéressantes à suivre pour évaluer la taille « réelle » des particules (compte-tenu du fait que la grande dimension des particules ellipsoïdales contribuera notablement plus à l'intensité de lumière diffusée que la petite dimension).

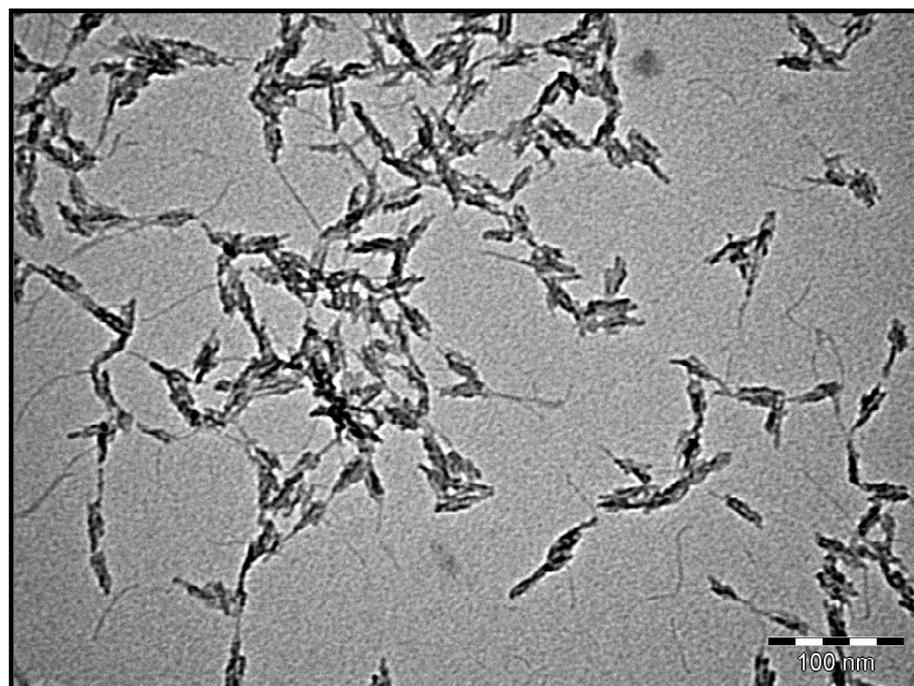


Figure 34 : Cliché MET pour une suspension d'apatite dopée à l'euporium Eu^{3+} (1.5% initial) **en condition colloïdale** (Synthèse réalisée à pH 9,5, à 100°C et diluée par 2)

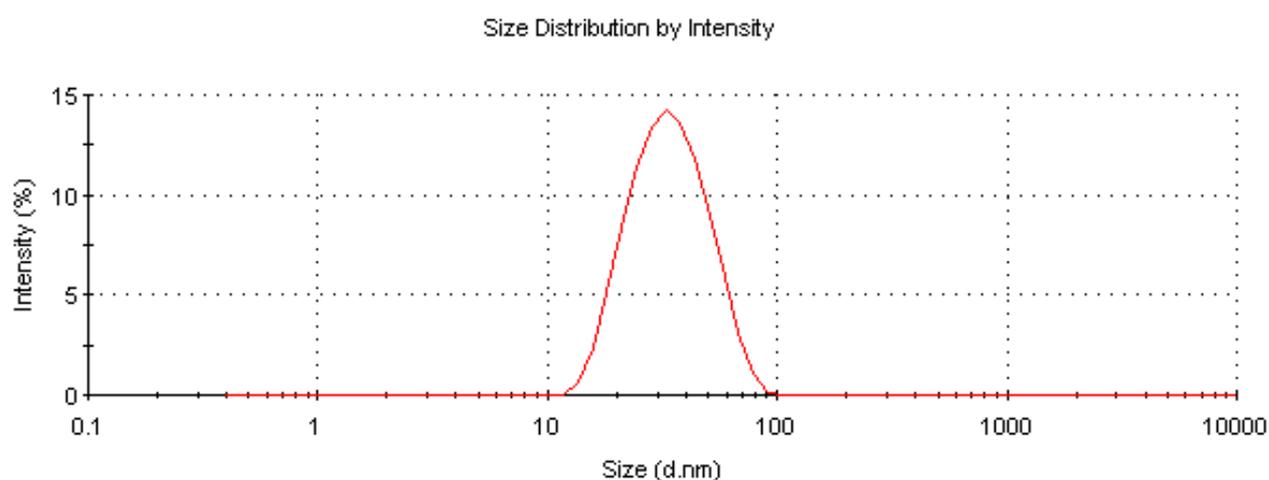


Figure 35 : Distribution granulométrique d'apatite phosphocalcique dopée à l'euporium Eu^{3+} (1.5% initial) **en condition colloïdale** (Synthèse réalisée à pH 9,5, à 100°C et diluée par 2)

Dans la suite de ce manuscrit, l'ensemble des synthèses qu'elles soient colloïdales ou non (sans AEP), dopées à l'euporium ou non, ont été réalisées en intégrant ces nouveaux paramètres de pH, température et concentration. Ce protocole de synthèse « finalisé », qui apporte donc différentes modifications importantes par rapport au protocole élaboré initialement en absence d'euporium, est rappelé dans son ensemble dans la section suivante.

V) Protocole de synthèse de suspensions colloïdales hybrides à base de nanoparticules d'apatites biomimétiques dopées à l'euporium Eu^{3+} et d'AEP

Les réactifs de départ sont introduits dans les proportions 3 : 3 : 1 (Ca+Eu : AEP : P), comme expliqué précédemment. Plus précisément, trois solutions de départ sont préparées :

- une solution A, qui est constituée à partir d'un total 4,87 mmol de nitrate de calcium $[\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}]$ et de nitrate d'euporium $[\text{Eu}(\text{NO}_3)_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}]$, introduits avec le rapport atomique $\text{Eu}/(\text{Ca}+\text{Eu})$ initial souhaité (0, 1,5%...). Les sels sont ensuite dissous dans 6,25 ml d'eau désionisée.
- Une solution B, préparée à partir de 1,62 mmol de di-ammonium hydrogénophosphate $[(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4]$ dissous dans 6,25 ml d'eau désionisée.
- Enfin une solution C constituée à partir de 4,87 mmol d'AEP dissous dans 12,5 ml d'eau désionisée.

Après dissolution complète des sels de départ, la solution A est versée dans la solution C pour former un mélange « Ca-Eu-AEP » que nous avons appelé solution D. Son pH, ainsi que celui de la solution B ont été ajustés à 9,5 par addition de la quantité nécessaire d'une solution de NH_4OH concentrée. Sous agitation magnétique, la solution D a été ensuite ajoutée à la solution B pour former le mélange réactionnel final que nous avons appelé solution E. Cette dernière est laissée sous agitation magnétique pendant 15 minutes après avoir réajusté son pH à 9,5 avec NH_4OH . Par la suite la solution E est maturée à 100°C pendant 16 heures en étuve. Une fois l'étape de maturation terminée, nous obtenons une suspension colloïdale translucide et fluide qui a été ensuite purifiée par le procédé de dialyse pour éliminer tous les réactifs n'ayant pas réagi ainsi que les contre-ions (NO_3^- , NH_4^+) (les détails sur le processus de purification par dialyse seront discutés au Chapitre 3). La suspension dialysée a ensuite été

conservée telle quelle, à température ambiante. Une partie de chaque suspension a néanmoins été lyophilisée pour la caractérisation physico-chimique des nanoparticules initialement en suspension. Précisons que lorsqu'il s'agit de l'apatite de référence, l'AEP est retiré du protocole et les 12,5 ml d'eau désionisée provenant de sa solution (solution C) sont répartis équitablement entre la solution A et la solution B, le déroulement du reste du protocole demeurant inchangé.

La Figure 36 illustre schématiquement l'ensemble du protocole de synthèse. Notons que certaines synthèses ont été réalisées, dans la suite de ce travail, en substituant l'euporium par une autre terre rare ; cependant outre cette modification, l'ensemble du protocole opératoire a été conservé à l'identique.

Dans la suite du manuscrit, pour éviter toute confusion, nous avons appelé « **apatite non colloïdale** » une apatite « standard » que l'on notera « As » (pour Apatite Standard) suivi de son taux de dopage initial et du symbole chimique de la terre rare employée. Ainsi, l'apatite phosphocalcique non colloïdale non dopée de référence est notée « As0Eu » et l'apatite non colloïdale dopée à 1,5% (rapport initial) d'euporium est notée « As1,5Eu ». En revanche pour **une apatite préparée en condition colloïdale** celle-ci sera appelée « Ssuspension Colloïdale » et notée « Sc », suivie du taux de dopage initial et du symbole chimique de la terre rare employée.

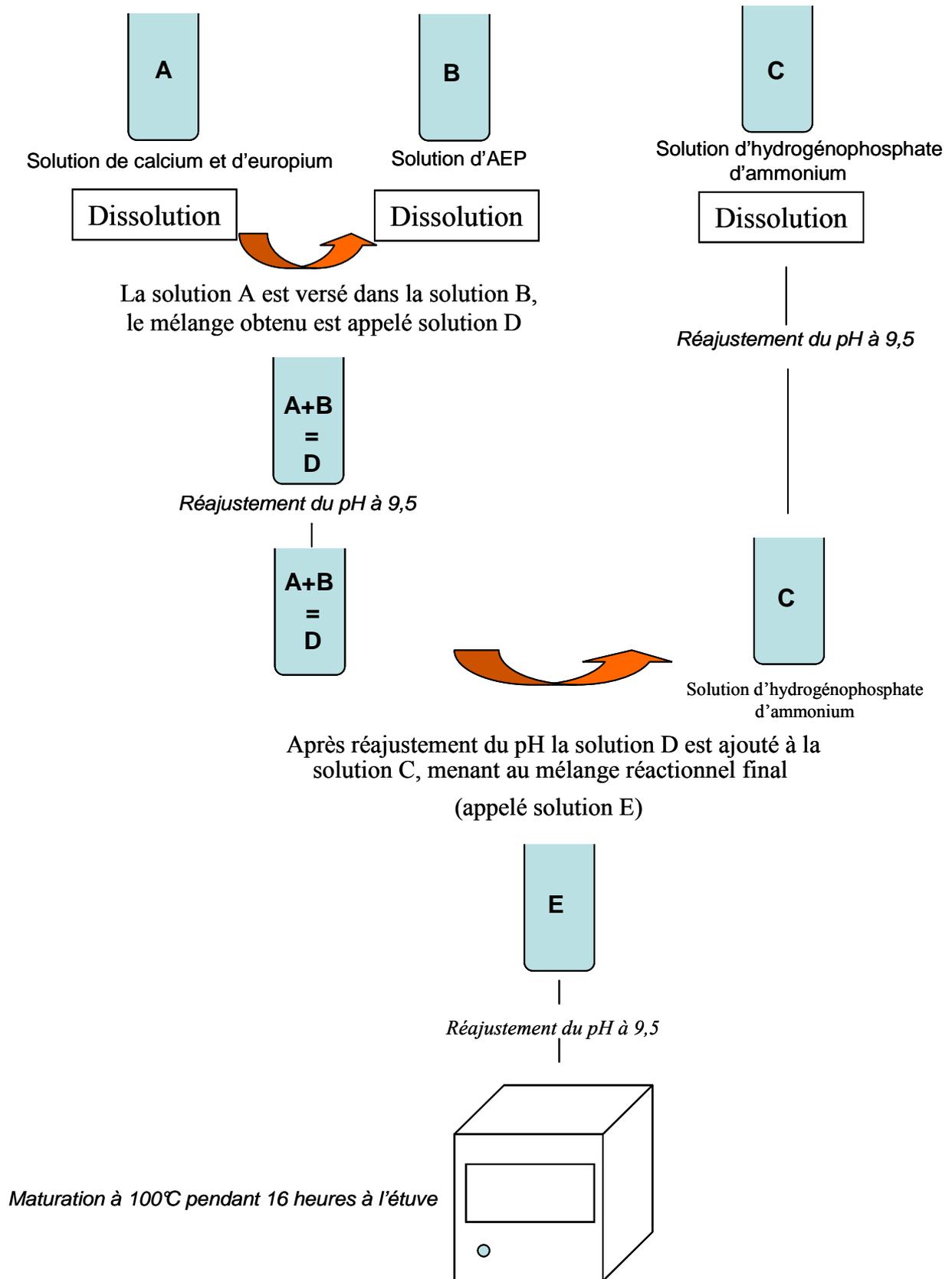


Figure 36 : Protocole finalisé pour la synthèse de suspensions colloïdales à base d'apatite dopée à l'euprium Eu^{3+}

Partie C : Caractérisation physico-chimique de suspensions colloïdales hybrides à base de nanoparticules d'apatite biomimétique dopée à l'euporium Eu^{3+}

I) Détermination de la limite de substitution des ions Ca^{2+} par les ions Eu^{3+}

Comme nous l'avons rappelé dans la partie B, Doat (2003) avait conclu que la limite de substitution des ions Ca^{2+} par les ions Eu^{3+} était proche de 2% (rapport atomique $\text{Eu}/(\text{Ca}+\text{Eu})$ initial) pour une apatite phosphocalcique non colloïdale synthétisée en milieu hydro-alcoolique. Nous avons voulu savoir si cette limite était également valable pour des apatites phosphocalciques synthétisées en condition colloïdale en présence d'AEP. Pour cela nous avons préparé des apatites phosphocalciques colloïdales avec un rapport atomique $\text{Eu}/(\text{Ca}+\text{Eu})$ initial compris entre 0% et 100%. Notons que les suspensions préparées à partir d'un taux en Eu initial inférieur à 4% ont été de nature colloïdale fluide. En revanche, au-delà de cette valeur, nous avons constaté une augmentation très importante de la viscosité. Par ailleurs, la suspension obtenue en absence de calcium (notée Sc100Eu) s'est avérée instable menant à un précipité à sédimentation rapide. Ces suspensions, après dialyse et lyophilisation, ont été caractérisées par diffraction des rayons X (Figure 37) et spectroscopie FTIR (Figure 38).

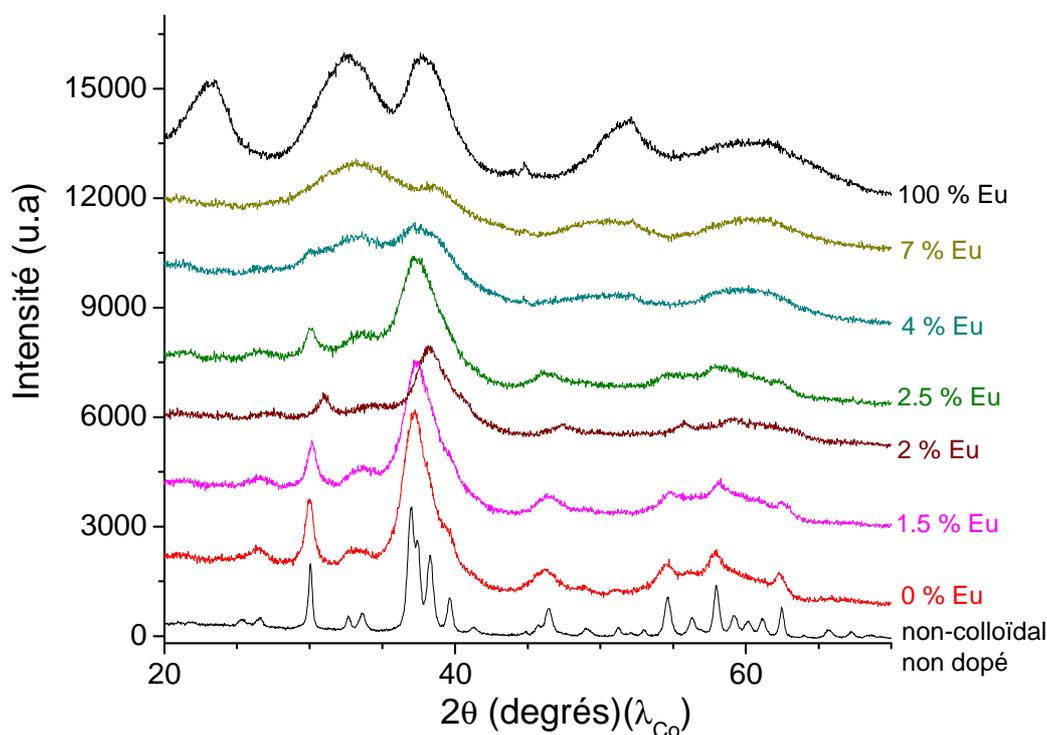


Figure 37 : Diagrammes de diffraction des rayons X de suspensions colloïdales d'apatite dopée à Eu^{3+} avec un rapport atomique $\text{Eu}/(\text{Ca}+\text{Eu})$ initial compris entre 0 et 100%

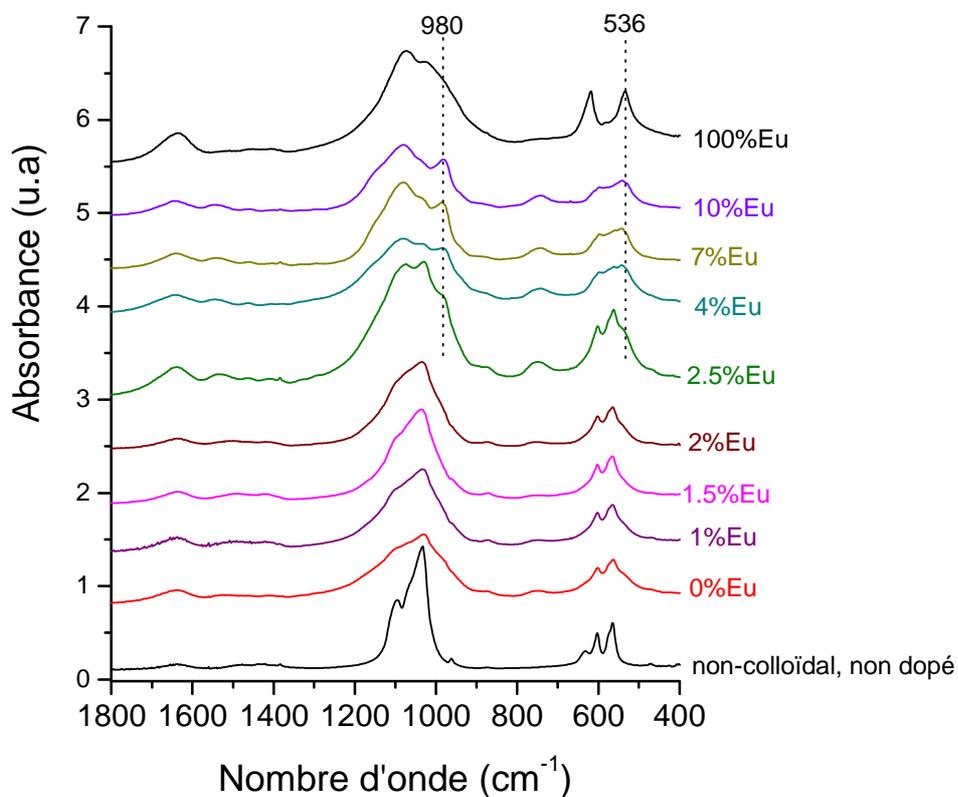


Figure 38 : Spectres FTIR de suspensions colloïdales d'apatite phosphocalcique dopée à Eu^{3+} avec un rapport atomique $\text{Eu}/(\text{Ca}+\text{Eu})$ initial compris entre 0 et 100%

On constate sur la Figure 37 par diffraction des rayons X que l'état de cristallinité diminue avec l'augmentation de la quantité d'euporium introduite dans la solution de départ (solution A). En effet, on remarque une déformation du fond continu visible vers 35-41° (2 θ) et 53°-63° (2 θ). Ces observations confirment l'effet perturbateur joué par l'euporium que nous avons déjà signalé dans la partie B. Par ailleurs on ne détecte pas par DRX de phase secondaire cristallisée pour les synthèses partant d'un rapport atomique Eu/(Ca+Eu) initial compris entre 0% et 2,5% où seule une phase apatitique est observable. En revanche, au-delà de 2,5% initial, l'apparition de phase(s) secondaire(s) est constatée par l'apparition de nombreux pics supplémentaires de diffraction disséminés sur l'ensemble du diagramme.

Les spectres FTIR confirment l'influence de l'euporium sur les caractéristiques de la phase apatitique. En effet on constate un élargissement des bandes d'absorptions avec l'augmentation de la quantité d'euporium introduite initialement. Cependant l'apparition de bandes d'absorption IR additionnelles est observable à partir d'un rapport atomique Eu/(Ca+Eu) initial de 2,5%. En effet on remarque que les spectres IR sont caractéristiques d'une apatite phosphocalcique mal cristallisée pour un rapport atomique Eu/(Ca+Eu) initial compris entre 0% et 2%, alors qu'au-delà de 2% on constate des bandes additionnelles vers 980 et 536 cm⁻¹ proches des bandes phosphates. Nous reviendrons un peu plus tard dans cette section sur l'attribution possible de ces bandes.

En révélant des premiers changements notables de composition des suspensions dès un rapport atomique initial Eu/(Ca+Eu) de 2%, contre 2,5% par DRX, ces résultats soulignent la sensibilité de techniques basées sur l'absorption infrarouge par rapport à la diffraction des rayons X, du moins dans le cas de composés de faible cristallinité.

Il est également intéressant de noter que pour le composé à 100% (c'est-à-dire préparé en absence de calcium) on constate par spectroscopie FTIR une absence quasi-totale d'AEP (Figure 39). En effet on ne distingue que très faiblement la bande à 754 cm⁻¹ qui caractérise la liaison P-O-(C) dans la molécule d'AEP seul [Chane-ching et al (2007)]. Ceci tendrait à suggérer que l'AEP ne complexe pas ou peu l'euporium dans nos conditions opératoires. C'est d'ailleurs ce que nous avons déjà souligné dans la partie B. Dans ces conditions on peut donc émettre l'hypothèse que les bandes d'absorptions additionnelles que nous observons au delà de 2% sont directement liées à la présence de l'euporium. Dans ce contexte, nous nous sommes intéressés aux deux phases les plus couramment rencontrées en milieu phosphaté et/ou basique : EuPO₄.H₂O et Eu(OH)₃.

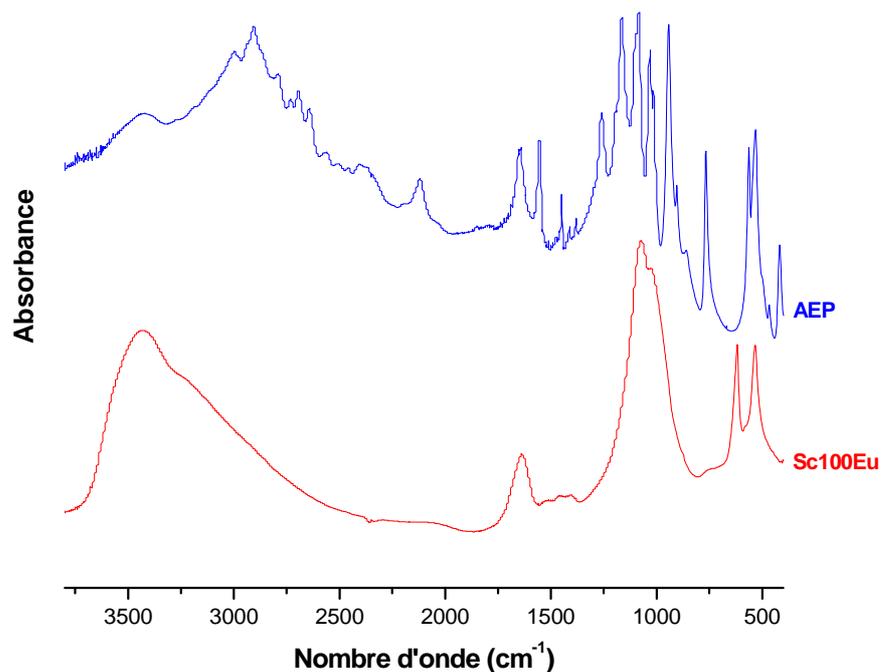


Figure 39 : Spectre FTIR d'une suspension colloïdale avec un rapport atomique Eu/(Ca+Eu) initial de 100% (Sc100Eu) et de la molécule d'AEP

Doat (2003) avait en effet mis en évidence la présence de ces phases, dans ses conditions opératoires hydro-alcooliques. Afin de vérifier si ces phases étaient également présentes dans notre cas, au-delà d'une teneur limite en europium dans le milieu, nous avons synthétisé séparément ces deux phases et les avons caractérisées par diffraction des rayons X et spectroscopie FTIR.

- Synthèse de $\text{EuPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$:

Ce composé a été synthétisé en dissolvant un large excès de EuCl_3 (2,93 g) dans 10 ml d'eau désionisée à température ambiante. Par la suite 2,11 g de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ ont été rajoutés à la solution de EuCl_3 sous agitation magnétique. Le mélange a été laissé à agiter pendant 4 heures à température ambiante. Le précipité obtenu a été ensuite lavé 6 fois par centrifugation à l'eau désionisée, puis lyophilisé pour être caractérisé dans un premier temps par diffraction des rayons X afin de vérifier la nature de la phase formée (Figure 40).

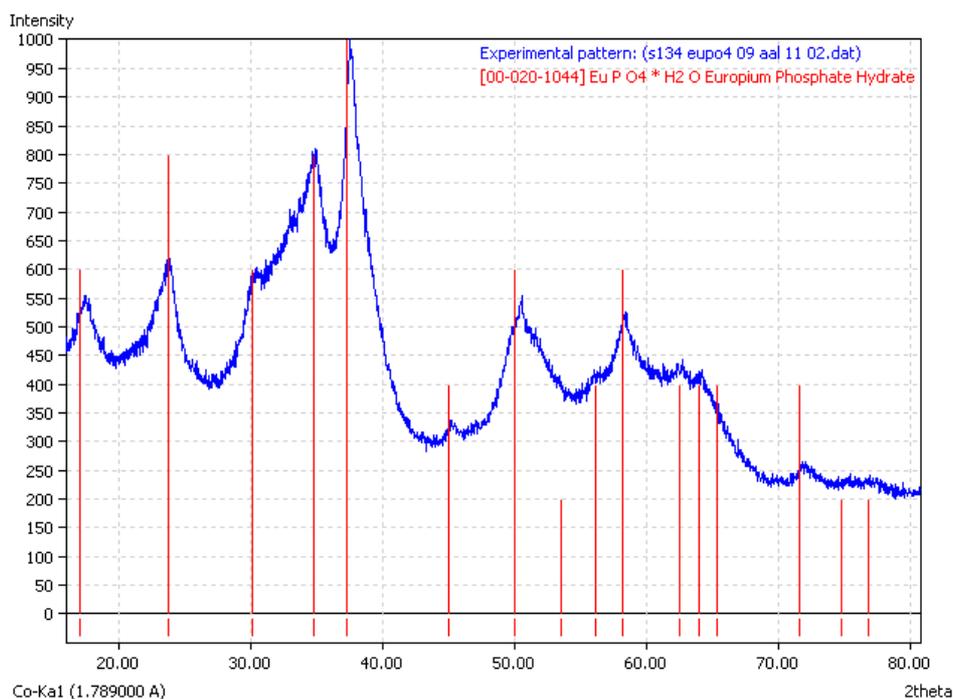


Figure 40 : Diagramme de diffraction de rayons X du EuPO₄·H₂O préparé

Nous avons constaté que le précipité formé ici correspondait bien à la phase escomptée, EuPO₄·H₂O. Par la suite nous avons également enregistré son spectre FTIR (Figure 41).

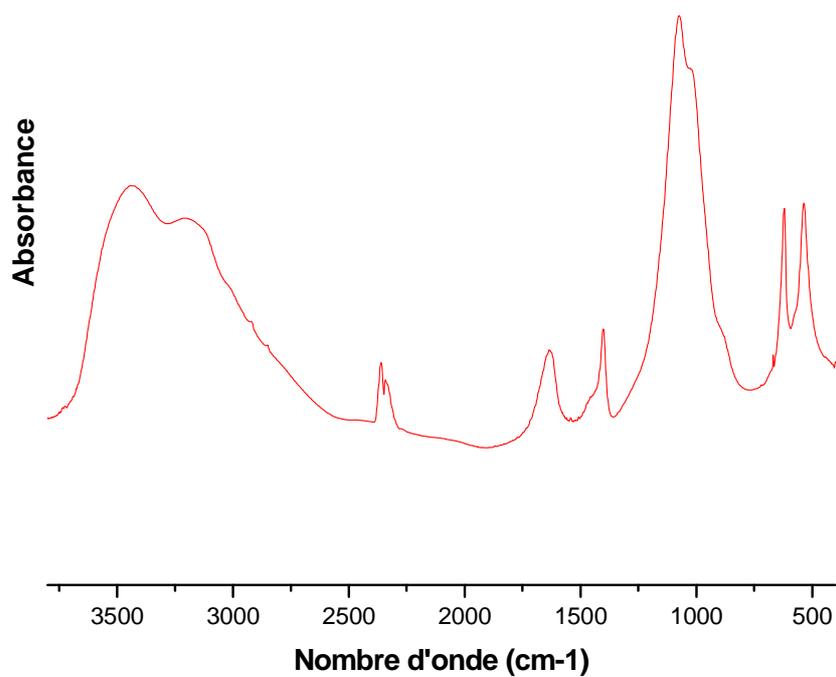
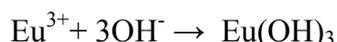


Figure 41 : Spectre FTIR du EuPO₄·H₂O préparé

- Synthèse de $\text{Eu}(\text{OH})_3$:

Contrairement à $\text{EuPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, nous n'avons pas trouvé dans la littérature de protocole de synthèse de $\text{Eu}(\text{OH})_3$. Nous avons donc utilisé ici une méthode d'alcalinisation, consistant à ajouter une solution concentrée d'ammoniaque NH_4OH dans une solution de $\text{Eu}(\text{NO}_3)_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. Il s'agissait ainsi de précipiter $\text{Eu}(\text{OH})_3$ suivant l'équation :



Nous avons dissous 0,5 mmol de $\text{Eu}(\text{NO}_3)_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ dans 83 ml d'eau désionisée à température ambiante. Par la suite nous avons rajouté progressivement 3 ml de NH_4OH concentré sous agitation magnétique. Contrairement à $\text{EuPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ le précipité n'a pas pu être correctement lavé dû à sa dissolution immédiate dans l'eau désionisée. En tenant compte de cette difficulté nous avons lyophilisé le précipité et nous l'avons caractérisé dans un premier temps par diffraction des rayons X pour déterminer la nature de la phase formé qui s'est avérée être bien du $\text{Eu}(\text{OH})_3$ (Figure 42).

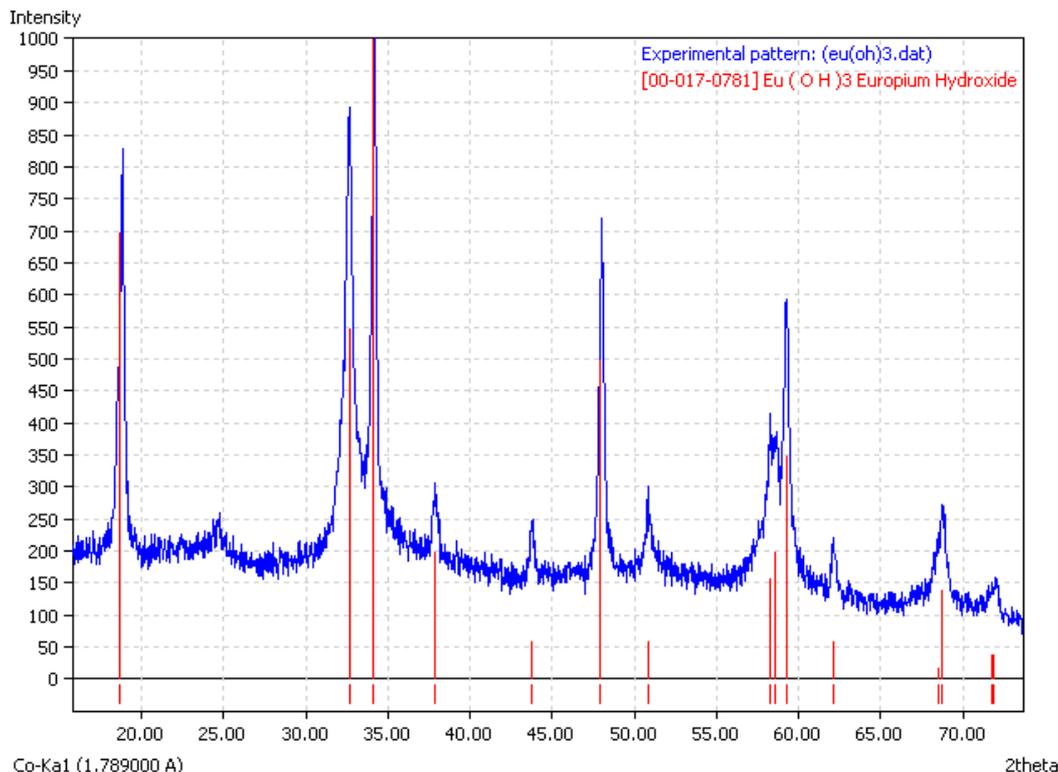


Figure 42 : Diagramme de diffraction de rayons X du $\text{Eu}(\text{OH})_3$ préparé

Nous avons par la suite enregistré le spectre FTIR de ce précipité. Malgré la présence de nitrate dû à un mauvais lavage, ce spectre nous donne néanmoins « l’empreinte » du composé $\text{Eu}(\text{OH})_3$ qui nous sera utile pour l’identification de phase(s) additionnelle(s) potentielles.

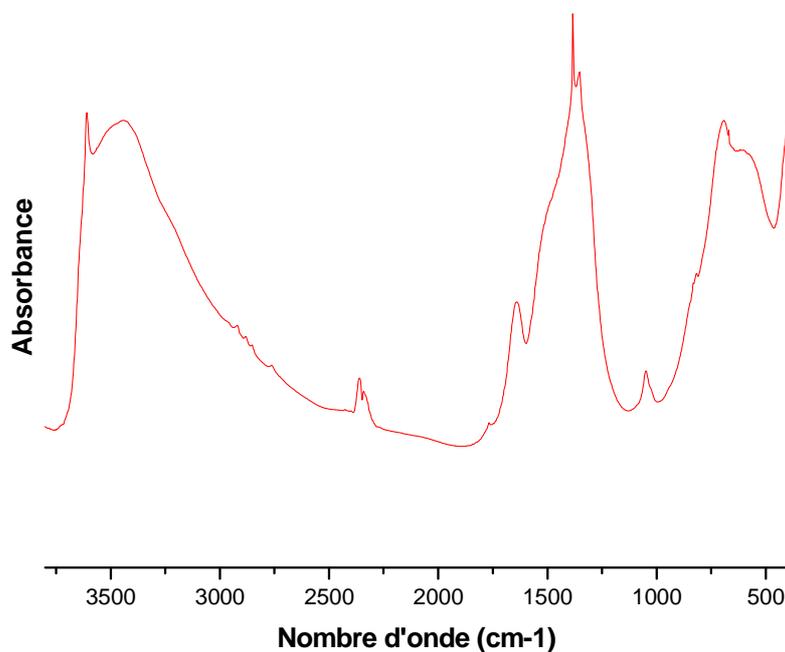


Figure 43 : Spectre FTIR du $\text{Eu}(\text{OH})_3$ préparé

A la suite de ces deux synthèses annexes, nous avons comparé les diagrammes de diffractions des rayons X (Figure 44) ainsi que les spectres IR (Figure 45) des composés préparés au diagramme XRD et au spectre FTIR de la suspension colloïdale synthétisée avec 100% d’euporium (rapport atomique $\text{Eu}/(\text{Ca}+\text{Eu})$ initial)), c’est-à-dire en absence de calcium.

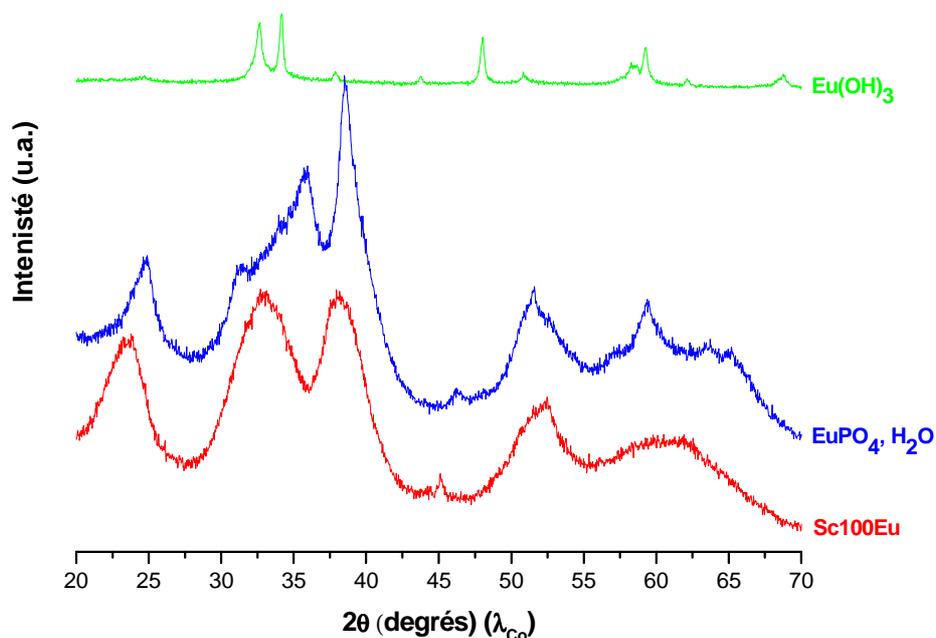


Figure 44 : Diagramme de diffraction de rayons X de la Sc100Eu (rapport atomique Eu/(Ca+Eu) initial), et des composés de référence EuPO₄·H₂O et de Eu(OH)₃

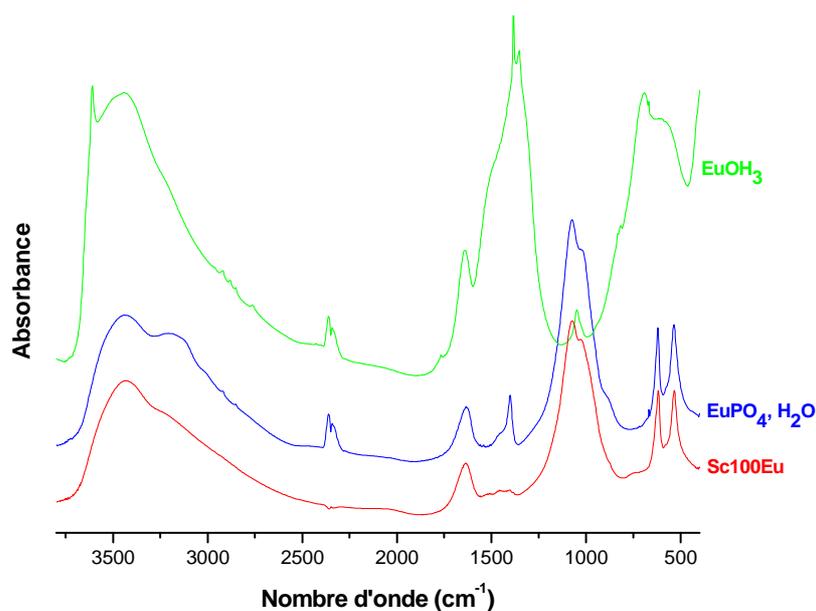


Figure 45 : Spectre FTIR d'une suspension colloïdale dopée à 100% en europium (rapport atomique Eu/(Ca+Eu) initial), de EuPO₄·H₂O et de Eu(OH)₃

On constate par diffraction des rayons X (Figure 44) que le diagramme de Eu(OH)₃ ne correspond pas à celui de l'échantillon à 100%, ce qui est également confirmé par spectroscopie FTIR (Figure 45). Concernant EuPO₄·H₂O on remarque par diffraction des rayons X que l'allure du diagramme est similaire à celui obtenu pour l'échantillon Sc100Eu,

avec cependant un léger décalage dans la position des pics. Il semble raisonnable d'expliquer ces petites différences de positions des pics entre $\text{Eu}(\text{PO}_4)$, H_2O et l'échantillon Sc100Eu par la différence d'état de cristallinité entre les deux échantillons, liée à des conditions de synthèse différentes. En effet on remarque par spectroscopie FTIR que toutes les bandes d'absorption de l'échantillon Sc100Eu correspondent à celles de $\text{EuPO}_4, \text{H}_2\text{O}$. Par ailleurs les dosages chimiques que nous avons réalisés sur l'échantillon Sc100Eu ont révélé un rapport molaire Eu/PO_4 de 0,96 proche du rapport théorique de $\text{EuPO}_4, \text{H}_2\text{O}$. Il semble donc que les pics supplémentaires visibles par diffraction des rayons X au-delà de 2% initial en Eu (voir Figure 37) correspondent principalement à du phosphate d'euporium monohydraté. En revanche, dans nos conditions expérimentales, nous n'avons pas identifié de l'hydroxyde d'euporium $\text{Eu}(\text{OH})_3$ comme phase secondaire.

En conclusion de cette étude, on peut avancer que la limite de substitution de Ca^{2+} par Eu^{3+} est proche de 2% (rapport atomique $\text{Eu}/(\text{Ca}+\text{Eu})$ initial). Au-delà il y a apparition d'une seconde phase identifiée comme du phosphate d'euporium monohydraté de formule $\text{EuPO}_4, \text{H}_2\text{O}$.

Nous avons par la suite de ce travail réalisé des dosages chimiques sur les suspensions colloïdales synthétisées avec un rapport atomique compris entre 0 et 2%, en particulier en vue de déterminer la teneur réelle en euporium des échantillons.

II) Etude de la composition chimique des suspensions colloïdales

Nous avons dosé à ce stade la quantité de calcium, d'euporium, d'orthophosphate et d'AEP sur les poudres obtenues après dialyse et lyophilisation des suspensions colloïdales pour un taux de dopage initial entre 0 et 2%. La teneur globale en ions orthophosphate a été dosée par colorimétrie (cf annexe), tandis que celles en ions calcium et euporium ont été déterminées par ICP-AES (cf annexe). La quantité d'AEP fixée sur les nanoparticules a par ailleurs été évaluée par dosages élémentaires C, H, N. Le Tableau 14 suivant reporte les résultats des dosages chimiques ramenés à 100 mg de poudre.

N° de ligne	Données	Sc0Eu	Sc1Eu	Sc1,5Eu	Sc2Eu
(1)	rapport atomique Eu/(Ca+Eu) initial (en %)	0	1	1,5	2
(2)	mmol de Ca ²⁺ dans 100 mg (de solide)	0,805	0,776	0,772	0,708
(3)	mmol de Eu ³⁺ dans 100 mg	0	0,011	0,016	0,020
(4)	rapport atomique Eu/(Ca+Eu) final (en %)	0	1,40	2,03	2,75
(5)	mmol d'orthophosphates minéraux (PO ₄ ³⁻ + HPO ₄ ²⁻)	0,568	0,493	0,407	0,476
(6)	rapport atomique (Ca+Eu)/P final (en %, en ne considérant que les phosphates minéraux)	1,42	1,60	1,94	1,53
(7)	nombre de moles d'apatite dans 100 mg (en mmol), [déterminé en considérant 6 moles de phosphates par mole d'apatite]	0,0947	0,0822	0,0679	0,0793
(8)	% massique N (déterminé par dosage C,H,N)	1,07	-	0,60	0,80
(9)	masse d'AEP dans 100 mg (en mg)	10,7	-	6,0	8,0
(10)	nombre de moles d'AEP dans 100 mg (en mmol)	0,076	-	0,043	0,057
(11)	rapport molaire AEP/apatite final	0,80	-	0,63	0,72

Tableau 14 : Composition chimique des suspensions colloïdales d'apatite dopée entre 0 et 2% rapport atomique Eu/(Ca+Eu) initial

Ces dosages chimiques indiquent notamment que le rapport atomique Eu/(Ca+Eu) final (cf ligne 4) dans les nanoparticules est supérieur dans tous les cas, d'environ 40%, au rapport atomique Eu/(Ca+Eu) initialement introduit dans la solution A de synthèse (cf ligne 1). Ces résultats tendent donc à montrer que l'euprium s'incorporerait de manière préférentielle au calcium dans la phase apatitique pendant le processus de synthèse.

Un second résultat a trait au rapport atomique (Ca+Eu)/P final pour la phase apatitique (cf ligne 6), caractérisant la (non)stœchiométrie de cette phase. Celui-ci se situe à une valeur globalement proche de 1,50 (Figure 46). Cette valeur moyenne inférieure à 1,67 (qui correspond à l'HAP stœchiométrique) confirme le caractère non-stœchiométrique de la phase apatitique en présence, que nous avons déjà souligné par diffraction des rayons X et spectroscopie IR, et par conséquence son caractère biomimétique.

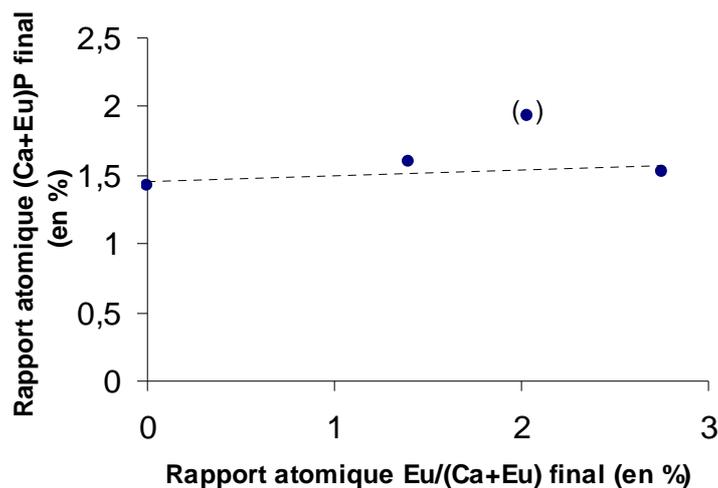


Figure 46 : Evolution du rapport atomique (Ca+Eu)/P final (en %) en fonction du rapport atomique Eu/(Ca+Eu) final (en %)

Notons en revanche que, contrairement au cas d'apatites phosphocalciques non colloïdales où la distribution des orthophosphates sous les formes HPO_4^{2-} et PO_4^{3-} peut généralement être évaluée après calcination à 600°C (menant à la condensation des ions HPO_4^{2-} en ions pyrophosphates $\text{P}_2\text{O}_7^{4-}$ non dosables par la technique colorimétrique), au contraire dans notre cas la présence d'AEP n'a pas permis cette détermination additionnelle compte tenu d'une décomposition partielle des molécules d'AEP à 600°C (menant à des espèces chimiques phosphatées susceptibles d'interagir avec le système).

Enfin, le rapport molaire AEP/apatite final pour les nanoparticules (voir Tableau 14, ligne 11) se situe dans la gamme 0,60-0,80 pour toutes les suspensions analysées (rapport correspondant à 23% de la quantité d'AEP introduite dans le milieu de synthèse). Une analyse plus détaillée de la variation de ce rapport en fonction du rapport atomique Eu/(Ca+Eu) final (Figure 47) indique cependant une tendance légèrement décroissante. Une telle variation peut probablement être reliée à la substitution croissante d'ions Ca^{2+} par des ions Eu^{3+} , menant à une quantité plus faible d'ions Ca^{2+} disponibles pour former les complexes de surface entre Ca^{2+} et AEP $^-$.

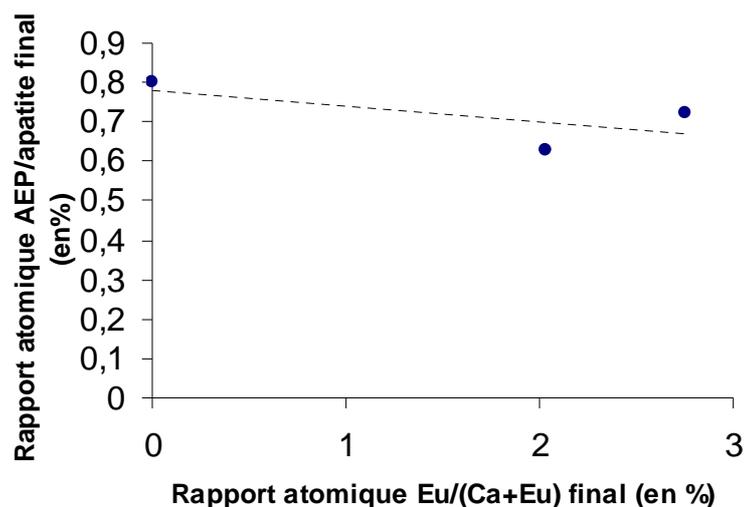


Figure 47 : Rapport molaire AEP/apatite final (en %) en fonction du rapport molaire initial Eu/(Ca+Eu) (en %)

En marge des résultats de dosages chimiques reportés et commentés ci-dessus (Tableau 14), des analyses par microscopie Raman ont été réalisées ponctuellement sur les suspensions colloïdales dialysées et lyophilisées, en particulier dans le but d'examiner le domaine spectral relatif aux ions OH^- apatitiques (difficilement détectables par spectroscopie FTIR à cause de la présence d'eau dans le système). Les analyses menées sur les suspensions correspondant aux dopages initiaux en europium de 0, 1, 1,5 et 2% molaires ont indiqué la présence d'ions OH^- apatitiques (bande à 3572 cm^{-1}) dans tous les cas, bien qu'en faible quantité. Bien qu'une détermination quantitative des OH^- s'avère délicate par simple utilisation de la technique Raman, nos observations nous ont néanmoins montré une diminution du rapport d'intensité $I(\text{OH})/I\nu_1(\text{PO}_4)$ entre les bandes Raman des ions OH^- et la bande due au mode de vibration $\nu_1(\text{PO}_4)$ de la phase apatitique, témoignant qualitativement d'une diminution de la teneur en ions OH^- de la phase apatitique en présence d'europium.

A la suite de ces dosages, nous nous sommes intéressés aux mécanismes de substitution d'ions bivalents Ca^{2+} par des ions trivalents Eu^{3+} dans la structure apatitique. Plusieurs mécanismes peuvent en effet être théoriquement avancés. Notons cependant que les mécanismes rencontrés dans la littérature ont généralement trait à des apatites synthétisées à haute température ($\geq 1000^\circ\text{C}$) ou dont la synthèse impliquait une étape à haute température.

En absence d'ions monovalents (ex : Na⁺, K⁺...) ou tétravalents (silicates...), quatre mécanismes distincts peuvent a priori être proposés (ou la combinaison de plusieurs de ces mécanismes) :

- **mécanisme 1** : $3 \text{Ca}^{2+} \rightarrow 2 \text{Eu}^{3+} + \square_{\text{Ca}}$
- **mécanisme 2** : $\text{Ca}^{2+} + \text{HPO}_4^{2-} \rightarrow \text{Eu}^{3+} + \text{PO}_4^{3-}$
- **mécanisme 3** : $\text{Ca}^{2+} + \square_{\text{OH}} \rightarrow \text{Eu}^{3+} + \text{OH}^-$
- **mécanisme 4** : $\text{Ca}^{2+} + \text{OH}^- \rightarrow \text{Eu}^{3+} + \text{O}^{2-}$

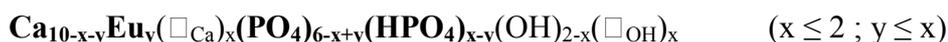
Le premier mécanisme est décrit par le « remplacement » de 3 Ca²⁺ par 2 Eu³⁺ et la création de lacune en site Ca²⁺ de telle manière à respecter l'électronéutralité du cristal. Concernant le deuxième mécanisme, l'incorporation de Eu³⁺ dans la structure apatitique est accompagnée par le déprotonation de certains HPO₄²⁻ par PO₄³⁻. La substitution de Ca²⁺ par Eu³⁺ peut également s'accompagner d'une incorporation additionnelle d'ions OH⁻ dans les tunnels apatitiques (mécanisme 3) ou encore par la déprotonation d'ions OH⁻ pour donner des ions oxydes O²⁻ (mécanisme 4), la présence d'ions oxydes ne pouvant a priori pas être écartée compte tenu de la force relativement importante de la liaison Eu-O [Lakshminarasimhan (2004), Long (2008)]. Notons par ailleurs que les études de luminescence menées sur ces mécanismes [Boyer (2000)] ont montré que l'ion Eu³⁺ se plaçait de préférence en site Ca(II) du calcium plutôt qu'en sites Ca(I).

En appliquant chacun de ces mécanismes de substitution Ca/Eu à la formule générale d'une apatite phosphocalcique biomimétique $(\text{Ca}_{10-x}\square_x(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{HPO}_4)_x(\text{OH})_{2-x}\square_x)$ avec $0 \leq x \leq 2$, nous obtenons les formules génériques suivantes :

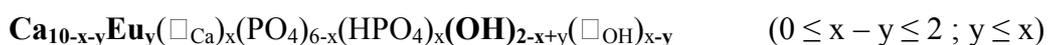
- Dans le cas du mécanisme 1 :



- Dans le cas du mécanisme 2 :



- Dans le cas du mécanisme 3 :



- Dans le cas du mécanisme 4 :



Pour tenter d'identifier le ou les mécanisme(s) d'incorporation de Eu^{3+} dans nos suspensions colloïdales à base d'apatite, nous avons envisagé ces mécanismes dans le cas d'apatites standards dopées à Eu^{3+} avec un rapport atomique $\text{Eu}/(\text{Ca}+\text{Eu})$ initial compris entre 0 et 2% afin de s'affranchir de difficultés de caractérisation supplémentaires associées à la présence de l'AEP. En effet comme nous l'avons évoqué dans la partie B, l'AEP ne semble pas avoir d'affinité particulière avec Eu^{3+} , ce qui nous laisse raisonnablement penser que cette étude réalisée sur des apatites standards pourra être extrapolée aux suspensions colloïdales.

Dans chaque cas la quantité de Ca, Eu et P a été déterminée par dosages chimiques en utilisant les mêmes techniques que pour les suspensions colloïdales (Tableau 15).

Rapport $\text{Eu}/(\text{Ca}+\text{Eu})$ initial en solution (%)	Rapport $(\text{Ca}+\text{Eu})/\text{P}$ dans le solide ^[a]	Teneurs cationiques dans 100 mg de solide		Rapport molaire $\text{Eu}/(\text{Ca}+\text{Eu})$ expérimental dans le solide (%)	Rapport molaire $\text{Eu}/(\text{Ca}+\text{Eu})$ calculé ^[b] pour le solide (%)
		Ca (mmol)	Eu (mmol)		
0	1,66 ±0,01	0,951 ±0,029	0	0	0
1,00±0,005	1,60 ±0,01	0,903 ±0,027	0,017 ±0,001	1,9 ±0,2	2,04 ±0,13
1,50±0,005	1,61 ±0,01	0,882 ±0,026	0,026 ±0,001	2,9 ±0,2	3,03 ±0,13
2,00±0,005	1,57 ±0,01	0,838 ±0,025	0,036 ±0,001	4,1 ±0,1	4,05 ±0,13

^[a] évalué à partir des analyses chimiques

^[b] en supposant que tous les ions Eu^{3+} présents dans le mélange initial ont réagi

Tableau 15 : Composition chimique des apatites non colloïdales préparées à partir de 0-2% initial en europium (par rapport au calcium)

Nous constatons que le rapport $(\text{Ca}+\text{Eu})/\text{P}$ expérimental décroît au fur et à mesure que le taux de dopage en europium augmente. Ce résultat peut vraisemblablement alors être attribué à un effet d'inhibition de croissance joué par l'europium (comme cela a déjà été constaté dans la littérature avec d'autres ions tels que Mg^{2+} , CO_3^{2-} [Campbell et al. (1991)]). Notons en revanche que la teneur réelle en europium dans ces échantillons s'est avérée dans tous les cas inférieure à la teneur initiale dans le milieu réactionnel, mettant en évidence l'incorporation préférentielle de l'europium déjà mentionnées. Afin d'évaluer cet effet, nous avons calculé le rapport $\text{Eu}/(\text{Ca}+\text{Eu})$ que présenterait le solide si tous les ions Eu^{3+} présents dans le milieu avaient effectivement été incorporés dans le solide. Ce calcul représente la dernière colonne du Tableau 15. Il est très intéressant alors de constater que le rapport ainsi calculé est très proche des valeurs expérimentales déterminées par dosages chimiques. Ce résultat permet

ainsi de quantifier cette incorporation préférentielle de l'euporium par rapport au calcium dans la phase apatitique.

Nous avons ensuite déterminé la formule chimique que présenterait chaque échantillon si l'incorporation de l'euporium suivait respectivement l'un puis l'autre des 4 mécanismes possibles de substitution cationique ; et ce afin de valider ou invalider éventuellement certains de ces mécanismes. Néanmoins, nous avons constaté que chacun des 4 mécanismes pouvait expliquer les évolutions de composition chimiques et de rapports molaires $\text{Eu}/(\text{Ca}+\text{Eu})$ et $(\text{Ca}+\text{Eu})/\text{P}$ observés expérimentalement. Il n'a donc pas été possible, à ce stade, de discriminer les mécanismes qui demeurent tous potentiellement valables. Ceci est par exemple illustré dans le cas de l'échantillon $\text{As}_{1,5}\text{Eu}$ (Tableau 16), correspondant à 1,5%Eu initial par rapport au calcium (valeur expérimentale : 2,9% Eu).

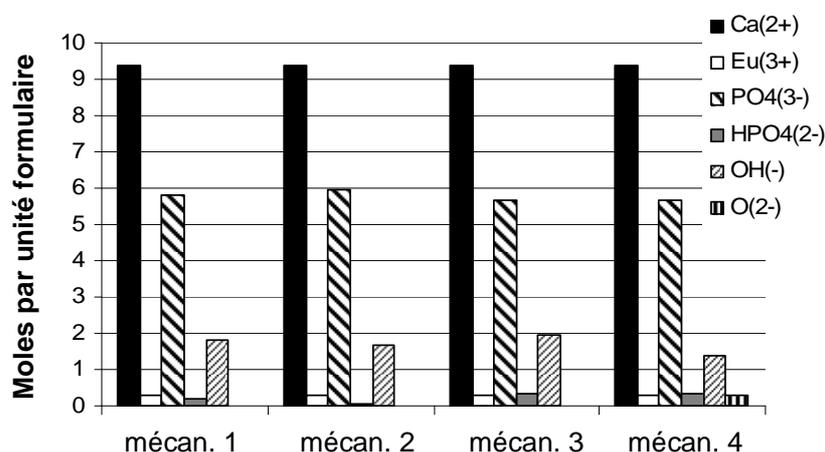


Tableau 16 : Evaluation des teneurs ioniques pour $\text{As}_{1,5}\text{Eu}$ respectivement dans l'hypothèse des 4 mécanismes de substitution cationique $\text{Eu}^{3+}/\text{Ca}^{2+}$

III) Etude des propriétés de luminescence de suspensions colloïdales d'apatite phosphocalcique dopée à l'euporium Eu^{3+}

Comme nous l'avons évoqué à la fin du chapitre bibliographique, les terres rares présentent plusieurs avantages (excitation dans le visible ou proche du domaine du visible), durée de vie de luminescence relativement longue (de l'ordre de la milliseconde...) par rapport à des fluorophores conventionnels tels que des molécules organiques comme la

rhodamine ou la fluorescéine. Dans cette partie nous avons voulu savoir si l'on retrouvait par des mesures de spectrofluorométrie les spectres d'excitation et d'émission caractéristiques de l'ion europium Eu^{3+} dont la présence dans nos nanoparticules d'apatite colloïdale a été démontrée dans la partie B de ce chapitre. A l'issue de ces mesures nous avons également souhaité mesurer la durée de vie de luminescence des nanoparticules afin de savoir si celles-ci pouvaient être utilisées en microscopie confocale en temps retardé.

Avant de présenter les résultats expérimentaux obtenus directement sur des suspensions colloïdales (dialysées) nous allons dans ce qui suit rappeler les propriétés de luminescence de terres rares.

III-1) Rappels sur les propriétés de luminescence des terres rares

III-1-a) Définition de la luminescence

La luminescence peut être définie comme la capacité qu'ont certaines substances à réémettre sous forme de photons d'énergie $E = h\nu$ d'origine non thermique (par opposition à l'incandescence qui n'est pas un phénomène de luminescence) une partie de l'énergie absorbée au cours d'une excitation (Figure 48). Ce retour à l'état fondamental peut se faire de manière directe en émettant un photon d'énergie égale à celle du photon absorbé (mode 1, Figure 48), ou encore de façon indirecte en passant par des états d'énergies intermédiaires (mode 2) menant alors à l'émission de plusieurs photons.

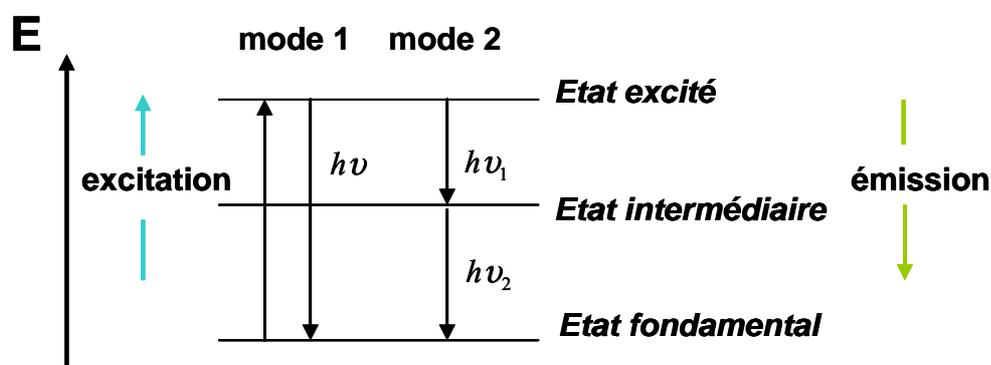


Figure 48 : Schéma de principe de la luminescence

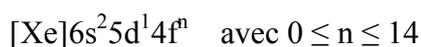
III-1-b) Rappels sur les terres rares

Les « terres rares » contrairement à leur dénomination sont des éléments assez répandus : leur concentration globale dans la croûte terrestre est de l'ordre de 0,016%, c'est-à-dire aussi élevée que celle du zinc, dix fois plus que celle du plomb, mille fois plus que celle de l'argent. Mais en raison de leur dispersion à la surface du globe, leur relative abondance n'a été mise en évidence que progressivement, au fur et à mesure que les méthodes de détection et d'analyse se sont perfectionnées, et que la recherche de leurs minerais s'est développée.

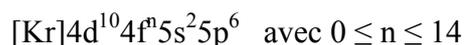
C'est au cours du XVIII^{ème} siècle que débuta la découverte de ces éléments : Cronstedt, chimiste Suédois, découvrit en 1752 un nouveau minerai très dense ; un peu plus tard, en 1794, un chimiste finlandais, Gadolin, découvrit lui aussi un minerai noir, dense et décida de le nommer « oxyde d'ytterbium » du nom du lieu de découverte (Ytterby en Suède). Cette recherche prit fin 150 plus tard avec la découverte de la dernière terre rare, le prométhium en 1950.

Le groupe des terres rares est constitué par les lanthanides Ln (15 éléments du lanthane (Z= 57) au lutecium (Z=71)), alliés à l'yttrium (Z=39) et au scandium (Z=21), ces deux derniers éléments présentant des propriétés chimiques très voisines de celles des lanthanides ([Templeton et al. (1954)], Tableau 17).

La configuration électronique des lanthanides s'écrit :



Les ions lanthanides trivalents Ln^{3+} relatifs à chacun d'entre eux sont alors caractérisés par la configuration électronique suivante :



Numéro atomique Z	Nom	Symbole	Configuration électronique Ln	Configuration électronique Ln ³⁺	Rayon ionique* Ln ³⁺ (Å)
57	Lanthane	La	[Xe]5d ¹ 6s ²	[Xe] 4f ⁰	1,061
58	Cérium	Ce	[Xe]4f ¹ 5d ¹ 6s ²	[Xe] 4f ¹	1,034
59	Praséodyme	Pr	[Xe]4f ³ 6s ²	[Xe] 4f ²	1,013
60	Néodyme	Nd	[Xe]4f ⁴ 6s ²	[Xe] 4f ³	0,995
61	Prométhéum	Pm	[Xe]4f ⁵ 6s ²	[Xe] 4f ⁴	0,979
62	Samarium	Sm	[Xe]4f ⁶ 6s ²	[Xe] 4f ⁵	0,964
63	<u>Europium</u>	Eu	[Xe]4f⁷6s²	[Xe] 4f⁶	0,950
64	Gadolinium	Gd	[Xe]4f ⁷ 5d ¹ 6s ²	[Xe] 4f ⁷	0,938
65	Terbium	Tb	[Xe]4f ⁹ 6s ²	[Xe] 4f ⁸	0,923
66	Dysprosium	Dy	[Xe]4f ¹⁰ 6s ²	[Xe] 4f ⁹	0,908
67	Holmium	Ho	[Xe]4f ¹¹ 6s ²	[Xe] 4f ¹⁰	0,894
68	Erbium	Er	[Xe]4f ¹² 6s ²	[Xe] 4f ¹¹	0,881
69	Thulium	Tm	[Xe]4f ¹³ 6s ²	[Xe] 4f ¹²	0,869
70	ytterbium	Yb	[Xe]4f ¹⁴ 6s ²	[Xe] 4f ¹³	0,858
71	Lutécium	Lu	[Xe]4f ¹⁴ 5d ¹ 6s ²	[Xe] 4f ¹⁴	0,848

* [Templeton et al. (1954)]

Tableau 17 : Configuration électronique des lanthanides et de leurs ions trivalents, ainsi que de leurs rayons ioniques.

Dans la classification périodique les lanthanides occupent avec le lanthane (Ln) une seule et même case (6^{ième} période, groupe IIIB). Cette particularité résulte de leur structure électronique, qui est identique pour les couches extérieures et ne diffère d'un élément au suivant que par addition d'un électron dans la couche profonde 4fⁿ. C'est d'ailleurs à ce titre que les lanthanides sont également appelés « éléments de transition internes ». On peut également rappeler que ces électrons présents dans cette couche interne, ont une disposition spatiale telle qu'ils ne peuvent pas assurer un effet d'écran notable vis-à-vis de l'attraction des électrons périphériques par le noyau. Il en résulte une diminution notoire du rayon atomique au sein de la série : on parle d'ailleurs de « contraction lanthanide ».

Comme nous l'avons rappelé au début de cette section, les ions lanthanides ont la caractéristique d'avoir des spectres optiques présentant des raies fines. Cette constatation n'a pu être expliquée qu'au début du XX^{ième} par Becquerel [Becquerel (1906)] : les raies fines observées sont dues à des transitions intra-configurationnelles, rendues possible grâce à la couche électronique interne 4fⁿ incomplète. Les électrons présents dans cette couche sont protégés de l'environnement externe par les couches supérieures pleines 5s²5p⁶ qui jouent le rôle d'écran. Par conséquent, ces électrons ne participent pas à la formation de liaisons

chimiques entre le lanthanide et les ligands environnants et un spectre de raies fines est observé dès lors que l'ion lanthanide est irradié par une source visible ou ultraviolette.

La description qualitative et quantitative des propriétés optiques des ces ions impose l'emploi d'un formalisme mathématique et de méthodes de calcul dérivant essentiellement de la mécanique quantique. Dans ce qui suit, nous avons exposé un bref aperçu théorique sur les diagrammes énergétiques des ions des terres rares.

III-1-c) Diagramme d'énergie de l'ion Ln^{3+} libre (illustré avec Eu^{3+})

Pour pouvoir décrire les divers phénomènes influençant les transitions électroniques des ions Ln^{3+} , un hamiltonien (noté H) est introduit, qui satisfait l'équation de Schrödinger :

$$H\Psi = E\Psi$$

où :

- Ψ est une fonction d'onde qui représente la distribution spatiale de l'électron. C'est donc la probabilité de trouver l'électron à un endroit et un temps donnés.

- E est l'énergie.

Cet hamiltonien pour un ion libre ($H_{\text{ion libre}}$) s'écrit comme la somme de trois composantes. A chacune d'elles correspond à une énergie dont l'ordre de grandeur est représenté sur la Figure 49:

$$H_{\text{ion libre}} = H_{\text{configuration}} + H_{\text{répulsion électronique}} + H_{\text{spin-orbite}}$$

où :

- **L'hamiltonien $H_{\text{configuration}}$** représente l'interaction noyau-électron. Il correspond à la somme des énergies cinétiques et potentielles de n électrons. Il a pour effet de séparer la configuration de base $4f^n$ de la première configuration excitée $4f^{n-1}$ de l'ordre de 10^5 cm^{-1} .

- **L'hamiltonien $H_{\text{répulsion électronique}}$** représente la répulsion coulombienne des électrons de la couche 4f. Les moments orbitaux (l_i) et les moments cinétiques de spin (s_i) de chaque électron

de la couche 4f s'ajoutent pour donner respectivement le moment orbital résultant (1) et le moment cinétique de spin (2) :

$$1 : \vec{L} = \sum_i \vec{l}_i$$

$$2 : \vec{S} = \sum_i \vec{s}_i$$

L'hamiltonien $H_{\text{répulsion électronique}}$ a pour effet de décomposer la configuration 4f en différents termes spectraux notés ^{2S+1}L . Le nombre quantique L (associé à \vec{L}) est un nombre entier égal à 0,1,2,3... auquel on fait correspondre respectivement les lettres S, P, D, F. Le nombre quantique S (associé à \vec{S}) peut être un nombre entier ou demi-entier. La multiplicité du terme ^{2S+1}L est donnée par $2S+1$. Chaque terme ^{2S+1}L est $(2S+1)(2L+1)$ fois dégénéré. Les termes 5D et 7F sont ainsi séparés de $2 \cdot 10^4 \text{ cm}^{-1}$ dans le cas de l'ion Eu^{3+} .

- **L'hamiltonien $H_{\text{spin-orbite}}$** correspond à l'interaction magnétique entre le moment orbital \vec{L} et le moment cinétique de spin \vec{S} . Cet hamiltonien décompose chaque terme ^{2S+1}L en $2S+1$ ou $2L+1$ (selon que $S < L$ ou $L < S$) niveau définis par $^{2S+1}L_J$ où J est le nombre quantique associé au vecteur du moment angulaire total $\vec{J} = \vec{L} + \vec{S}$ et vérifie $|L - S| \leq J \leq |L + S|$.

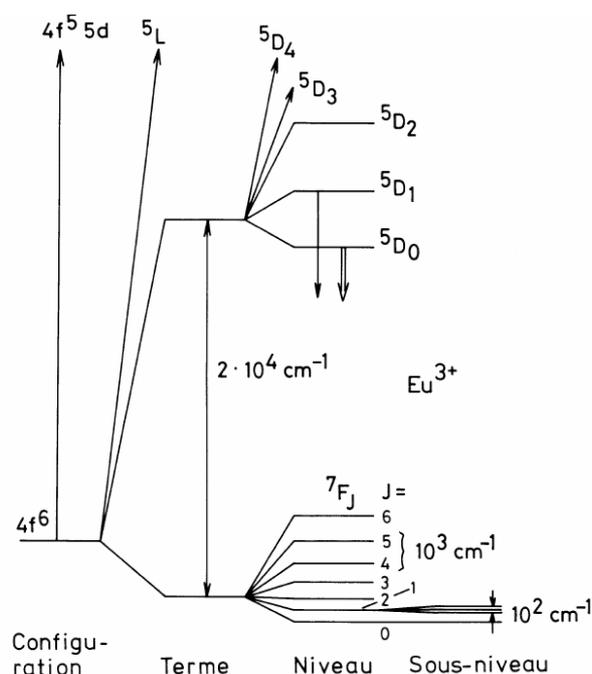


Figure 49 : Diagramme d'énergie de l'ion Eu^{3+} (levées de dégénérescence du niveau $4f^6$ dues aux principaux hamiltoniens intervenant dans la théorie des perturbations)

III-1-d) Diagramme d'énergie de l'ion Ln^{3+} incorporé dans un solide (illustré avec Eu^{3+})

Lorsque l'ion de terre rare est incorporé dans un solide, le champ cristallin (lié à la présence d'autres atomes autour de l'ion) perturbe peu les électrons de la couche 4f à cause des couches externes pleines $5p^6$ et $5s^2$ qui font écran. Les niveaux d'énergie de la plupart des ions des terres rares sont peu dégénérés. Le champ cristallin est alors considéré comme une simple perturbation par rapport aux fortes interactions internes de l'atome que nous venons de rappeler dans le point précédent. Les niveaux d'énergie restent ainsi facilement identifiables et leurs spectres électroniques sont peu modifiés par rapport à des ions libres.

Un autre point est important à souligner. En effet sous l'effet du champ cristallin les niveaux $^{2S+1}L_J$ sont susceptibles de se décomposer en sous-niveaux énergétiques : c'est l'effet Stark (Figure 49). Cette levée de dégénérescence peut être totale ou partielle en fonction de la symétrie du site cristallographique dans lequel l'ion Ln^{3+} se trouve. La dégénérescence maximale des niveaux $^{2S+1}L_J$ est de $(2J+1)$ si n est pair et de $(2J+1)/2$ si n est impair (n étant le nombre d'électron de la couche 4f). Ainsi dans le cas de l'euprium ($n = 6$) les niveaux 5D_0 et 7F_0 n'étant pas décomposés par le champ cristallin ($2J+1=1$) le nombre de raies de la transition $^5D_0 \rightarrow ^7F_0$ donne le nombre maximum de sites cristallographiques ou d'environnements pour Eu^{3+} dans l'échantillon. Rappelons également que le nombre de raies observé pour ces transitions $^5D_J \rightarrow ^7F_J$ peuvent permettent dans certains cas d'accéder à la symétrie ponctuelle correspondant au site cristallographique occupé par Eu^{3+} suivant un ensemble de considérations liées à la théorie des groupes (ainsi, Eu^{3+} peut potentiellement constituer une sonde structurale de choix). En effet, la décomposition d'un niveau, caractérisé par le nombre quantique J , en sous-niveaux M_J dépend directement de la symétrie du site occupé par l'ion dans le cristal, et donc du champ cristallin local. Néanmoins, cette possibilité n'est offerte que dans le cas de sites présentant une symétrie ponctuelle élevée, contrairement aux sites cationiques présents dans la structure apatitique, et ne pourra donc pas être exploitée ici.

III-1-e) Transition entre niveaux

a) Transition radiative

Les transitions électroniques (en excitation ou en désexcitation) entre niveaux sont liées à l'action d'un champ électromagnétique. L'opérateur associé à ce champ se décompose principalement en deux composantes : un terme dipolaire électrique (DE) et un terme dipolaire magnétique (DM). La majorité des transitions électroniques observées sont de nature DE, mais sont cependant interdites entre états de même parité (règle de sélection de Laporte, qui ne sera pas développée en détail ici), par contre les transitions dipolaires magnétiques sont permises. Notons que dans un solide, l'action du champ cristallin sur les électrons f peut être traitée comme une perturbation par rapport aux niveaux énergétique de l'ion libre. Par ailleurs, l'action d'un champ cristallin non centro-symétrique induit un mélange entre les états des configurations $4f^n$ et $4f^{n-1}5d^1$, permettant alors l'observation de transitions dipolaires électriques dites « forcées », qui sont régies par les règles de sélection rappelées dans le Tableau 18 :

Transition DE	Transition DM
$\Delta J = 0, \pm 1, \pm 2, \pm 4, \pm 6$	$\Delta J = 0, \pm 1$
$0 \leftrightarrow 0$ interdite, mais permise dans les groupes de symétrie C_s, C_n, C_{nv}	$0 \leftrightarrow 0$ interdite

Tableau 18 : Règles de sélection des transitions possibles dans une matrice cristalline [Judd (1962) et Ofelt (1962)]

Dans le cas de l'ion Eu^{3+} qui nous intéresse ici, les 3 transitions les plus intenses observées sur les spectres d'émission peuvent être classées de la manière suivante :

Transition ${}^5D_0 \rightarrow {}^7F_0$: dipolaire électrique principalement (DE)

Transition ${}^5D_0 \rightarrow {}^7F_1$: dipolaire magnétique (DM)

Transition ${}^5D_0 \rightarrow {}^7F_2$: dipolaire électrique principalement (DE)

b) Transitions non radiatives

L'ion luminescent Ln^{3+} peut aussi se désexciter de manière non radiative c'est-à-dire sans émission de lumière. Plusieurs processus peuvent intervenir pour concurrencer le phénomène de luminescence, nous allons rappeler celui qui peut se produire dans nos suspensions colloïdales à savoir la relaxation multiphonon.

Ce phénomène apparaît lorsqu'il y a possibilité de couplage entre les niveaux électroniques du lanthanide et les modes vibrationnels, en particulier ceux des oscillateurs X-H (O-H, N-H, C-H), ceux-ci étant reliés au centre luminescent ou situés près de celui-ci.

Les désexcitations non radiatives à partir d'un niveau entraînent une diminution de sa durée de vie d'émission. La durée de vie observée notée τ_{obs} , est plus courte que la durée de vie purement radiative :

$$\frac{1}{\tau_{obs}} = W_r + W_{nr}$$

où W_r et W_{nr} désignent respectivement les probabilités par unité de temps des relaxations radiatives et non radiatives du niveau considéré.

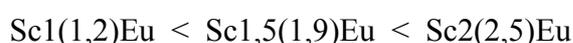
III-1-f) Diagramme d'énergie des ions lanthanides :

Les niveaux énergétiques de la configuration 4f des certains ions lanthanides sont regroupés sur la Figure 50. Pour qu'il y ait une émission lumineuse intense et centrée sur un domaine restreint de longueurs d'ondes λ , il faut que le ΔE (niveau excité - niveau immédiatement inférieur) soit au moins 6000 cm^{-1} (on assimile ici comme il est fait couramment en spectroscopie l'énergie d'un niveau $h\nu$ à un nombre d'onde hc/λ en cm^{-1}). C'est le cas pour Eu^{3+} (depuis $^5\text{D}_0$), Tb^{3+} (depuis $^5\text{D}_4$), Dy^{3+} (depuis $^4\text{F}_{9/2}$), Sm^{3+} (depuis $^4\text{G}_{5/2}$). Lorsque les niveaux énergétiques sont plus proches (Pr^{3+} , Nd^{3+} , Ho^{3+} et Er^{3+}), beaucoup de transitions radiatives se superposent dans le même domaine spectral, et leurs efficacités relatives (en définitive la couleur émise) varient avec l'environnement de l'ion. Cependant si le premier niveau excité est très éloigné de l'état fondamental

Dans ce qui suit nous allons, comme évoqué en introduction de cette section, présenter les résultats expérimentaux relatifs aux aspects de luminescence des suspensions préparées dans ce travail de thèse. Notons que nous avons choisi de réaliser ces mesures de spectrofluorimétrie directement sur les suspensions (après purification) et non sur des poudres pour tenir compte du milieu aqueux dans lequel « baignent » les nanoparticules d'apatite dopée. En effet cela nous permettra notamment de considérer les transitions non radiatives (relaxation multiphonon) qui peuvent avoir lieu. Ainsi ces conditions de mesures nous permettront d'être plus proches du milieu biologique dans lequel seront appliquées ces nanoparticules colloïdales d'apatite.

IV) Spectres d'excitation de suspensions colloïdales d'apatite dopée à l'euporium Eu^{3+}

Le spectre d'excitation a été enregistré entre 200 nm et 600 nm en mesurant l'émission à 612 nm. En effet cette longueur d'onde correspond à la bande d'émission la plus intense de l'euporium et donc à la couleur rouge que nous avons observée lors des tests de présence de l'euporium (cf partie B). La Figure 51 montre des spectres d'excitation caractéristiques de l'ion Eu^{3+} pour trois taux de dopages en euporium (1, 1,5 et 2% Eu initial, correspondant à 1,2 ; 1,9 et 2,5% réels). Signalons en particulier la position de la bande d'absorption la plus intense à 392,8 nm qui correspond à la transition ${}^7\text{F}_0 \rightarrow {}^5\text{L}_6$. De plus, la seconde bande d'absorption moins intense située à 464,2 nm est attribuée à la transition ${}^7\text{F}_0 \rightarrow {}^5\text{D}_2$. Ces bandes démontrent la possibilité d'exciter à basse énergie nos systèmes, dans le domaine du visible (464,2 nm) ou proche du visible (392,8 nm) permettant a priori d'envisager des observations prolongées des tissus biologiques sans les altérer. Les manipulations ayant été effectuées avec les mêmes paramètres opératoires et sur des suspensions en cuves, il est possible de comparer les intensités de luminescence de divers échantillons (par exemple en comparant l'intensité de la raie d'excitation principale). On observe ici une intensité dans l'ordre croissant :



ce qui peut être attribué à l'incorporation croissante de l'ion Eu^{3+} dans la structure apatitique, en accord avec les dosages chimiques. Signalons cependant que l'accroissement de l'intensité du spectre d'excitation est particulièrement important pour la suspension Sc2(2,5)Eu.

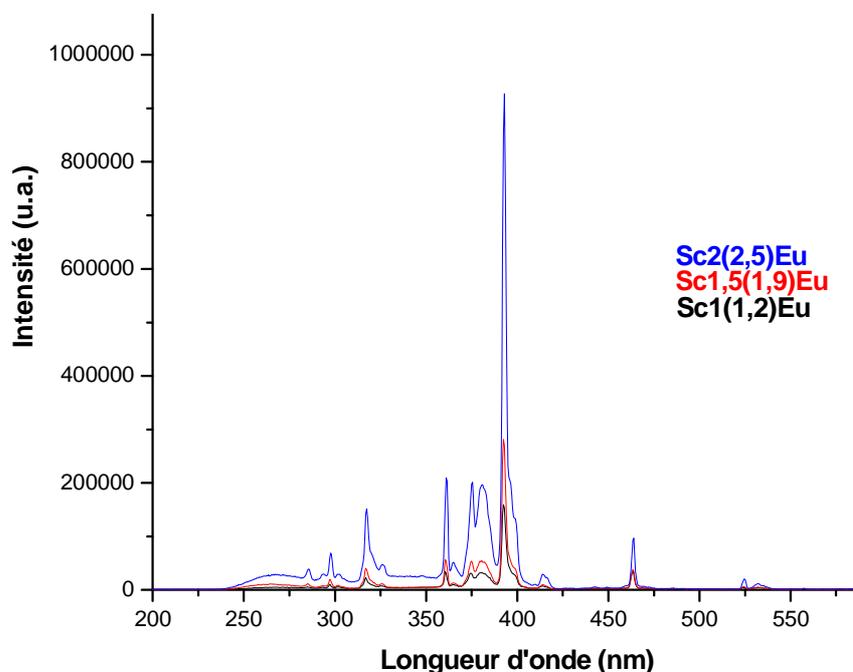


Figure 51 : Spectres d'excitation réalisés sous analyse à 612 nm et à température ambiante de Sc1(1,2)Eu, Sc1,5(1,9)Eu et Sc2(2,5)Eu

V) Spectres d'émission de suspensions colloïdales d'apatite dopée à l'euporium Eu^{3+}

Les spectres d'émission ont été enregistrés sous excitation à 392,8 nm. Les bandes d'émission observées sont facilement attribuables aux transitions $4f \rightarrow 4f$ de la configuration $4f^6$ de l'ion Eu^{3+} (Figure 52). Dans les trois cas, trois domaines peuvent être distingués : 575-580 nm, 583-603 nm, et 605-627 nm correspondant respectivement aux transitions ${}^5\text{D}_0 \rightarrow {}^7\text{F}_0$, ${}^5\text{D}_0 \rightarrow {}^7\text{F}_1$ et ${}^5\text{D}_0 \rightarrow {}^7\text{F}_2$ caractéristiques de l'ion Eu^{3+} . Par ailleurs, de la même manière que pour les spectres d'excitation, on constate une augmentation de l'intensité de luminescence, mesurée dans les mêmes conditions opératoires sur tous les échantillons, avec le taux de dopage en europium.

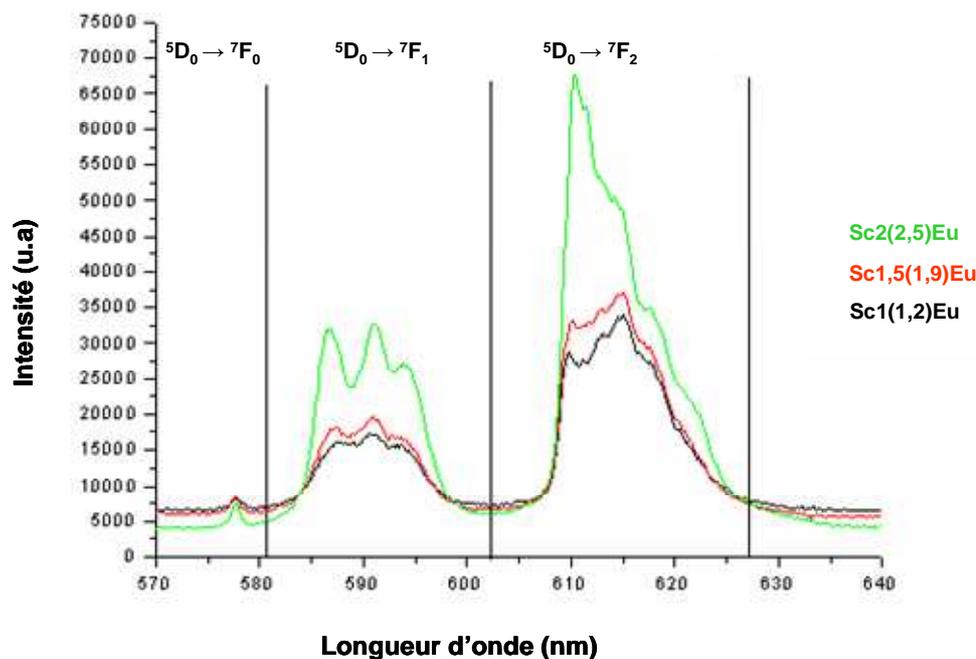


Figure 52 : Spectres d'émission de luminescence obtenus par excitation à 392,8 nm et à température ambiante de Sc1(1,2)Eu, Sc1,5(1,9)Eu et Sc2(2,5)Eu

A la suite de ces premières observations, nous avons porté notre attention sur la transition ${}^5D_0 \rightarrow {}^7F_0$ localisée à 578 nm. En effet comme évoqué dans la partie rappel de cette étude, les deux niveaux de $J = 0$ (5D_0 et 7F_0) ne sont pas dégénérés. Autrement dit, le nombre de raies observées pour cette transition donne le nombre minimum de sites cristallographiques ou, plus généralement, le nombre d'environnements pour Eu^{3+} dans l'échantillon. Dans notre étude, pour les trois cas, la transition ${}^5D_0 \rightarrow {}^7F_0$ présente une seule raie.

Concernant les transitions ${}^5D_0 \rightarrow {}^7F_1$ et ${}^5D_0 \rightarrow {}^7F_2$, celles-ci sont au maximum 3 et 5 fois dégénérées, respectivement (valeur de $2J+1$). Dans tous les cas nous observons dans notre cas trois pics distincts pour la transition ${}^5D_0 \rightarrow {}^7F_1$ et 4 à 5 pics moins bien résolus pour ${}^5D_0 \rightarrow {}^7F_2$. Les pics ne sont pas complètement résolus en raison de leur largeur inhomogène, liée à la faible cristallinité de nos échantillons.

Par comparaison avec les autres échantillons, la suspension colloïdale dopée à 2,5% (rapport atomique $\text{Eu}/(\text{Ca}+\text{Eu})$ final, obtenu à partir d'un rapport $\text{Eu}/(\text{Ca}+\text{Eu})$ de 2% initial) met en évidence des changements significatifs pour chaque transition et tout particulièrement pour la transition ${}^5D_0 \rightarrow {}^7F_2$. Pour la transition ${}^5D_0 \rightarrow {}^7F_1$, les composantes apparaissent mieux résolues que pour les deux autres échantillons, sans modification de longueur d'onde. Pour

$^5D_0 \rightarrow ^7F_2$ au contraire, on note par exemple que les composantes à 610 nm et 624 nm sont très exaltées comparativement aux autres échantillons. Ces observations suggèrent l'existence de modifications dans l'environnement immédiat de l'euporium (tout au moins de certains ions Eu^{3+}), non détectées par diffraction des rayons X ni par spectroscopie FTIR.

Pour tenter de comprendre ces modifications spectrales observées pour Sc2(2,5)Eu, nous avons comparé le spectre d'émission de cet échantillon à celui de composés de référence phosphatés ou hydroxylés, en particulier $EuPO_4 \cdot H_2O$ et $Eu(OH)_3$ préalablement préparés (Figure 53). On constate que la transition $^5D_0 \rightarrow ^7F_0$ dans $EuPO_4 \cdot H_2O$ et $Eu(OH)_3$ apparaît à la même longueur d'onde que $^5D_0 \rightarrow ^7F_0$ dans le composé Sc2(2,5)Eu. Par ailleurs, l'intensité exaltée de la bande à ~ 610 nm dans le massif $^5D_0 \rightarrow ^7F_2$ rappelle plus spécifiquement la bande la plus intense observée dans le cas du phosphate d'euporium (contrairement à l'hydroxyde dont le maximum d'émission se situe à plus haute longueur d'onde, voir Figure 53). Ces observations peuvent probablement être rapprochées des résultats de DRX, spectroscopie FTIR et dosages chimiques obtenus précédemment sur le composé Sc100Eu préparé avec 100% d'euporium (c'est-à-dire en absence de calcium) ayant indiqué dans ce cas la formation d'une phase correspondant à du phosphate d'euporium hydraté. Compte-tenu de l'ensemble de ces considérations, il semble donc raisonnable de supposer que les modifications spectrales observées pour la suspension Sc2(2,5)Eu, en comparaison avec les taux de dopage inférieurs, puissent être reliées à la localisation de certains ions Eu^{3+} dans des environnements phosphatés autres que ceux observés dans l'apatite. De tels environnements phosphatés peuvent a priori soit être présents sous la forme de traces d'une phase secondaire séparée (phosphate d'euporium), soit constituer une couche (discontinue pour ne pas contrecarrer la stabilisation colloïdale de l'AEP) en surface des nanoparticules.

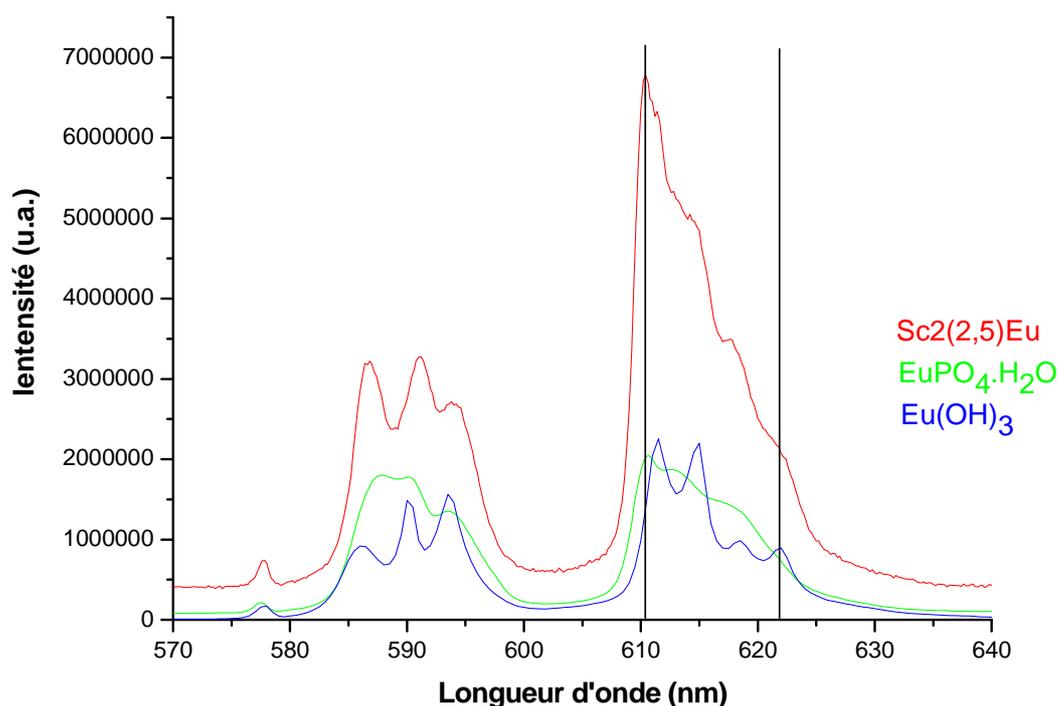


Figure 53 : Spectres d'émission de luminescence obtenus par excitation à 392,8 nm et à température ambiante de Sc₂(2,5)Eu, EuPO₄·H₂O et Eu(OH)₃

Notons que de telles constatations soulignent l'intérêt de l'usage de la spectrofluorimétrie, en exploitant l'ion Eu³⁺ comme sonde structurale, en tant que technique de caractérisation complémentaire à la diffraction des rayons X et à la spectroscopie IR. En effet cela montre que des phases secondaires présentes à l'état de traces non détectables par diffraction des rayons X ou par spectroscopie IR peuvent être mises en évidence par spectrofluorimétrie.

VI) Déclin de luminescence, mesure de la durée de vie de luminescence

Nous nous sommes ensuite intéressés à la détermination de la durée de vie de luminescence de nos suspensions. Pour cela nous avons étudié le déclin de luminescence en enregistrant le signal $I = f(t)$ après le temps $t = 0$ auquel la source d'excitation est arrêtée, permettant ainsi de suivre la cinétique du processus de désexcitation à partir du niveau émetteur ⁵D₀ (Figure 54). Comme mentionné précédemment, cette désexcitation a lieu à la

fois par le biais de transitions radiatives et de transitions non radiatives. En première approximation, en absence de phénomènes d'interaction entre ions actifs, le déclin suit une loi de type exponentiel, traduite par la relation suivante :

$$I = I_0 \exp(-t/\tau)$$

où :

- I est l'intensité de luminescence à l'instant t
- I_0 est l'intensité à la fin du délai d'excitation
- τ est la durée de vie du niveau émetteur (dans notre cas 5D_0).

Bien que les courbes de déclin de luminescence obtenues pour Sc1(1,2)Eu, Sc1,5(1,9)Eu et Sc2(2,5)Eu suggèrent un processus plus complexe que purement mono-exponentielle, nous avons appliqué ce modèle afin d'évaluer l'ordre de grandeur temporel de la désexcitation. Le temps τ issu de cette modélisation mono-exponentielle est alors le temps au bout duquel :

$$\frac{I_0}{I} = e = 2,718$$

On constate que pour les suspensions dialysées Sc1(1,2)Eu et Sc1,5(1,9)Eu, la durée de vie de luminescence est de l'ordre de 0,73 ms ($\pm 0,07$ ms) alors que pour la suspension dialysée Sc2(2,5)Eu la durée de vie est de l'ordre de 1 ms ($\pm 0,10$ ms). Cette observation peut alors être rapprochée des résultats précédents, suggérant l'existence d'environnements chimiques phosphatés autres qu'apatitiques dans ce dernier échantillon, modifiant le comportement de luminescence de la suspension Sc2(2,5)Eu. L'augmentation de durée de vie de luminescence, provoquée par la diminution relative des probabilités de désexcitations non radiatives, est en accord avec l'augmentation observée de l'intensité d'émission notée pour ce composé (Figure 52).

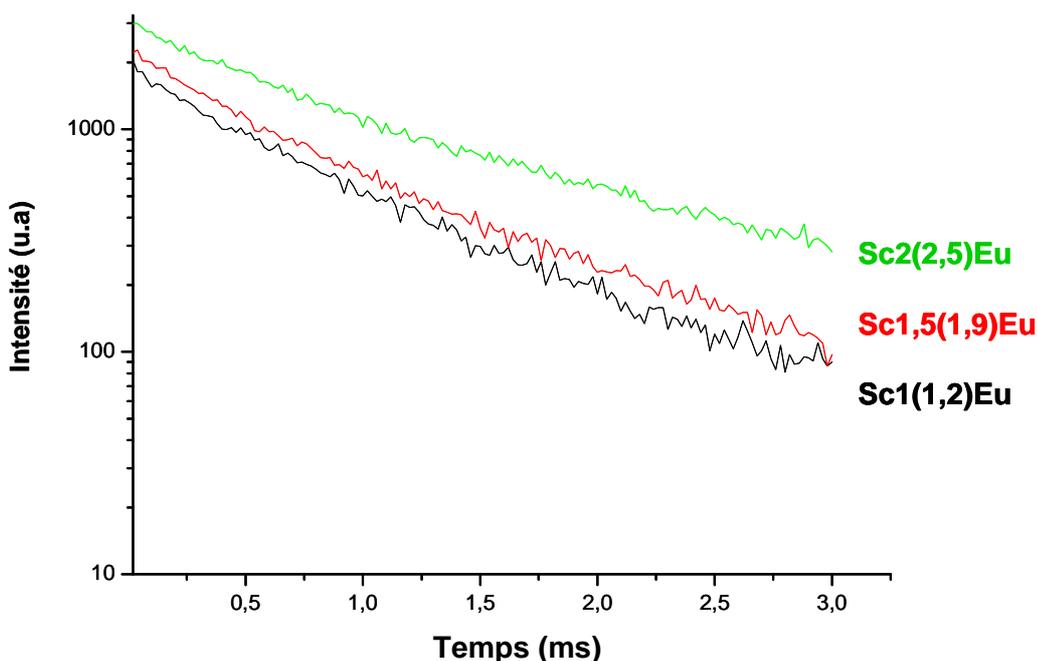


Figure 54 : Profil de déclin de luminescence du niveau émetteur 5D_0 de l'ion Eu^{3+} de $\text{Sc1}(1,2)\text{Eu}$, $\text{Sc1},5(1,9)\text{Eu}$, $\text{Sc2}(2,5)\text{Eu}$ sous excitation à 392,8 nm et à température ambiante

Il est important de mentionner ici que dans tous les cas l'ordre de grandeur de la durée de vie de luminescence de ces suspensions est de l'ordre de la milliseconde, ce qui constitue l'un des avantages de l'ion Eu^{3+} (que nous avons déjà souligné dans le chapitre introductif) permettant a priori d'envisager l'utilisation des nanoparticules colloïdales d'apatite pour des observations de luminescence en temps résolu.

A ce stade, il faut considérer le mode de désexcitation rencontré dans nos systèmes, et en particulier sur la possibilité de désexcitations non radiatives. Comme nous l'avons mentionné en début de section, les colloïdes étudiés ici ont été synthétisés en milieu aqueux ; de plus les mesures de spectrofluorimétrie ont été réalisées directement sur les suspensions (à l'état liquide). Or, il peut y avoir couplage entre les niveaux électroniques de l'ion lanthanide et les modes vibrationnels d'oscillateurs tels que O-H ($\nu \sim 3500 \text{ cm}^{-1}$) localisés à proximité des centres luminescents. En particulier, dans le cas de l'euprium, la 4^{ème} harmonique vibrationnelle de O-H est très proche de la différence d'énergie ΔE de transitions $^5D_0 \rightarrow ^7F_J$. Il existe donc une probabilité notable pour qu'une partie de l'énergie absorbée par les ions Eu^{3+} soit restituée non radiativement par couplage avec les oscillateurs O-H. De plus que les

systèmes apatitiques constituant nos nanoparticules sont hydroxylés, il y a donc également des vibrateurs O-H localisés dans les tunnels apatitiques. La substitution de H₂O par de l'eau lourde, D₂O, permet de remplacer les vibrateurs O-H par des vibrateurs O-D, présentant une fréquence de vibration plus faible et la désexcitation vibronique est alors envisageable en faisant appel à la 5^{ème} harmonique de O-D (au lieu de la 4^{ème} harmonique de O-H), phénomène de probabilité plus faible.

Afin d'examiner plus en détail la possibilité de désexcitations non radiatives pour nos systèmes, nous avons réalisé la synthèse d'une suspension colloïdale Sc_{1,5}(2)Eu dans de l'eau lourde D₂O (l'ensemble des dissolutions des sels initiaux ayant été réalisé dans D₂O et non H₂O). Le protocole de synthèse est resté par ailleurs identique ; néanmoins notons que cette suspension deutérée n'a pas été dialysée (compte-tenu des difficultés pratiques d'utilisation de grandes quantités de D₂O nécessaires lors du processus de dialyse). La durée de vie de luminescence de cette suspension deutérée, Sc_{1,5}(2)Eu(D₂O), a alors été déterminée comme précédemment, et comparée à une suspension Sc_{1,5}(2)Eu non dialysée préparée avec H₂O, notée Sc_{1,5}(2)Eu(H₂O) (synthétisée avec de l'eau désionisée). Les résultats obtenus sont reportées sur la Figure 55.

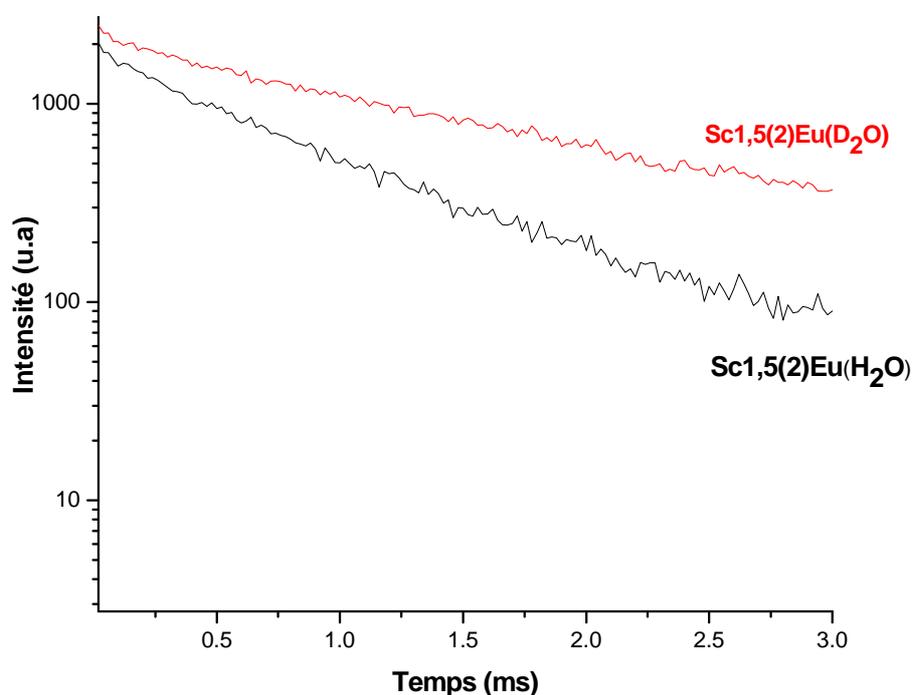


Figure 55 : Profil de déclin de luminescence du niveau émetteur ⁵D₀ de l'ion Eu³⁺ de Sc_{1,5}(2)Eu(H₂O) et Sc_{1,5}(2)Eu(D₂O), Sc_{2,5}Eu, sous excitation à 392,8 nm et à température ambiante

Les déclin de luminescence mesurés sont pour $\text{Sc}_{1,5}(2)\text{Eu}(\text{D}_2\text{O})$ ($\tau_{\text{D}_2\text{O}} = 1,35 \text{ ms}$) et pour $\text{Sc}_{1,5}(2)\text{Eu}(\text{H}_2\text{O})$ ($\tau_{\text{H}_2\text{O}} = 0,74 \text{ ms}$)¹. La durée de vie de luminescence a augmenté d'un facteur d'environ 2 pour la suspension deutérée. Ceci témoigne donc de l'existence de phénomènes de désexcitation non radiative liés à la présence d'oscillateurs O-H, pouvant a priori provenir soit de molécules d'eau associées à l'apatite, soit des ions hydroxydes OH^- présents dans les tunnels apatitiques.

Plusieurs auteurs ont employé la mesure des durées de vie pour estimer le nombre de molécules d'eau dans la première sphère de coordination du lanthanide, principalement dans le cas de systèmes Ln-ligands (où H_2O intervient en tant que molécule en interaction avec l'ions Ln^{3+}). Avec l'équation [Carlos (2009)] :

$$n_{\text{H}_2\text{O}} = 1.11 \left[\frac{1}{\tau_{\text{H}_2\text{O}}} - \frac{1}{\tau_{\text{D}_2\text{O}}} - 0.31 \right] \quad (\text{avec } \tau_{\text{H}_2\text{O}} \text{ et } \tau_{\text{D}_2\text{O}} \text{ en millisecondes})$$

Dans notre cas, les ions Eu^{3+} luminescents sont cependant localisés dans une matrice solide, cristallisée, et non au sein d'un complexe organométallique en solution. Par ailleurs, cette matrice solide se trouve être, dans notre cas, hydroxylée. Il apparaît donc plus cohérent ici de discuter en termes de nombre de vibrateurs O-H et non pas en termes de molécules d'eau. Prenant en compte l'équation précédente, et considérant en première approximation chaque molécule H_2O comme une paire de vibrateurs O-H indépendants, comme déjà suggéré par Supkowski et Horrocks (2002). Dans notre cas, l'application de cette équation mène à la valeur $n_{\text{OH}} \approx 2$. $n_{\text{H}_2\text{O}} \approx 0.67$. Compte-tenu du fait que ces vibrateurs se doivent d'être en forte interaction avec les ions Eu^{3+} , et que ces derniers sont vraisemblablement plutôt localisés en sites Ca(II) de la structure apatitique (et donc tapissant les tunnels apatitiques), il est probable qu'une proportion importante de ces vibrateurs O-H « désactivateurs » concernent en fait les ions OH^- apatitiques plutôt que des molécules d'eau. Il serait intéressant par la suite d'étudier l'effet d'une substitution des ions OH^- apatitiques par d'autres anions (tels que des ions fluorures par exemple) sur le phénomène de désexcitation non radiative que nous avons mis en évidence ici.

¹ Remarquons que les durées de vie de luminescence avant et après dialyse pour $\text{Sc}_{1,5}(2)\text{Eu}(\text{H}_2\text{O})$ restent du même ordre, indiquant que la dialyse n'a pas d'effet particulier sur la durée de vie de luminescence.

VII) Discussion sur l'efficacité de luminescence

Pour terminer cette section consacrée aux propriétés de luminescence de nos suspensions, nous nous sommes interrogés sur l'efficacité du processus de luminescence pour les centres europium contenus dans nos nanoparticules.

La détermination d'un rendement de luminescence (rendement quantique) est souvent décrite dans la littérature, en particulier dans le cas de complexes de lanthanides en solution. Elle correspond au rapport entre le nombre de photons reçus par l'échantillon et le nombre de photons émis. Le plus souvent, pour éliminer toutes les inconnues expérimentales, les mesures sont faites par comparaison avec une référence dont le rendement quantique a été déterminé par ailleurs. Cependant, même pour une détermination par comparaison avec un étalon, il est nécessaire de connaître les propriétés d'absorption du système à la longueur d'onde d'excitation. Or, contrairement au cas de complexes de lanthanides en solution (chélates...), cette grandeur est très difficilement accessible expérimentalement dans le cas de nos suspensions turbides à cause de phénomènes de diffusion importants. De tels phénomènes de diffusion entraînent en effet une possible ré-absorption de photons menant à une surestimation du rendement quantique. Il a néanmoins été montré récemment par [Martini et al. (2009)] que l'utilisation d'une référence présentant les mêmes propriétés de diffusion de la lumière que le composé inconnu pouvait alors permettre l'évaluation du rendement quantique.

Les contraintes temporelles de ce travail ne nous ont pas permis de réaliser cette évaluation (conditions de turbidités similaires) qui fera l'objet d'une étude subséquente. En revanche, nous avons ici estimé pour nos systèmes l'efficacité de luminescence (ϵ), donnée par l'équation :

$$\epsilon = \frac{\tau_{obs}}{\tau_{rad}}$$

où τ_{obs} représente le déclin de luminescence observé (valeur expérimentale) prenant en compte la somme des désexcitations radiatives et non-radiatives, et où τ_{rad} a trait uniquement aux phénomènes de désexcitation radiative.

Notons que la valeur de τ_{rad} n'est pas directement accessible par l'expérimentation : il s'agit d'une valeur calculée à partir de traitements mathématiques à partir des spectres d'émission (incluant pour Eu^{3+} l'ensemble des transitions ${}^5\text{D}_0 \rightarrow {}^7\text{F}_J$ avec $J = 0$ à 4). Dans ce travail, nous avons considéré comme approximation de τ_{rad} une moyenne des valeurs obtenues

par Lechevalier (2010) sur le carbonate ($\tau_{\text{rad}} = 2,86$ ms) et hydroxycarbonate ($\tau_{\text{rad}} = 2,22$ ms) de gadolinium dopés à Eu^{3+} (5% mol.), soit $\tau_{\text{rad}} \cong 2,54$ ms. Dans ces conditions, une première approximation de l'efficacité de luminescence de nos particules est alors d'environ

$$\varepsilon = \frac{0.74}{2.54} \cong 29 \%$$

Cette valeur représente une première estimation de ε pour nos nano-systèmes, à température ambiante. Il serait intéressant, dans la suite de ce travail, de déterminer comment cette valeur (ainsi que celle du rendement quantique) pourrait être modulée par une modification de la nature des anions localisés dans les tunnels apatitiques.

Partie D : Approfondissement de l'étude de l'interaction entre apatite et AEP

A la suite des différentes caractérisations physico-chimiques réalisées sur les nanoparticules colloïdales, nous avons examiné plus en détail l'interaction pouvant exister entre molécules d'AEP et nanocristaux d'apatite. Dans cette optique nous avons suivi deux axes de travail.

Le premier axe concerne l'étude de **l'effet de la concentration en AEP** dans le milieu de synthèse sur la taille moyenne des nanoparticules en suspension (cette taille moyenne étant caractéristique de l'état d'agglomération entre nanocristaux adjacents) et donc sur la stabilité des colloïdes obtenus. Ainsi nous avons cherché à déterminer dans quelle mesure il était possible de diminuer la concentration en AEP (fixée jusqu'à présent dans les proportions Ca+Eu : AEP : P de 3 : 3 : 1) tout en conservant une taille nanométrique des nanoparticules et la stabilité de la suspension. Par ailleurs du point de vue d'une possible industrialisation future, cette étude nous permettra de minimiser au mieux le coût de synthèse.

Dans une approche plus fondamentale nous avons examiné dans un second axe de travail **l'interaction AEP-apatite au travers d'isothermes d'adsorption**.

I) Etude de l'effet de la concentration en AEP :

Afin d'étudier l'effet de la concentration en AEP dans le milieu de synthèse, nous avons préparé 5 suspensions avec un rapport AEP/(Ca+Eu) initial variable entre 0,2 et 1 (noté R, cf Tableau 19). Rappelons que dans les sections précédentes de ce manuscrit, les suspensions colloïdales avaient été préparées avec la valeur constante de ce rapport $R = 1$. Dans tous les cas nous avons travaillé ici avec un rapport atomique Eu/(Ca+Eu) initial de 1,5% (menant à un taux réel proche de 2% dans tous les cas).

Valeur du rapport R = AEP/(Ca+Eu)	Obtention d'une suspension colloïdale?	Suspension stable dans le temps ?
1	oui	oui (6 mois)
0,8	oui	oui (6 mois)
0,6	oui	oui (4 mois)
0,4	oui	oui (1 mois)
0,2	en partie précipité	-

Tableau 19 : Observations macroscopiques suite à une variation de la concentration en AEP dans le milieu de synthèse, pour un taux de dopage en Eu de 1,5% initial (2% expérimental)

Pour $R = 0,8$; $0,6$ et $0,4$ ($R = 1$ étant un résultat connu) nous avons obtenu des suspensions colloïdales fluides, dont la stabilité dans le temps diminue cependant au fur et à mesure que R décroît. Ceci illustre par conséquent le rôle d'agent stabilisant joué par l'AEP. Notons également que cette stabilité ne décroît qu'aux environs de $R = 0,6$ ce qui laisse penser que cette valeur constitue un palier à partir duquel l'augmentation de la concentration en AEP dans le milieu de synthèse a un effet moindre sur la stabilité. Par ailleurs concernant le cas $R = 0,2$ nous constatons que dans ces conditions la quantité d'AEP introduite dans le milieu de synthèse est insuffisante pour obtenir une suspension colloïdale, puisque on constate qu'une partie de celle-ci a précipité.

Les analyses de diffraction des rayons X (Figure 56) ainsi que celles de spectroscopie FTIR (Figure 57) ont également été réalisées sur ces suspensions, après lyophilisation.

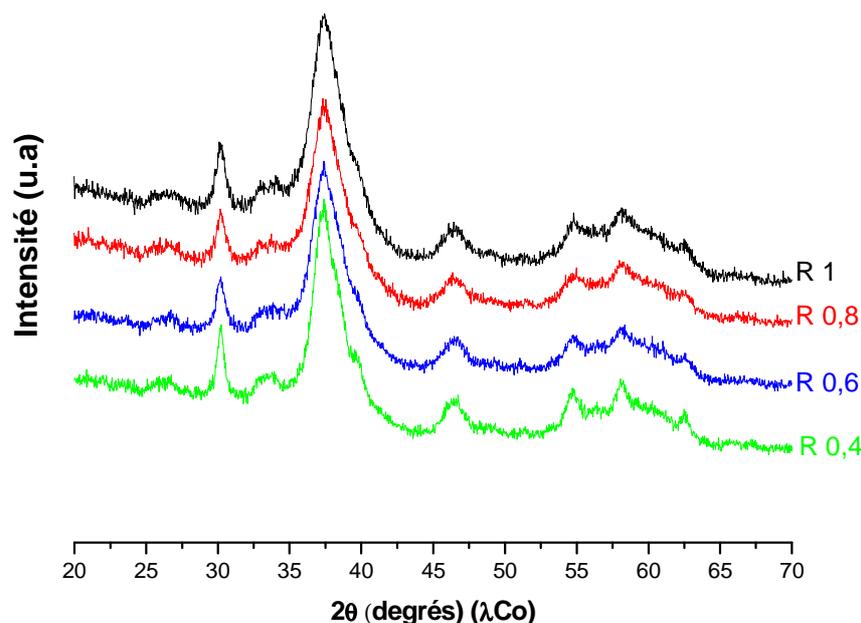


Figure 56 : Diagrammes DRX de Sc_{1,5}(2)Eu en fonction de $R = \text{AEP}/(\text{Ca}+\text{Eu})$ initial

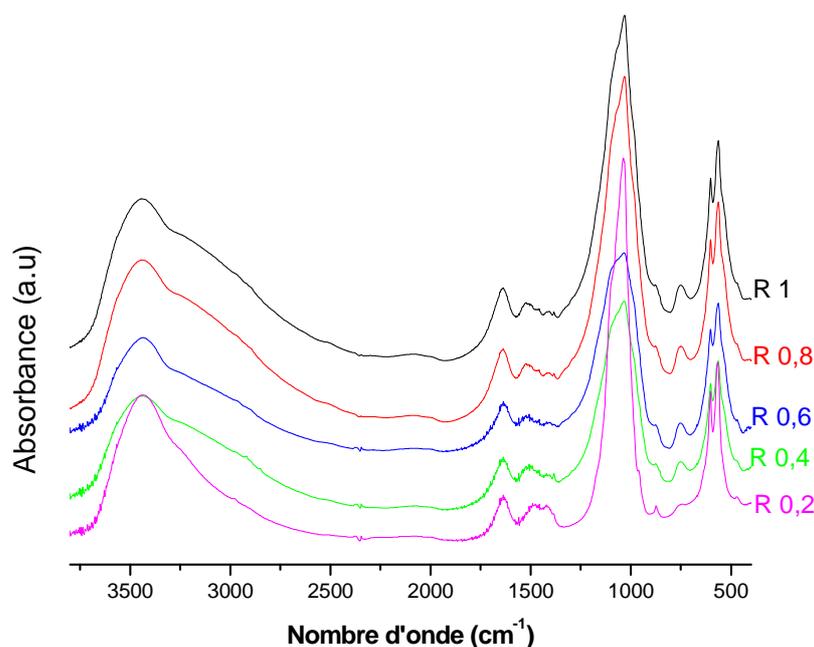


Figure 57 : Spectres FTIR de Sc_{1,5}(2)Eu en fonction du rapport $R = \text{AEP}/(\text{Ca}+\text{Eu})$ initial

Dans tous les cas on constate que les diagrammes de diffraction des rayons X ainsi que les spectres FTIR sont caractéristiques d'une phase apatitique mal cristallisée proche du minéral osseux. Ces résultats montrent donc que la diminution de la quantité d'AEP dans le milieu de synthèse n'induit pas la formation de phase(s) secondaire(s). De plus on observe que la résolution des diagrammes de diffraction des rayons X ainsi que celle des spectres FTIR augmente quand R diminue, indiquant que l'effet inhibiteur de l'AEP décroît lorsque sa concentration dans le milieu de synthèse diminue. Notons que la quantité d'AEP fixée sur les nanoparticules diminue également en fonction de la concentration en AEP initiale, ce qui est nettement visible sur les spectres FTIR avec la diminution de l'intensité de la bande à 754 cm^{-1} caractéristique de la liaison P-O-(C) dans des complexes entre Ca et AEP.

Précisons que la présence d'eau résiduelle après lyophilisation mène à un massif d'absorption IR intense dans le domaine de vibration O-H (en particulier vers 3500 cm^{-1}), ne permettant pas de détecter l'éventuelle présence d'ions OH^- apatitiques. La présence d'ions OH^- a néanmoins pu être mise en évidence par microscopie Raman, comme indiqué sur la Figure 58 dans le cas d'une suspension obtenue avec $R = 1$ (1,5% Eu initial, 2% expérimental). Notons que ces analyses par spectroscopie Raman confirment par ailleurs la présence d'AEP sous la forme de complexes entre Ca^{2+} et AEP^- (menant à la présence de bandes caractéristiques vers 1075, 987, 879 et 761 cm^{-1}) en association avec la phase apatitique, ce

qui est en accord avec les résultats de spectroscopie FTIR déjà présentés. Signalons en outre que nous n'avons pas observé par microscopie Raman de modification notable de la proportion d'ions OH^- apatitiques pour des valeurs de R correspondant à des colloïdes dits « stables » c'est-à-dire pour R entre 0,4 et 1.

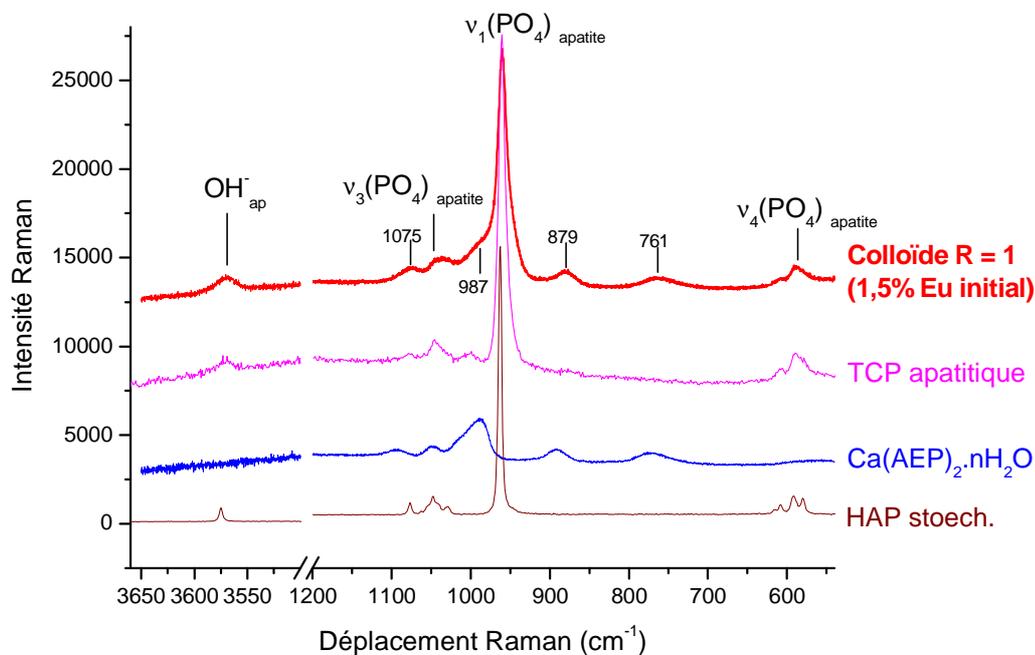


Figure 58 : Spectre Raman pour le colloïde R = 1 (1,5% Eu initial) – comparaison avec les spectres de référence de l’HAP stœchiométrique, du $\text{Ca}(\text{AEP})_2 \cdot n\text{H}_2\text{O}$ et d’une apatite non-stœchiométrique (TCP apatitique)

Les analyses chimiques (Tableau 20) réalisées sur ces composés confirment par ailleurs que la quantité d’AEP fixé sur les nanoparticules diminue de façon quantitative lorsque la concentration en AEP introduite au moment de la synthèse décroît, en accord avec les données de spectroscopie FTIR (Figure 57). Ainsi le pourcentage massique d’AEP (Tableau 20, ligne 6) passe par exemple de 16,5% (pour $R = 1$) à 6,65% pour ($R = 0,4$). En outre il est intéressant de remarquer que le rapport atomique $\text{Eu}/(\text{Ca}+\text{Eu})$ final est dans tous les cas supérieur au rapport atomique $\text{Eu}/(\text{Ca}+\text{Eu})$ initial (voir lignes 1 et 4) : nous retrouvons donc ici une incorporation préférentielle de l’euprium par rapport au calcium, indépendamment de la quantité d’AEP présente dans le milieu de synthèse.

N° de ligne	Données	Sc1,5(1,9)Eu R1	Sc1,5(2,1)Eu R0,8	Sc1,5(2,0)Eu R0,6	Sc1,5(2,2)Eu R0,4
(1)	rapport atomique Eu/(Ca+Eu) initial (en %)	1,5	1,5	1,5	1,5
(2)	mmol de Ca ²⁺ dans 100 mg (de solide)	0,690	0,691	0,691	0,714
(3)	mmol de Eu ³⁺ dans 100 mg	0,013	0,014	0,014	0,016
(4)	rapport atomique Eu/(Ca+Eu) final (en %)	1,9	2,1	2,0	2,2
(5)	% massique N (déterminé par dosage C,H,N)	1,65	1,57	1,4	1,12
(6)	masse d'AEP dans 100 mg (en mg)	16,5	15,7	14,0	11,2
(7)	nombre de moles d'AEP dans 100 mg (en mmol)	0,118	0,112	0,1	0,08

Tableau 20 : Résultats des analyses chimiques sur des Sc1,5(2)Eu en fonction du rapport AEP/(Ca+Eu) initial

Dans un second temps, nous avons suivi l'effet potentiel de la concentration initiale en AEP sur la taille moyenne des nanoparticules en suspension. Cette étude a été réalisée sur les suspensions directement après maturation en étuve, par mesures de diffusion dynamique de la lumière (DLS) (Figure 59) (cf annexe). Nous constatons sur cette figure que le diamètre hydrodynamique des nanoparticules (courbe en trait plein, Figure 59) diminue drastiquement lorsque la valeur de R augmente jusqu'à une valeur proche de R = 0,6 ; en revanche, au-delà de cette valeur, nous observons une stabilisation de la taille moyenne des particules à une valeur d'environ 30 nm, relativement constante. Notons que dans tous les cas, les distributions de tailles se sont avérées être monodisperses.

Il est intéressant de remarquer que cette tendance coïncide justement avec la stabilisation progressive de la quantité de molécules d'AEP effectivement fixées sur l'apatite (courbe en pointillée, Figure 59). Ces résultats illustrent ainsi directement le rôle des molécules d'AEP fixées à l'apatite sur le contrôle de la taille des nanoparticules en suspension. Ils confirment par ailleurs que lorsque la quantité maximale de recouvrement de l'apatite par les molécules d'AEP est atteinte (vers R = 0,6-0,7), un ajout supplémentaire d'AEP en solution (valeurs de R jusqu'à 1) n'a plus d'effet notable sur la taille des particules.

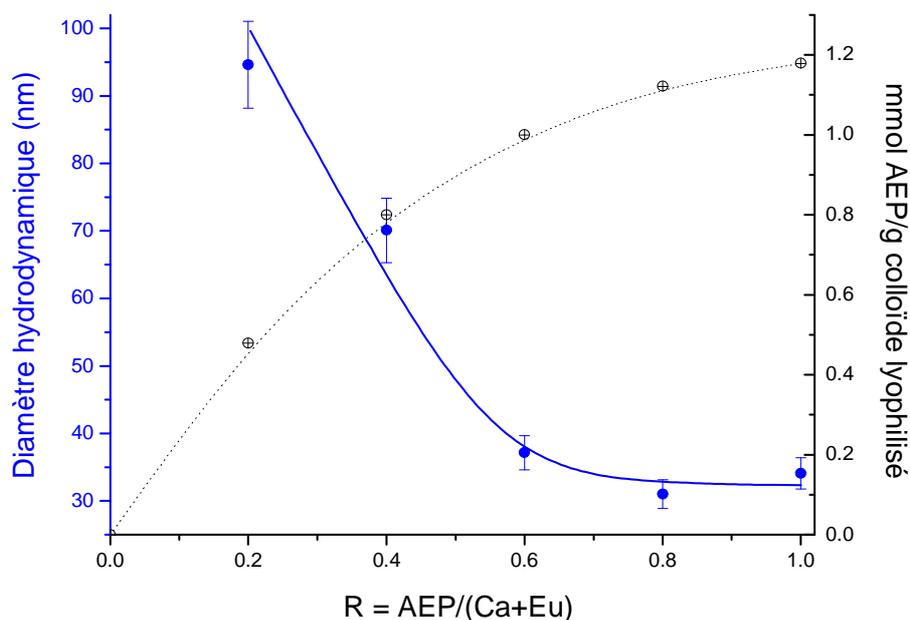


Figure 59 : Evolution du diamètre hydrodynamique de Sc_{1,5}(1,9)Eu et de la quantité d'AEP fixé sur l'apatite, en fonction du rapport $R = \text{AEP}/(\text{Ca}+\text{Eu})$ initial

Cet effet de contrôle de la taille des particules en suspension ne peut vraisemblablement s'expliquer que par une localisation prépondérante des molécules d'AEP (sous la forme anionique monovalente AEP^- en interaction avec des ions Ca^{2+}) *en surface* de la matrice apatitique.

Rappelons que le choix de cette molécule comme « agent stabilisant » a été guidé (outre par sa biocompatibilité) par la présence d'une part d'un groupement phosphaté susceptible d'interagir fortement avec les ions Ca^{2+} en surface de l'apatite, et d'autre part d'un groupement ammonium NH_3^+ pouvant potentiellement être à l'origine d'un phénomène de répulsion électrostatique entre particules adjacentes. Il apparaît donc raisonnable de considérer les particules en suspension (du moins dans le cas des suspensions colloïdales stables) comme composées d'un cœur apatitique entouré d'une couronne de molécules AEP^- interagissant avec des ions Ca^{2+} de surface, et formant ainsi des complexes superficiels identifiables par spectroscopies FTIR et Raman.

Compte-tenu de l'affinité bien connue entre groupements phosphatés (ou phosphonates) et ions Ca^{2+} , et au contraire du peu d'affinité entre les groupements ammonium et phosphates, il est vraisemblable d'avancer que le mode de greffage des molécules d'AEP sur l'apatite se fasse par le biais du groupement phosphaté de l'AEP comme l'illustre la Figure 60.

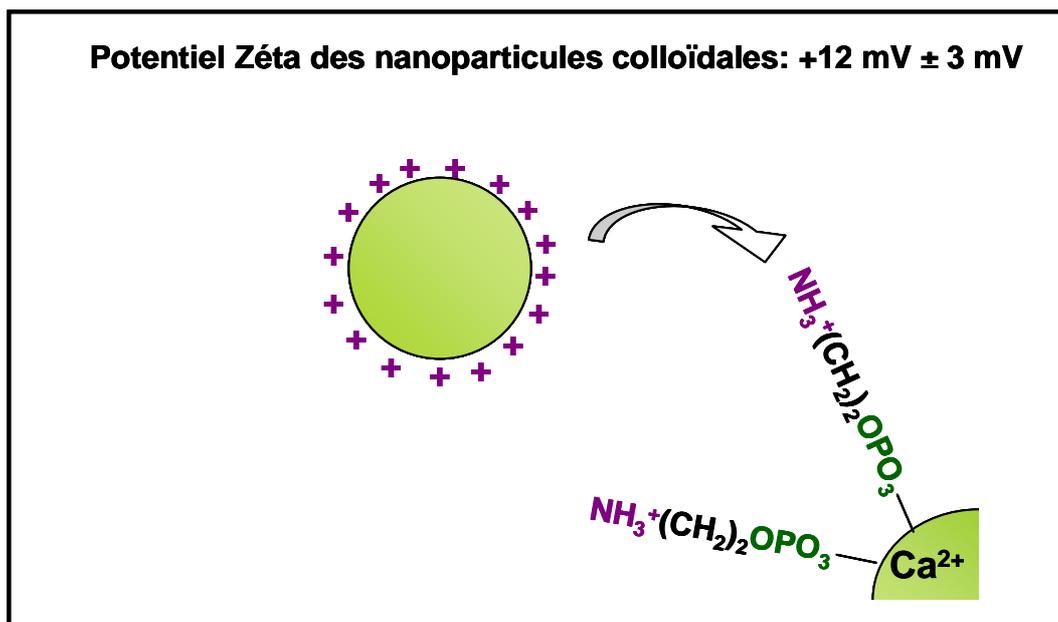


Figure 60 : Représentation schématique d'une nanoparticule colloïdale, et valeur de potentiel Zéta sur Sc1,5(1,9)Eu(R1)

Afin de confirmer ce point, des mesures de potentiel Zéta ont été entreprises, pour $R = 1$. Les résultats obtenus montrent que la surface des nanoparticules d'apatite (qui est normalement chargée négativement, à pH 9,5, en absence d'AEP) devient au contraire chargée positivement (+12 mV ± 3 mV) en présence d'AEP. Comme supposé ci-dessus, ce phénomène confirme donc la présence des groupements ammonium de l'AEP en surface des nanoparticules, orientés vers la solution, et qui assure donc une répulsion électrostatique entre nanoparticules adjacentes.

Pour terminer cette étude sur l'effet de la concentration en AEP dans le milieu de synthèse, nous avons réalisé ponctuellement des mesures de spectrofluorimétrie sur ces suspensions, après purification par dialyse. Nous avons constaté que la concentration en AEP n'avait pas d'effet notable sur les propriétés de luminescence. En effet, quelle que soit la concentration initiale en AEP dans le milieu de synthèse, nous observons des spectres d'émission très comparables et caractéristiques de l'ion Eu^{3+} , ainsi que des temps de vie de luminescence très proches de l'ordre de la milliseconde (Figure 61 et Figure 62). Ces observations viennent à nouveau appuyer le fait que l'AEP et l'euprécium n'interagissent que faiblement.

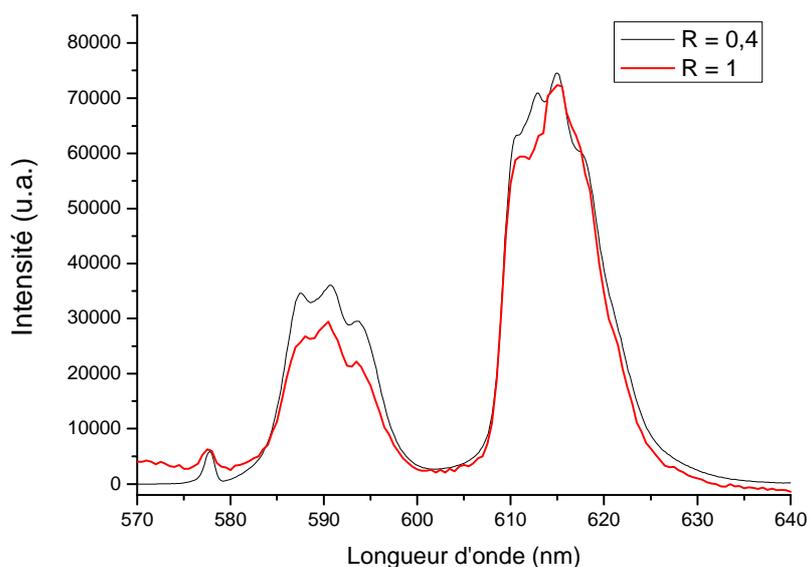


Figure 61 : Spectres d'émission de luminescence obtenus par excitation à 392,8 nm et température ambiante, pour les suspensions colloïdales correspondant à R = 0,4 et 1 (1,5% Eu initial)

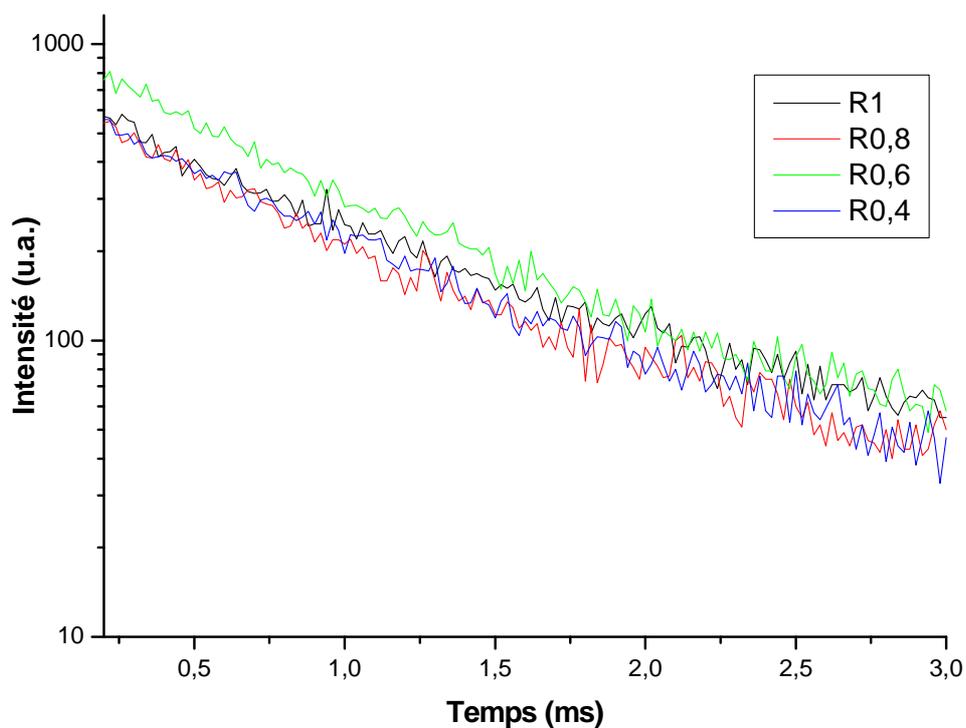


Figure 62 : Profil du déclin de luminescence du niveau émetteur 5D_0 de l'ion Eu^{3+} de colloïdes (1,5% Eu initial), en fonction du rapport $R = \text{AEP}/(\text{Ca}+\text{Eu})$, sous excitation à 392,8 nm et à température ambiante

Dans le but d'affiner la caractérisation physico-chimique des particules en suspension obtenues avec différentes valeurs du rapport R, nous avons complété cette étude par des analyses de microscopie électronique en transmission (Figure 63 à Figure 67). Ces analyses ont été menées sur les suspensions dialysées. Pour des valeurs de R entre 0,6 et 1 (colloïdes stables), les micrographies ont confirmé la taille nanométrique des particules avec le même ordre de grandeur (~ 30 nm) que celui estimé par analyses DLS. Par ailleurs dans tous les cas nous avons observé une bonne homogénéité de morphologie (morphologie ellipsoïdale) des nanoparticules. En revanche, les observations par MET pour les suspensions préparées avec une valeur de R inférieure à 0,6 n'ont pas permis de mettre en évidence les nanoparticules de tailles croissantes mises en évidence par DLS : au contraire, des particules plus petites (de l'ordre d'une trentaine de nm) ont alors été observées. Cet écart par rapport aux analyses directes des suspensions par DLS peut vraisemblablement s'expliquer par une altération plus importante des particules « pauvres en AEP » lors de la préparation des échantillons MET (incluant en particulier une étape de sonification). Cette sensibilité à la méthode de préparation peut probablement s'expliquer, pour ces échantillons pauvres en AEP, par une plus grande fragilité des agglomérats primaires détectés par DLS, menant alors à une fragmentation en particules plus petites observées par MET.

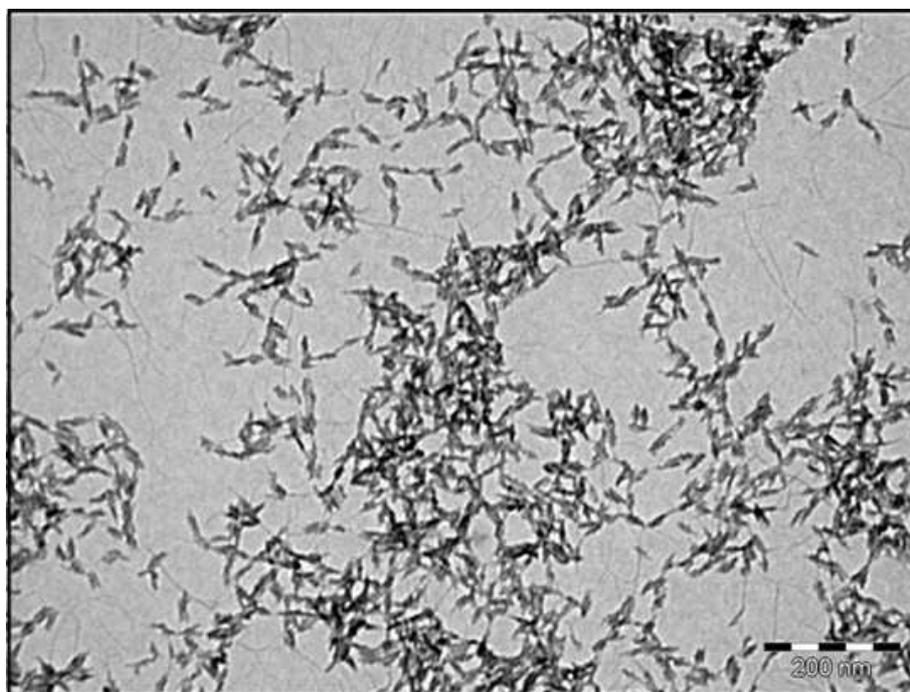


Figure 63 : Micrographie MET de Sc_{1,5}(1,9)Eu(R1) (après dialyse)

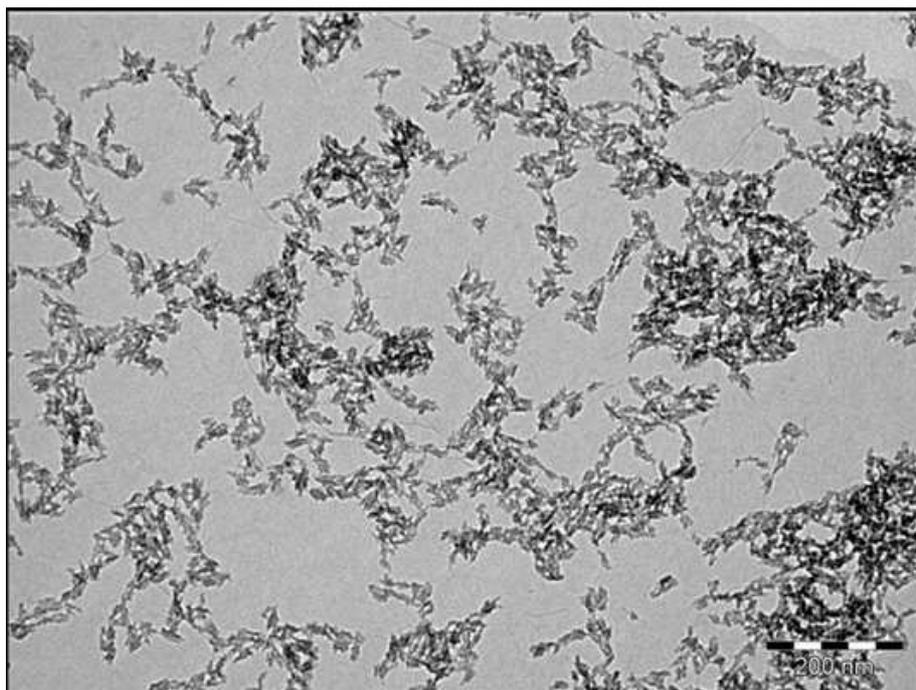


Figure 64 : Micrographie MET de $Sc_{1,5}(2,1)Eu(R0,8)$ (après dialyse)

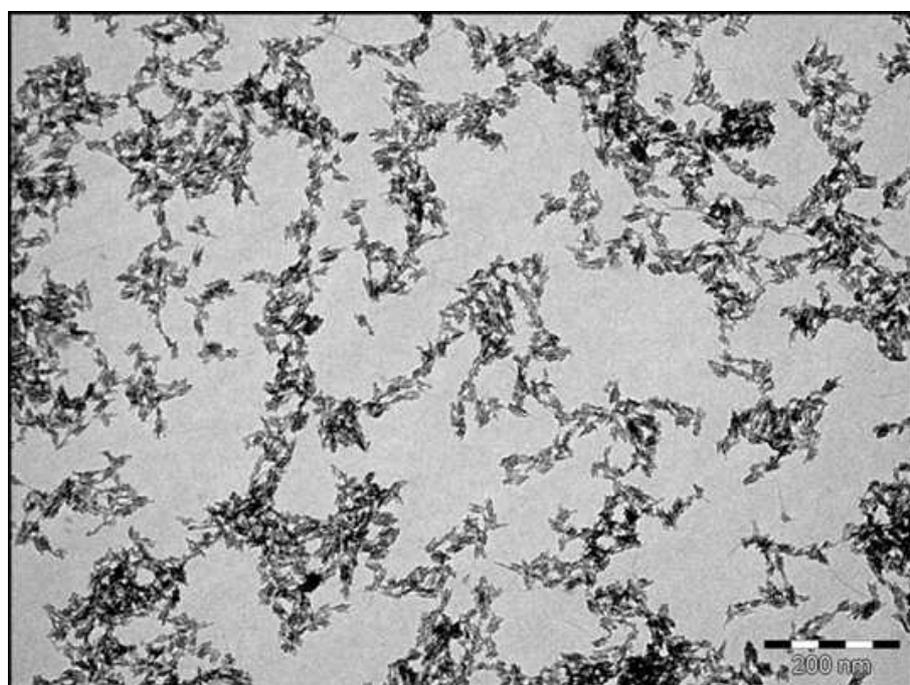


Figure 65 : Micrographie MET de $Sc_{1,5}(2,0)Eu(R0,6)$ (après dialyse)

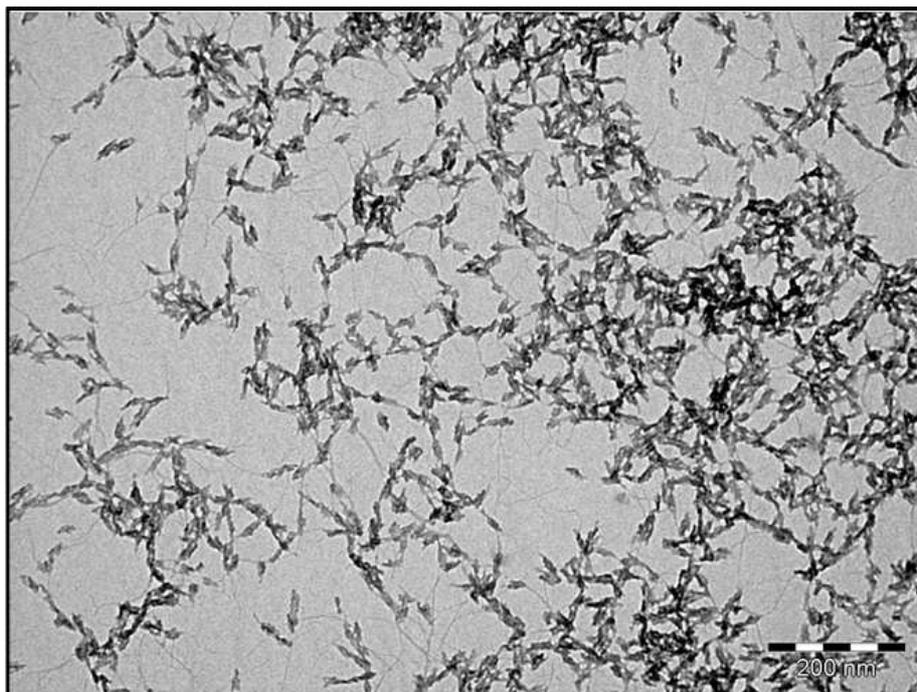


Figure 66 : Micrographie MET de Sc_{1,5}(2.2)EuR_{0,4} (après dialyse)

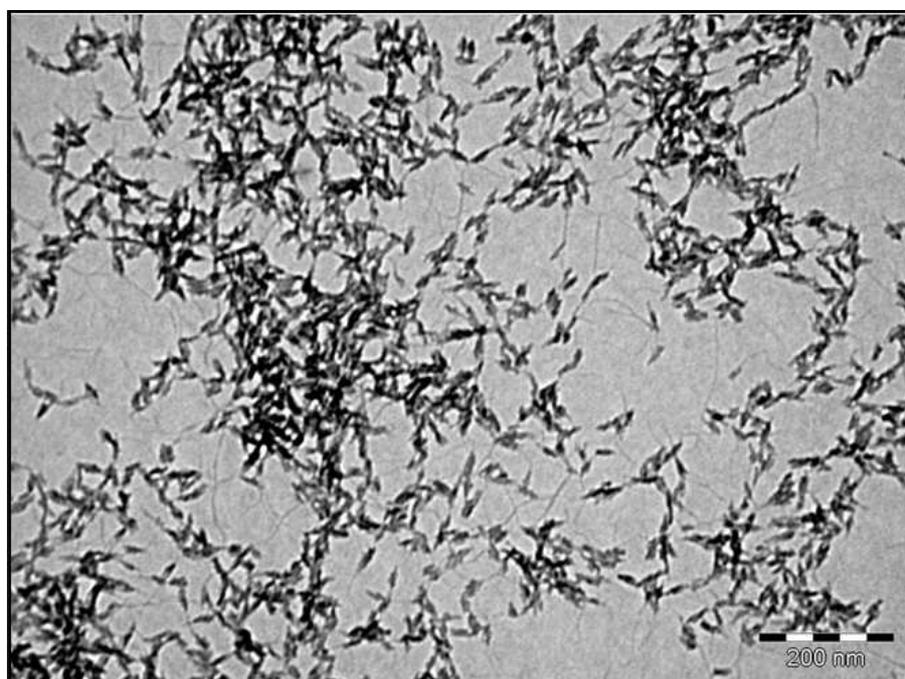


Figure 67 : Micrographie MET de Sc_{1,5}(2)EuR_{0,2} (après dialyse)

II) Etude du processus d'adsorption de l'AEP sur une apatite nanocristalline

Dans le but d'examiner plus en détail l'interaction entre molécules d'AEP et nanocristaux d'apatite, nous nous sommes ici intéressés au processus d'adsorption mis en jeu. Cette étude a été réalisée sur une apatite nanocristalline de « référence » non colloïdale et non dopée (précédemment caractérisée), As0Eu lyophilisée, c'est-à-dire en particulier initialement exempte d'AEP.

Cette étude vise à mieux appréhender le mode d'association chimique entre molécules d'AEP et apatite qui s'établit pendant le processus de synthèse, qui a lieu en étuve à 100°C. Par conséquent, cette étude d'adsorption a été réalisée à $T = 100^\circ\text{C}$ et non à température ambiante afin de se rapprocher des conditions existant pendant la synthèse des colloïdes.

Lors des expériences d'adsorption, nous avons travaillé avec un rapport solide/solution constant impliquant 80 mg d'apatite As0Eu ($S_{w \text{ non coll}} \cong 4 \text{ m}^2/\text{g}$) immergée dans 20 ml de solution d'AEP, à un pH de 9,5. A l'issue d'un temps de contact prédéterminé entre le solide et la solution, l'ensemble a été centrifugé puis lavé 6 fois à l'eau désionisée, et la poudre récupérée a été lyophilisée puis soumise à des analyses élémentaires C,H,N pour la détermination de la teneur en azote (provenant de l'AEP adsorbé).

Dans un premier temps, une étude de cinétique d'adsorption a été menée afin d'établir un temps de contact adapté à la détermination de l'isotherme d'adsorption de l'AEP sur l'apatite. Cette étude a été menée avec un temps de contact variable entre 10 minutes et 16 heures (à 100°C) et les résultats sont reportés graphiquement sur la Figure 68.

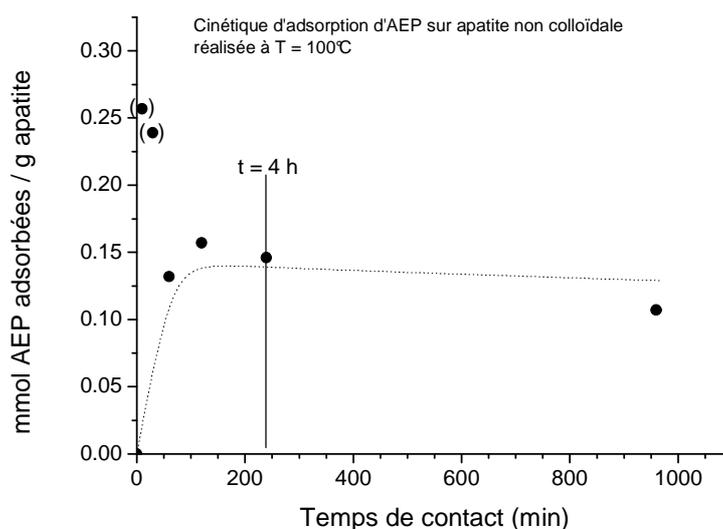


Figure 68 : Etude de la cinétique d'adsorption de l'AEP sur une apatite nanocristalline non colloïdale As0Eu

Ces données indiquent en premier lieu qu'un temps de contact très court (typiquement inférieur à 30 min) ne suffit pas à l'établissement d'un équilibre ; et une durée minimale d'1 heure semble nécessaire pour atteindre cet objectif. Par la suite, nous avons donc choisi de maintenir un contact entre le solide et la solution de 4 heures (Figure 68).

Différentes expériences d'adsorption de l'AEP ont alors été réalisées en variant la concentration initiale en AEP dans la solution d'immersion, dans la gamme 0 – 0,3 mol/l. Les quantités d'AEP adsorbé sur l'apatite en fonction de la concentration en AEP à l'équilibre donne ainsi l'isotherme d'adsorption correspondant, à $T = 100^{\circ}\text{C}$, reporté sur la Figure 69.

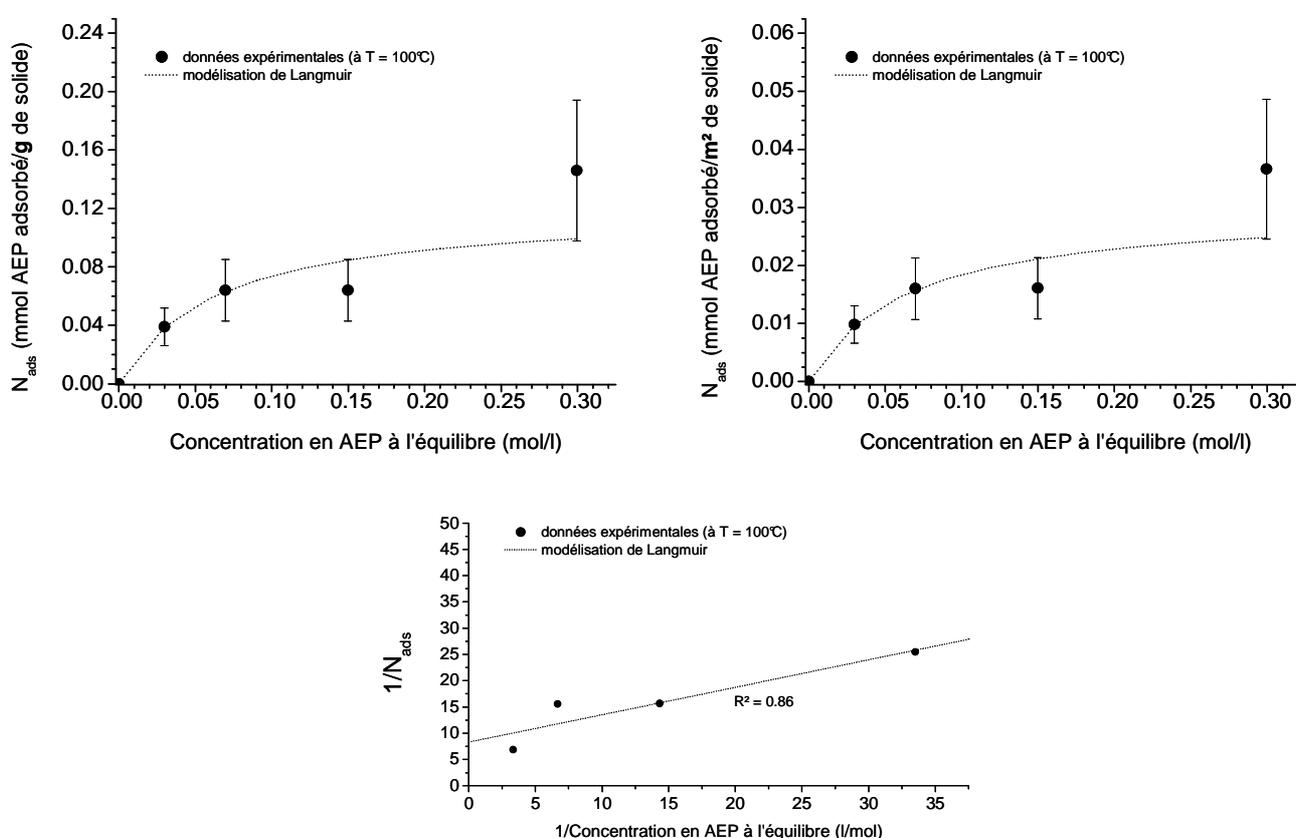


Figure 69 : Isotherme d'adsorption (en haut) à $T = 100^{\circ}\text{C}$, de l'AEP sur une apatite nanocristalline As0Eu (par gramme et par m² de solide), et linéarisation de Langmuir (en bas)

Malgré une certaine dispersion des points, due notamment à l'incertitude des mesures C,H,N, cet isotherme présente néanmoins une allure générale de type Langmuirien. Dans ce contexte, nous avons cherché à modéliser la courbe expérimentale à l'aide du modèle d'adsorption de Langmuir, qui suit l'équation :

$$N_{ads} = \frac{N_m b C_{eq}}{1 + b C_{eq}}$$

où :

- N_{ads} représente le nombre de moles d'AEP adsorbé par m^2 (ou par gramme) d'échantillon solide,
- N_m est le nombre maximal de sites d'adsorption (à $T = 100^\circ\text{C}$) par m^2 (ou gramme) de solide,
- b est la constante d'affinité du processus d'adsorption de l'AEP sur l'apatite,
- et C_{eq} est la concentration en AEP à l'équilibre.

L'application de cette équation aux données expérimentales nous permet alors d'évaluer, grâce à la linéarisation de Langmuir (voir Figure 69, courbe du bas), les valeurs des constantes de Langmuir N_m et b caractérisant le processus d'adsorption en présence (dans le cas d'une apatite nanocristalline non colloïdale, non dopée, préparée à 100°C), menant à :

$$\begin{aligned} N_m &\cong 0,03 \pm 0,01 \text{ mmol AEP adsorbé}/m^2 \text{ de solide} \\ & (= 18 \pm 6 \text{ molécules d'AEP adsorbé}/nm^2) \\ & \text{soit } N_m \cong 0,12 \pm 0,04 \text{ mmol AEP adsorbé}/g \text{ de solide} \\ & \text{et } b \cong 15,9 \pm 9,9 \text{ l/mol.} \end{aligned}$$

Ces valeurs, bien qu'associées à des incertitudes non négligeables, constituent des premières données quantitatives sur l'affinité des molécules d'AEP pour la surface de nanocristaux apatitiques, et pourront alors servir de base à des études ultérieures menées avec d'autres agents dispersants que l'AEP (par exemple mettant en jeu une augmentation de la longueur de la chaîne carbonée).

Nous avons par ailleurs souhaité évaluer dans quelle mesure un tel isotherme pouvait permettre de décrire quantitativement, du moins en première approximation, l'adsorption de l'AEP *en conditions colloïdales*. Pour ce faire, il était intéressant de comparer les résultats obtenus sur l'apatite As0Eu non colloïdale, aux données expérimentales (voir Tableau 20) relatives à des suspensions colloïdales. Compte-tenu d'états de division très différents entre l'apatite lyophilisée utilisée pour cette étude d'adsorption et les nanocristaux d'apatite rencontrés au sein des suspensions colloïdales, il était plus judicieux de comparer des valeurs

de N_{ads} ramenées à l'unité de surface (par m^2 de solide) plutôt que par gramme de solide. Pour cela, nous avons d'abord dû évaluer la surface spécifique de l'échantillon colloïdal en assimilant les nanoparticules à des ellipsoïdes (en accord avec les analyses MET), présentant un rayon axial de ~ 15 nm et un rayon équatorial de $\sim 4,5$ nm (valeurs déduites par traitement d'images des micrographies MET, à l'aide du logiciel ImageJ). En effet, une mesure directe par adsorption d'azote (méthode BET) n'était pas envisageable due aux phénomènes d'agglomération engendrées par le processus de lyophilisation/séchage. Ces considérations ont alors mené à un nombre de nanoparticules ellipsoïdales d'environ $6,6 \cdot 10^{16}$ pour une synthèse de 250 mg (25 ml de suspension), soit une surface totale de près de $16,7 m^2$, correspondant à une surface spécifique $S_{w\ coll} \cong 66,7 m^2/g$.

Dans ce contexte, l'application de l'isotherme d'adsorption à la condition colloïdale (qui correspond à une concentration en AEP dans le milieu de synthèse comprise entre 0,08 et 0,19 mol/l) mène alors à une quantité d'AEP adsorbé d'environ $N_{ads}(isotherme) \cong 0,020$ mmol AEP/ m^2 de solide, et cette valeur peut alors être comparée à la valeur « expérimentale » évaluée pour les suspensions colloïdales (présentant une teneur en AEP proche de 0,10 mmol AEP/100 mg de solide, soit $\sim 1,0$ mmol AEP/g) :

$$N_{ads}(\text{expérimental}) = \frac{1,0 \text{ mmol AEP/g}}{66,7 \text{ m}^2/\text{g}} = 0,015 \text{ mmol AEP/m}^2$$

(soit 9,03 molécules d'AEP adsorbé/ nm^2)

Remarquons que cette valeur (0,015 mmol AEP/ m^2 de solide) est proche de celle (0,020 mmol AEP/ m^2 de solide) tirée de l'application de l'isotherme de Langmuir précédemment déterminé.

En conséquence, dans les conditions colloïdales, bien que la présence d'AEP dès le départ de la précipitation est appelé à modifier le processus d'adsorption par son rôle d'inhibition de croissance cristalline, l'utilisation de l'isotherme ci-dessus permet néanmoins de fournir une première approximation satisfaisante quant à la quantité d'AEP susceptible de se greffer en surface des nanocristaux apatitiques (à $T = 100^\circ C$).

Partie E : Synthèse de nanoparticules colloïdales d'apatite en présence d'un agent de ciblage de cellules cancéreuses : l'acide folique

I) Introduction

Nous nous sommes également intéressés dans ce travail sur la possibilité d'associer une fonction de reconnaissance cellulaire à nos nano-systèmes hybrides apatite-AEP. Comme évoqué dans le Chapitre 1 introductif, nous avons ici choisi de travailler avec l'acide folique (FA) comme agent potentiel de ciblage de cellules cancéreuses car il présente plusieurs avantages que l'on peut rappeler très brièvement ici :

- il est biocompatible : il s'agit de la vitamine B9,
- il peut être reconnu spécifiquement par des récepteurs membranaires (récepteurs folates) surexprimés à la surface de certaines cellules tumorales (cellules mammaires, cellules ovariennes...),
- contrairement à d'autres agents de ciblage, l'acide folique est une petite molécule susceptible de présenter un faible impact sur la stabilité de la suspension et sa formulation,
- il peut être greffé à la surface de divers types de nanoparticules, aussi bien par des liaisons covalentes que par des liaisons ioniques [Bhattacharya et al. (2007)].

FA peut être défini comme une molécule constituée de trois parties distinctes (Figure 70) : un noyau ptéridine (ou acide ptéroïque), l'acide glutamique et l'acide para-amino benzoïque qui lie les deux parties précédentes. Le noyau ptéridine représente la partie « biologiquement active » reconnue par les récepteurs folates, alors que l'acide glutamique est la partie « chimiquement active » : c'est grâce à cette dernière que l'acide folique se lie à la surface des nano-systèmes (il est généralement considéré que cette accroche se fasse par le biais du groupement $-COOH$ situé en position γ par rapport au carbone asymétrique de la partie glutamique).

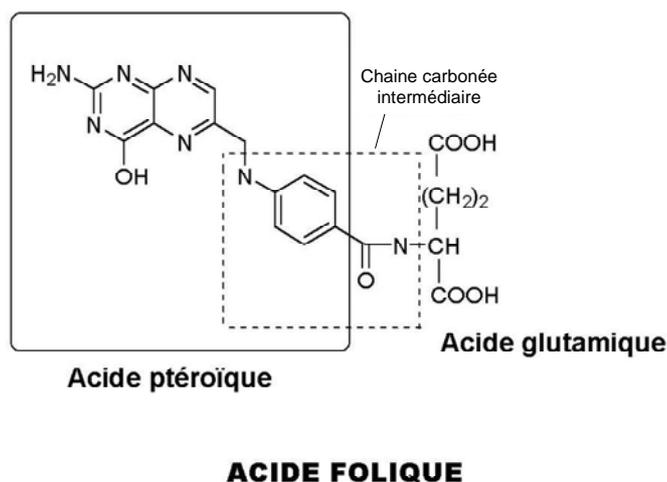


Figure 70 : Formule chimique de l'acide folique

Comme nous l'avons mentionné ci-dessus, le greffage de l'acide folique peut parfois être réalisé par le biais de liaisons covalentes. Dans ces conditions FA n'est cependant pas utilisé tel quel : il doit au préalable être activé en utilisant la chimie des carbodiimides (Figure 71). Cette activation consiste à convertir la fonction carboxylique terminale de l'acide folique en une fonction amine active en présence d'un carbodiimide : l'EDC (1-Etyl-3-diméthylaminopropyl). Néanmoins cette activation est lente et instable et peut, par hydrolyse, redonner partiellement la fonction carboxylique de l'acide folique. Ainsi pour faciliter la réaction et augmenter son rendement, certains auteurs introduisent simultanément un agent aminé actif le NHS (*N*-hydroxysuccinimide). Cette molécule a pour fonction d'une part de stabiliser l'acide folique activé (sous forme de FA-NHS) et d'autre part de jouer le rôle de « cross-linker » (c'est-à-dire de bras) entre FA activé et des fonctions amines présentes à la surface des nanoparticules. En effet dans une grande majorité des cas les nanoparticules sont au préalable fonctionnalisées par des fonctions amines qui vont réagir avec le NHS et former des liaisons covalentes avec FA.

Dans nos conditions opératoires, il est cependant peu aisé d'utiliser cette voie de greffage de l'acide folique. En effet, précisons qu'une telle activation se déroule généralement en présence d'un solvant organique (DMSO) et fait appel à pH transitoirement acide (5-6). Or nos nanoparticules synthétisées en milieu totalement aqueux à pH basique (9,5) ne sont pas stables à un tel pH acide (dissolution de l'apatite) et certaines modifications du protocole d'activation de FA seraient donc requises.

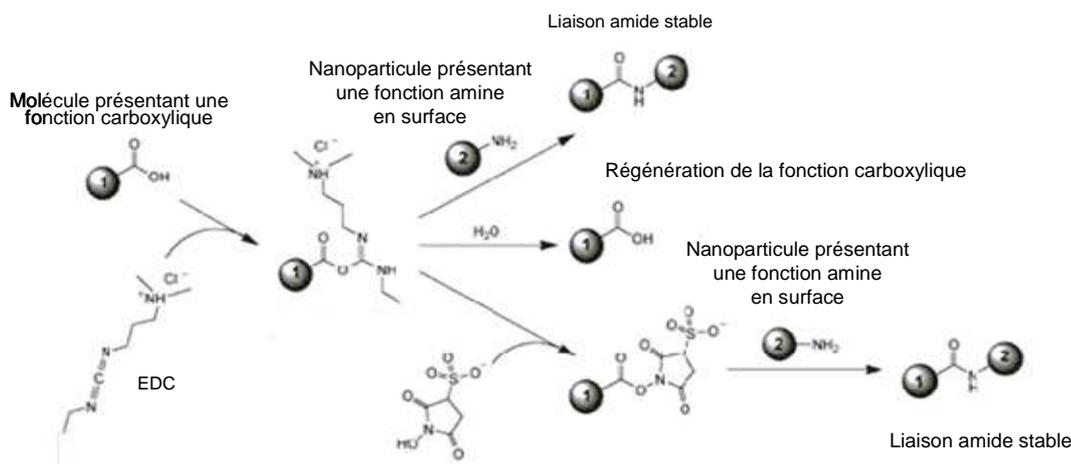


Figure 71 : Mécanisme d'activation de FA par la chimie de carbodiimide

Par ailleurs, cette voie de greffage de l'acide folique nécessiterait également une préparation initiale de nos nanoparticules afin de fonctionnaliser leur surface avec des groupements aminés -NH_2 . La présence de molécules d'AEP en surface des nanocristaux d'apatite pourrait, au premier abord, sembler avantageuse sur ce point en exposant vers la solution leur groupement azoté. Signalons cependant que ces derniers sont exclusivement (sauf à des pH extrêmement basiques) sous la forme de groupements cationiques ammonium -NH_3^+ , et ne présentent donc pas de doublet non liant de l'azote disponible pour une interaction avec FA-NHS. Diverses adaptations de protocoles expérimentaux devraient donc être mis au point pour envisager la possibilité d'un couplage covalent de l'acide folique sur nos nanoparticules, que nous n'avons pas choisi de développer ici.

Nous avons par conséquent choisi dans ce travail de mettre en œuvre un greffage de l'acide folique par interactions électrostatiques (voie ionique), comme précédemment pour l'AEP. En effet comme on peut le voir dans sa formule semi-développée, l'acide folique possède deux fonctions carboxyliques caractérisés par les valeurs de pKa de 3,5 pour $\alpha\text{-COOH}$ et 4,8 pour $\gamma\text{-COOH}$. Dans nos conditions expérimentales (pH 9,5) les deux fonctions acides seront donc sous leur forme de base conjuguée $\alpha\text{-COO}^-$ et $\gamma\text{-COO}^-$, ce qui laisse présager de la possibilité de liaisons ioniques avec des ions Ca^{2+} disponibles en surface des nanoparticules, formant ainsi des complexes superficiels de type folate de calcium.

Dans ce qui suit, nous allons dans un premier temps présenter le protocole de synthèse que nous avons adopté pour la synthèse de nanoparticules colloïdales hybrides apatite-AEP, en présence de l'acide folique. Cette présentation sera suivie dans un second temps par la

caractérisation des ces nanoparticules colloïdales. Enfin nous nous intéresserons plus particulièrement à l'isotherme d'adsorption de l'acide folique sur une apatite nanocristalline modèle (comme réalisé précédemment dans le cas de l'AEP) afin de mieux appréhender le processus d'interaction FA-apatite.

II) Mise au point du protocole de synthèse de nanoparticules colloïdales d'apatite en présence d'un agent de ciblage de cellules cancéreuses : l'acide folique

Le protocole de synthèse que nous avons développé en présence d'acide folique a impliqué quelques modifications par rapport au protocole utilisé jusqu'à présent, que nous avons utilisé comme base de travail. En effet notre objectif a été de minimiser au maximum les altérations éventuelles que pouvait impliquer l'ajout de FA. Signalons ici que des tests préliminaires de traitement d'une solution d'acide folique (à 0.45 mmol/l) en étuve à 100°C pendant 16 h ont montré la bonne stabilité thermique de l'acide folique dans ces conditions opératoires (illustrée notamment par des spectres d'absorption UV-vis et FTIR inchangés). Par conséquent, le protocole envisagé ici a consisté à introduire l'acide folique dans le milieu réactionnel dès le début du protocole de synthèse. Deux questions apparaissaient judicieuses à ce stade, concernant :

- le *moment opportun* pour l'introduction de FA dans le mélange réactionnel,
- et *la concentration* en FA possiblement utilisable sans déstabilisation de la suspension colloïdale.

Afin de favoriser la formation de folate de calcium, nous avons choisi d'ajouter l'acide folique au niveau de la solution A (solution contenant les sels de calcium et d'euprium, cf partie A). Pour de ne pas modifier la concentration finale de nos suspensions, le volume de 6,25 ml de la solution A a été préalablement divisé en deux permettant ainsi de préparer d'une part une solution ammoniaquée de FA de (3,15 ml) pour faciliter sa dissolution séparée, et d'autre part une solution A' contenant les sels de Ca et Eu (3,10 ml). Notons que FA présente une solubilité très faible (0,0016 g/l) dans l'eau, augmentée cependant à pH basique, ce qui constitue une première limite de la quantité totale de FA pouvant être associée aux nano-systèmes.

Dans le but de déterminer l'ordre de grandeur de la quantité de FA pouvant être introduite dans le milieu tout en conservant la stabilité colloïdale des suspensions, nous avons testé trois quantités initiales de FA (Tableau 21), correspondant respectivement aux rapports molaires Ca : FA de 400 : 1, 100 : 1 et 10 : 1 (ce qui correspond aux masses initiales 5, 21 et 214 mg en FA).

Masse initiale de FA testée (en mg)	Nom de la synthèse	Obtention d'une suspension colloïdale ?	Suspension stable ?
5	Sc _{1,5} (2)Eu(5FA)*	oui (coloration jaune translucide)	oui (plus de six mois)
21	Sc _{1,5} (2)Eu(21FA)	oui (coloration jaune translucide)	non (sédimentation après 15 min)
214	Sc _{1,5} (2)Eu(214FA)	non (précipité jaunâtre)	-

* pour rappel et précision Sc_{1,5}(2)Eu(5FA), indique qu'il s'agit de suspension colloïdale dopée à 2% en europium (rapport Eu/Ca+Eu final) et en présence de 5 mg (masse initialement introduite) de FA.

Tableau 21 : Suivi de l'effet de la quantité de FA introduite sur les propriétés macroscopiques des suspensions obtenues

Nous avons constaté l'obtention d'une suspension colloïdale (de coloration jaune translucide, Figure 72) stable à long terme (plus de six mois) en partant de 5 mg de FA, ce qui correspond à une concentration initiale dans le milieu de synthèse de 0,45 mmol/l. En revanche, pour 21 mg de FA nous avons observé après refroidissement de la suspension une sédimentation des particules, et un précipité jaunâtre est obtenu avec 214 mg de FA.



Figure 72 : Photographie de la suspension Sc_{1,5}(2)Eu(5FA) préparée en présence de 5 mg d'acide folique

Nous avons ensuite dans tous les cas lyophilisé une partie de ces synthèses, après purification par dialyse dans le cas de Sc_{1,5}(2)Eu(5FA) et après lavages par centrifugation pour Sc_{1,5}(2)Eu(21FA) et Sc_{1,5}(2)Eu(214FA). Il est intéressant de noter que dans tous les cas, après l'étape de purification/lavage, les poudres habituellement blanches (en absence de FA) présente une coloration jaunâtre caractéristique de l'acide folique ; de plus cette coloration est d'autant plus prononcée que la concentration en FA est grande. La présence persistante de FA malgré les étapes de lavage suggère l'existence d'une association chimique de ce composé au sein des suspensions, vraisemblablement mettant en jeu une interaction avec les nanoparticules. Cette persistance de coloration jaune due à la présence de l'acide folique a par ailleurs été retrouvée après traitements multiples (3 cycles d'1 heure avec changement de surnageants) d'ultracentrifugation à 50 000 tr/min. Les analyses élémentaires C,H,N ont par ailleurs indiqué une teneur en acide folique de 1,03 mg/100 mg de suspension lyophilisée.

III) Caractérisation de nanoparticules colloïdales synthétisées en présence de FA

III-1) Caractérisation par diffraction de rayons X et spectroscopie FTIR

Nous avons caractérisé la suspension Sc_{1,5}(2)Eu(5FA) (traitée par ultracentrifugation) par diffraction des rayons X (Figure 73) et spectroscopie IR (Figure 74). Dans les deux cas on retrouve un diagramme de diffraction des rayons X et un spectre FTIR caractéristiques d'une apatite phosphocalcique faiblement cristallisée analogue à un minéral osseux, et la présence persistante d'AEP est avérée par la subsistance de la bande FTIR à 754 cm⁻¹. Pas ailleurs, ces résultats indiquent que l'introduction de FA, du moins dans ces conditions expérimentales, n'a pas d'effet détectable sur l'état de cristallinité de la phase apatitique.

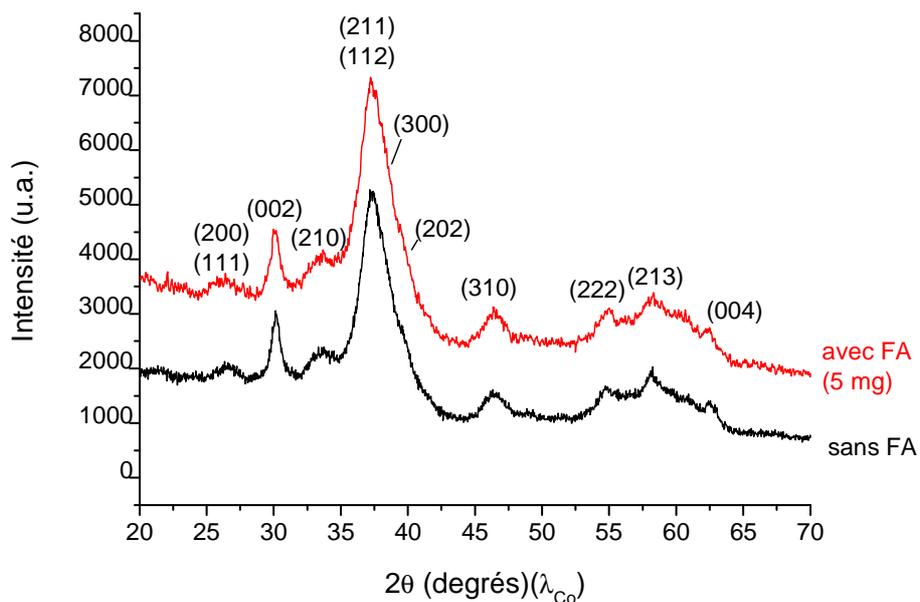


Figure 73 : Diagramme de diffraction des rayons X de Sc_{1,5}(₂)Eu(5FA) préparée en présence de 5 mg d'acide folique

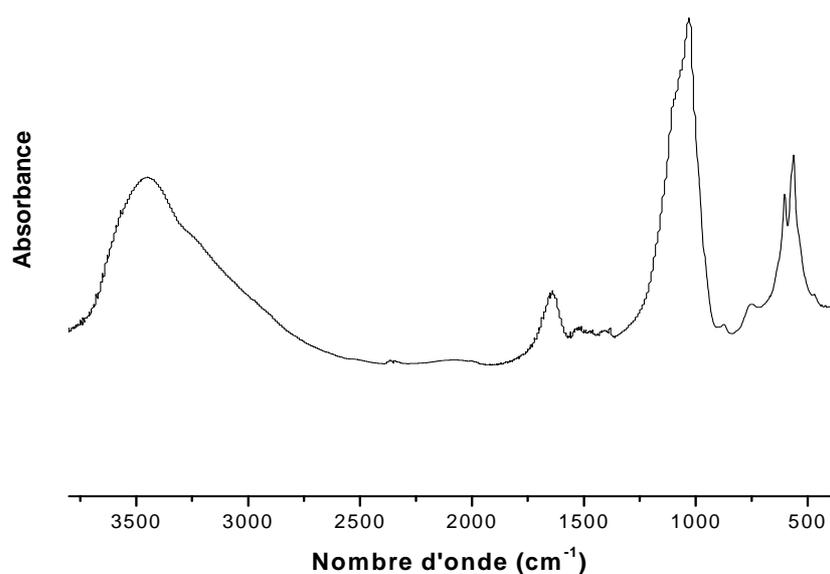


Figure 74 : Spectre FTIR de Sc_{1,5}(₂)Eu(5FA)

Par ailleurs nous pouvons noter que le spectre FTIR de Sc_{1,5}(₂)Eu(5FA) peut être aisément confondu avec un spectre FTIR d'une suspension colloïdale préparée sans acide folique Sc_{1,5}(₂)Eu. Ce résultat implique qu'à la concentration initiale de 0,45 mmol/l dans le milieu (5 mg FA initial), la présence d'acide folique sur le composé lyophilisé n'est pas mesurable par FTIR.

Pour compléter ces observations, nous avons synthétisé trois apatites non colloïdales en présence de FA : $As_{1,5}(2)Eu(5FA)$, $As_{1,5}(2)Eu(21FA)$ et $As_{1,5}(2)Eu(214FA)$, faisant intervenir les trois concentrations croissantes en FA que nous avons utilisées précédemment pour les suspensions colloïdales. Ces apatites, après lavage et lyophilisation, ont été caractérisées par spectroscopie FTIR (Figure 75). Nous avons choisi de travailler avec de telles apatites « standards » dans le but d'obtenir une meilleure résolution spectrale liée en particulier à l'absence d'AEP, permettant potentiellement de distinguer plus aisément la présence de FA ; par ailleurs nous avons synthétisé ces apatites non colloïdales en milieu « eau décarbonatée » afin de minimiser le phénomène de carbonatation de l'apatite, pouvant générer une bande d'absorption large dans le domaine $1350-1600\text{ cm}^{-1}$.

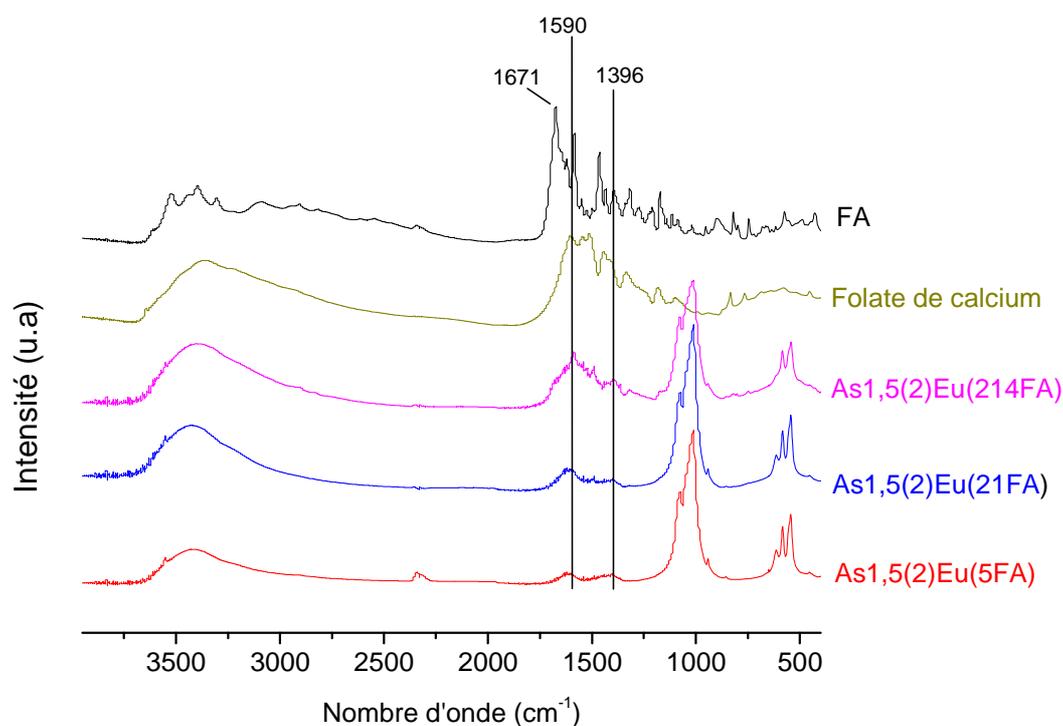


Figure 75 : Spectre FTIR de $As_{1,5}(2)Eu(5FA)$, $As_{1,5}(2)Eu(21FA)$, $As_{1,5}(2)Eu(214FA)$ et comparaison avec les spectres de FA et du folate de calcium

Nous observons, en particulier pour les composés les plus riches en acide folique $As_{1,5}(2)Eu(21FA)$ et $As_{1,5}(2)Eu(214FA)$, la présence de diverses bandes d'absorption dans la région $940-1800\text{ cm}^{-1}$, à côté des bandes caractéristiques d'une apatite phosphocalcique, avec notamment des bandes particulièrement intenses vers 1590 et 1396 cm^{-1} . La comparaison

de ces spectres (voir Figure 75) avec les spectres FTIR de l'acide folique et du folate de calcium (précipité en milieu ammoniacé à partir d'un mélange stœchiométrique FA/nitrate de calcium) suggère plutôt la présence de ce dernier dans les échantillons. Par ailleurs plusieurs bandes caractéristiques de FA, notamment la bande la plus intense à 1671 cm^{-1} , ne sont pas observées. Ces données suggèrent donc que l'interaction de FA avec la phase apatitique passe par la formation de complexes de type folate de calcium. Ceci n'est pas sans rappeler l'interaction entre molécules d'AEP et apatite discutée précédemment, et tend à mettre en évidence une association de type ionique entre les molécules de folate et certains ions Ca^{2+} en surface des nanoparticules. Notons cependant que les bandes IR additionnelles mentionnées ci-dessus ne sont que faiblement visibles (même en concentrant les pastilles IR) pour l'échantillon correspondant à la plus faible concentration initiale en FA, $\text{Sc}_{1,5}\text{Eu}_2(5\text{FA})$, se rapprochant ainsi cas colloïdal (Figure 74).

III-2) Caractérisation par microscopie électronique en transmission, diffusion dynamique de la lumière et potentiel Zêta

Les analyses par microscopie électronique en transmission réalisées sur la suspension colloïdale $\text{Sc}_{1,5}\text{Eu}_2(5\text{FA})$ n'ont pas montré de modification notable de la morphologie, l'homogénéité ou la taille moyenne des nanoparticules (Figure 76) liées à la présence de l'acide folique dans le milieu. En effet les nanoparticules présentent toujours une morphologie ellipsoïdale homogène pour l'ensemble de l'échantillon, et de taille $\sim 40\text{ nm}$.

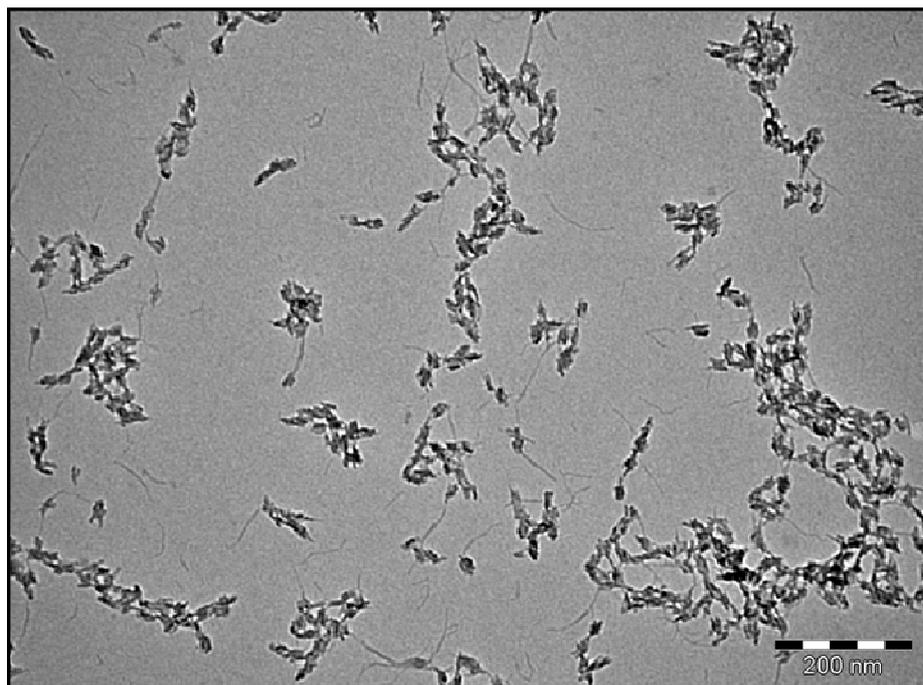


Figure 76 : Cliché de microscopie électronique en transmission pour Sc_{1,5}(2)Eu(5FA)

Par ailleurs des mesures de diffusion dynamique de la lumière réalisées sur cette suspension confirment d'une part une taille moyenne de 43 ± 5 nm et d'autre part démontrent une distribution de taille parfaitement monomodale qui illustre de nouveau l'homogénéité de l'échantillon.

Enfin des mesures de potentiel Zêta réalisées sur Sc_{1,5}(2)Eu(5FA) ont indiqué que les nanoparticules avaient une charge de $+7,5 \pm 1,8$ mV. Cette valeur est donc légèrement moins positive que celle que celle mesurée en absence de FA pour Sc_{1,5}(2)Eu (à savoir $+12,4 \pm 3$ mV). Cette diminution de charge à la surface des nanoparticules peut vraisemblablement s'expliquer par l'apport de charges négatives provenant des groupements carboxyliques de FA.

III-3) Caractérisation par spectrofluorimétrie

Des mesures de spectrofluorimétrie ont été réalisées sur Sc_{1,5}(2)Eu(5FA) afin de déterminer l'influence de la présence de FA sur les propriétés de luminescence de l'ion Eu³⁺ contenu dans nos nano-systèmes. Après avoir soumis la suspension colloïdale à une excitation à 392,8 nm, nous avons enregistré un spectre d'émission (Figure 77) caractéristique de l'ion

Eu^{3+} , avec néanmoins une légère diminution en intensité ainsi qu'une dérive de ligne de base vraisemblablement attribuable à l'acide folique. Par ailleurs la mesure de temps de vie de luminescence (Figure 78) effectuée sur cette suspension mène à la valeur $\tau_{\text{FA}} = 0,74$ ms, similaire à la valeur rencontrée en absence de FA.

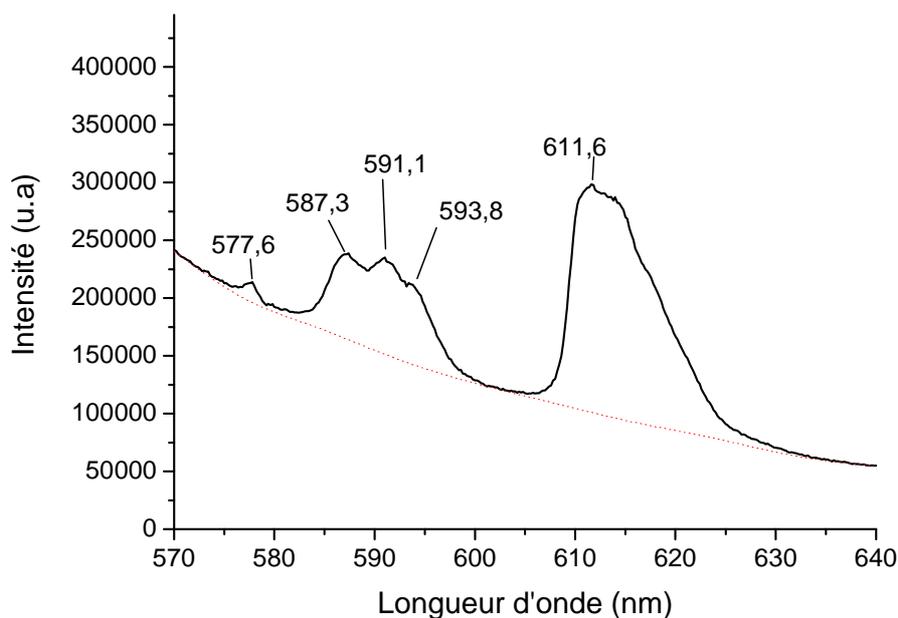


Figure 77 : Spectre d'émission de luminescence de la suspension colloïdale Sc1,5(2)Eu(5FA) préparée en présence d'acide folique, sous excitation à 392,8 nm, à température ambiante

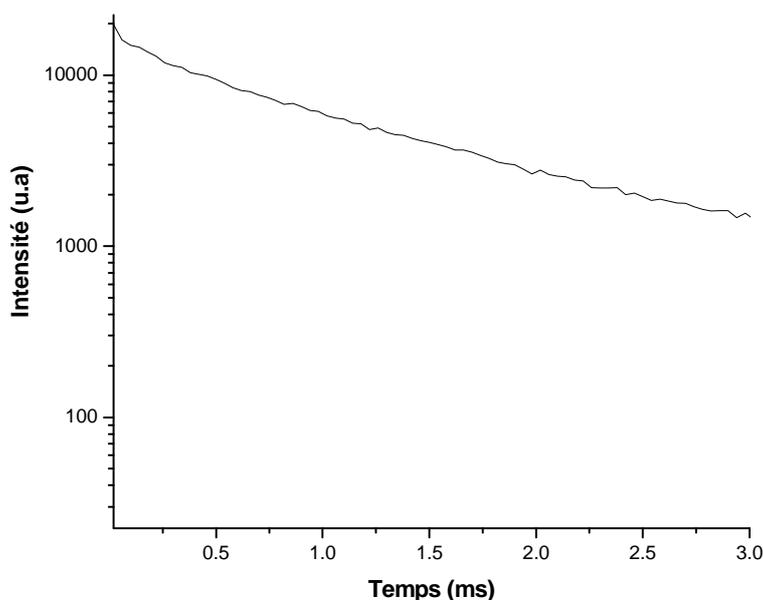


Figure 78 : Profil de déclin de luminescence du niveau émetteur ${}^5\text{D}_0$ de l'ion Eu^{3+} de la Sc1,5(2)Eu(5FA) préparée en présence d'acide folique, sous excitation à 392,8 nm et à température ambiante

Remarquons ici que la molécule d'acide folique présente une très grande similitude avec celle du méthotrexate (MTX, Figure 79), une molécule thérapeutique anti-cancéreuse connue pour inhiber la dihydrofolate réductase, une enzyme capitale dans le métabolisme cellulaire normal de l'acide folique.

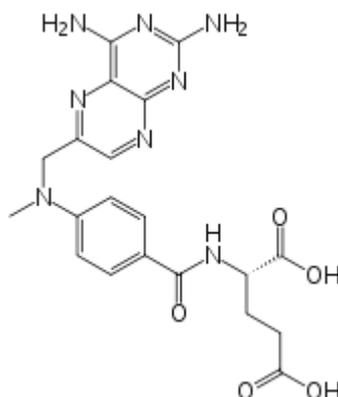


Figure 79 : Formule chimique du méthotrexate (MTX)

Dans ces conditions, il était intéressant d'élargir les possibilités potentiellement offertes par les nano-systèmes hybrides développés ici en substituant l'acide folique par le MTX. Le traitement thermique à 100°C pendant 16 h du MTX pouvant cependant potentiellement altérer ses propriétés thérapeutiques, nous avons étudié la possibilité d'associer FA ou MTX *après* l'étape de maturation en étuve, c'est-à-dire après retour à température ambiante, et non au début de la synthèse.

Cette étude a été réalisée dans un premier temps avec FA dans le cas de trois temps de contact avec la suspension colloïdale (avant dialyse) : 15 min, 1 heure, et 16 heures. Notons que les suspensions ainsi obtenus, après dialyse ainsi qu'après lyophilisation, présentent de nouveau la coloration jaunâtre caractéristique de l'acide folique. Les dosages élémentaires par C,H,N ont alors permis de déterminer la quantité de FA associée aux nanoparticules, pour les trois temps de contact, soit respectivement 1,76 , 1,35 et 2,16 mg FA/100 mg de suspension lyophilisée. Ces données indiquent donc la possibilité de greffer *a posteriori* de l'acide folique sur les nanoparticules en suspension.

Nous avons par ailleurs réalisé une manipulation identique, mais en substituant l'acide folique par le méthotrexate afin de tester la possibilité d'une association entre cet agent thérapeutique et les nanoparticules hybrides apatite-AEP. Compte-tenu des contraintes pratiques liées à la manipulation d'agents anti-cancéreux, il n'a pas été possible à ce stade de réaliser l'ensemble des caractérisations physico-chimiques habituelles ; néanmoins, toutes nos

observations macroscopiques (obtention d'une suspension fluide, stabilité dans le temps, coloration jaunâtre caractéristique du MTX persistante après dialyse) ont suggéré un comportement et des propriétés physico-chimiques pour la suspension très similaires aux colloïdes équivalents préparés en présence d'acide folique, validant donc a priori la possibilité d'adjoindre à ces nanoparticules colloïdales une fonction thérapeutique.

IV) Etude du processus d'adsorption de l'acide folique (FA) sur une apatite nanocristalline

Cette étude fait écho à celle réalisée précédemment sur l'adsorption de l'AEP sur une apatite nanocristalline, et vise à mieux définir le type d'interaction existant entre l'acide folique et des nanocristaux apatitiques.

Nous avons ici suivi exactement la même démarche et les mêmes paramètres expérimentaux qu'avec l'AEP ; de plus la même apatite non colloïdale As0Eu (lyophilisée) a été utilisée pour la détermination de l'isotherme d'adsorption de FA, à 100°C. Les expériences d'adsorption ont été, comme avec AEP, réalisées pour un temps de contact de 4 h avec des solutions de concentration croissantes en FA : 0,03 , 0,07 et 0,15 mol/l.

La Figure 80 reporte l'isotherme d'adsorption de l'acide folique obtenu sur As0Eu. Comme dans le cas de l'AEP, cet isotherme semble pouvoir être décrit de façon satisfaisante par le modèle de Langmuir, avec les constantes :

$$\begin{aligned} N_m &\cong 0,006 \pm 0,0011 \text{ mmol FA adsorbé/m}^2 \text{ de solide} \\ &\text{(soit } N_m \cong 0,0239 \pm 0,0044 \text{ mmol FA adsorbé/g de solide)} \\ \text{et } b &\cong 63 \pm 47 \text{ l/mol.} \end{aligned}$$

Ces résultats devront être confortés par des manipulations supplémentaires, permettant en particulier de diminuer les incertitudes attachées à ces valeurs ; néanmoins une première comparaison avec l'isotherme d'adsorption de l'AEP déterminé précédemment tend à indiquer un nombre de sites d'adsorption N_m nettement inférieur dans le cas de l'acide folique. Une des causes possibles de cet effet pourrait être liée à la différence de nature chimique entre

les groupements des molécules d'AEP et de FA (respectivement un groupement phosphate et un groupement carboxylate) qui interagissent avec les cations Ca^{2+} de surface de l'apatite. En effet, la plus grande capacité d'interaction de phosphates ou de phosphonates par rapport à des acides carboxyliques a déjà été signalée dans la littérature [Sallis (1998)].

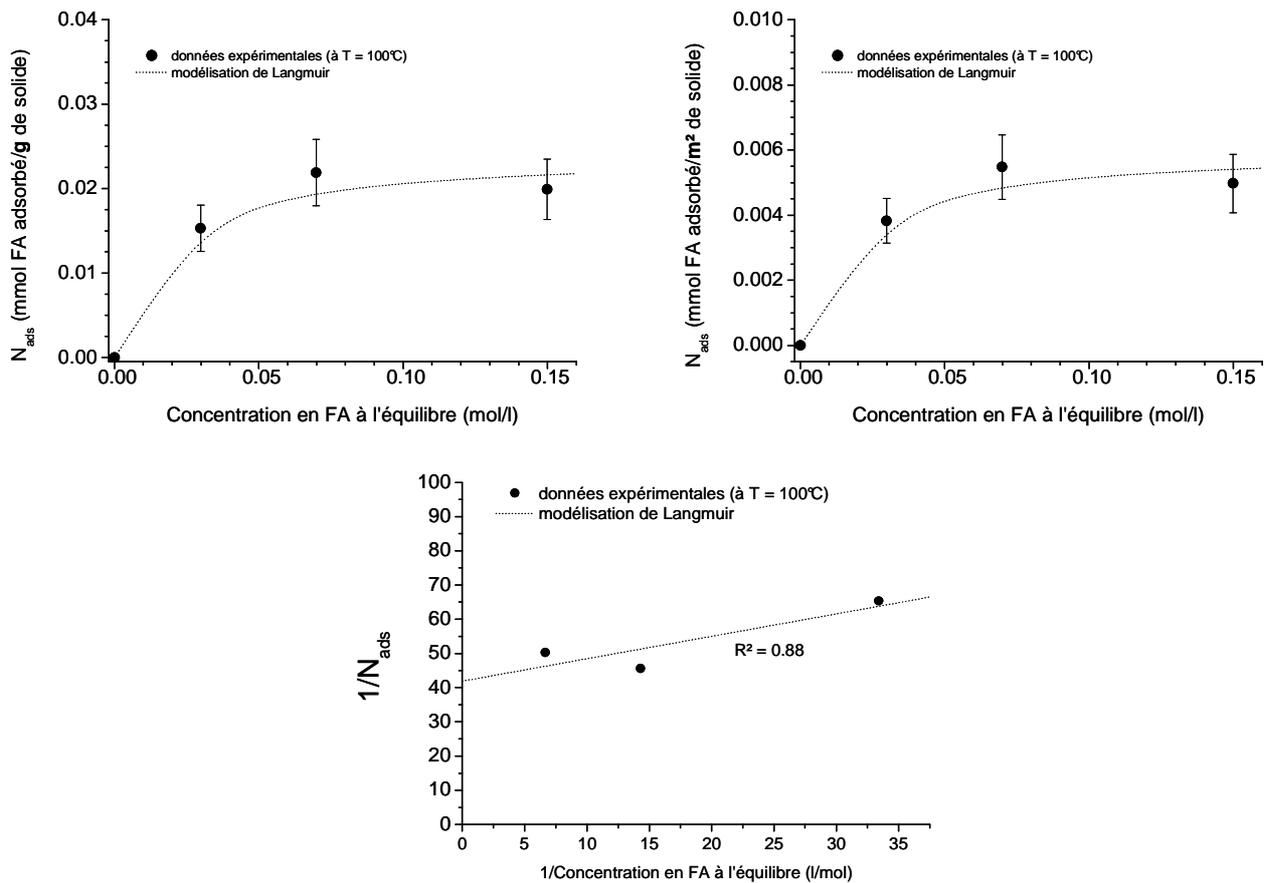


Figure 80 : Isotherme d'adsorption (en haut) à $T = 100^\circ\text{C}$, de FA sur une apatite nanocristalline As0Eu (par gramme et par m² de solide), et linéarisation de Langmuir (en bas)

Partie F : Discussion sur la nature physico-chimique des nanoparticules colloïdales préparées

Les données analytiques que nous avons pu réunir dans ce Chapitre (issues en particulier de dosages chimiques, analyses granulométriques et microscopiques, études spectroscopiques et de diffraction, mesures de potentiels Zêta) nous permettent ici de proposer une description des nanoparticules colloïdales préparées dans nos conditions expérimentales.

L'ensemble des résultats que nous avons obtenus suggère en effet que l'on peut décrire ces nanoparticules comme composées :

- d'un « *cœur* » formé de nanocristaux d'apatite non-stœchiométrique (solution solide d'hydroxyphosphate de calcium et d'euporium),
- à la surface duquel sont exposées des molécules d'AEP⁻ où le groupement phosphaté de chaque molécule d'AEP⁻ interagit directement avec un ou plusieurs ions Ca²⁺ en surface des nanocristaux apatitiques. Cette « *couronne* » d'AEP expose alors vers l'extérieur les groupements ammonium -NH₃⁺ des molécules d'AEP, permettant ainsi d'atteindre une stabilisation colloïdale par le biais de répulsions électrostatiques entre particules adjacentes.

Toutes nos tentatives menées en vue d'obtenir des suspensions colloïdales en introduisant l'AEP *après* l'étape de précipitation de l'apatite ont échoué, et la présence d'un agent stabilisant/dispersant tel que l'AEP s'est avérée indispensable pour l'établissement d'une formulation colloïdale stable (avec ou sans dopage à l'euporium). Ceci peut vraisemblablement s'expliquer par la nécessité de contrôler l'état d'agglomération du système *dès que les premiers nanocristaux d'apatite se forment* et non pas a posteriori.

Le phénomène d'agglomération (agrégation de plusieurs *nanocristaux* adjacents pour former des *nanoparticules*, plus grosses) semble en effet intervenir rapidement pendant la précipitation et mener à la création quasiment « irréversible » de ponts (interactions électrostatiques) entre nanocristaux adjacents, ne pouvant que difficilement être rompus même après traitement de sonification. Au contraire, la présence d'AEP⁻ dans le mélange réactionnel de manière simultanée avec les ions calcium et phosphates permet d'établir une compétitivité (pour les ions calcium présents dans le milieu) entre d'une part les ions

phosphates et d'autre part les ions moléculaires AEP⁻. En d'autres termes, la formation des nanocristaux d'apatite est alors affectée par la présence des molécules d'AEP qui présentent également une certaine affinité pour les ions Ca²⁺. Ces molécules peuvent en effet occuper (de façon plus ou moins stable) certains sites de croissance cristalline en surface des nanocristaux en formation (effet inhibiteur de croissance cristalline suggéré par nos observations) et limiter les rapprochements entre cristaux adjacents par répulsion électrostatique.

Nous avons par ailleurs montré (qualitativement et quantitativement) que la modification de la quantité d'AEP dans le milieu de synthèse permettait de moduler la taille moyenne des nanoparticules en suspension (tout au moins au-delà d'une teneur limite en deçà de laquelle une sédimentation apparaît). Lorsque la teneur en AEP dans le milieu décroît, le nombre de molécules d'AEP *effectivement* fixées sur l'ensemble des cristaux d'apatite diminue, ce qui a donc pour conséquence un moindre effet désagglomérant (moins de répulsions électrostatiques), et donc des particules plus grosses car constituées d'un nombre plus important de nanocristaux accolés.

Pour des rapports molaires $R = \text{AEP}/(\text{Ca}+\text{Eu})$ dans le milieu de synthèse situés entre 0,6 et 1, les longueurs moyennes de cristallites évaluées par application de la formule de Scherrer (données DRX) sont proches des tailles moyennes déterminées par diffusion de la lumière, soit environ 30 nm. Ceci suggère que les nanoparticules dans ces colloïdes sont constituées de nanocristaux individuels ou tout au moins de l'association d'un nombre très limité de nanocristaux empilés. Au contraire, pour les rapports R inférieurs à ~ 0,6 le nombre de nanocristaux composant chaque nanoparticule augmente progressivement jusqu'à la sédimentation du système par perte du caractère colloïdal (l'effet de la force gravitationnelle l'emportant alors sur le mouvement Brownien des particules).

Remarquons par ailleurs que les tentatives de synthèse menées en fixant le pH initial à 8 voire 7 (au lieu de 9,5) ont mené à des suspensions gélifiées. Une hypothèse pour expliquer ce phénomène semble pouvoir être proposée en rappelant qu'une diminution de pH (ou de température ou de temps de maturation) permet de façon générale d'obtenir des phases apatitiques plus éloignées de la stœchiométrie et présentant une couche hydratée en surface des nanocristaux plus développée [Drouet et al. (2009)]. Or une telle apatite, plus immature, est susceptible de présenter une énergie de surface plus grande (donc une plus grande *instabilité* thermodynamique) qu'une apatite plus mature (bien que la présence de la couche hydratée permette déjà de diminuer cette énergie). Dans ces conditions, l'agglomération ou du moins les interactions fortes entre nanocristaux adjacents représente potentiellement un

moyen de réduire l'énergie du système en faisant par exemple disparaître certaines surfaces. Notre hypothèse est que lorsque le pH diminue de 9,5 à 7, le processus d'agglomération entre nanocristaux adjacents s'intensifie au détriment de l'interaction AEP-apatite. Autrement dit, les nanocristaux très immatures formés à pH 7 s'agglomèreraient *dès leur formation* avant d'avoir eu l'opportunité d'interagir avec l'AEP pour former un hybride stable. Cette hypothèse, qui semble appuyée par nos données expérimentales, devra néanmoins être validée par exemple à l'aide de mesures grandeurs thermodynamiques telles que les énergies de surface (par exemple par mesures d'angles de contact sur suspensions lyophilisées et compactées). Signalons également qu'une modification de la structuration des molécules d'eau autour des particules pourrait par ailleurs également être impliquée dans le phénomène de gélification observé.

Ces considérations ont donc guidé notre démarche expérimentale en préparant les colloïdes à un pH alcalin propice à l'obtention de suspensions stables ; le passage à un pH physiologique étant envisagé dans un second temps (cet ajustement de pH à la valeur physiologique sera détaillé au Chapitre 3).

Enfin, rappelons que nous avons observé que l'adsorption d'acide folique en surface des nanoparticules était possible, et ce sans déstabiliser la suspension (les molécules AEP demeurant, du moins dans leur majorité, adsorbées en surface). Ceci peut s'expliquer par un greffage de type électrostatique (comme pour l'AEP) sur des ions Ca^{2+} disponibles en surface, menant à des complexes de surface de type folate de calcium.

Considérant l'ensemble des éléments discutés ci-dessus, la Figure 81 donne une illustration schématique de ce modèle.

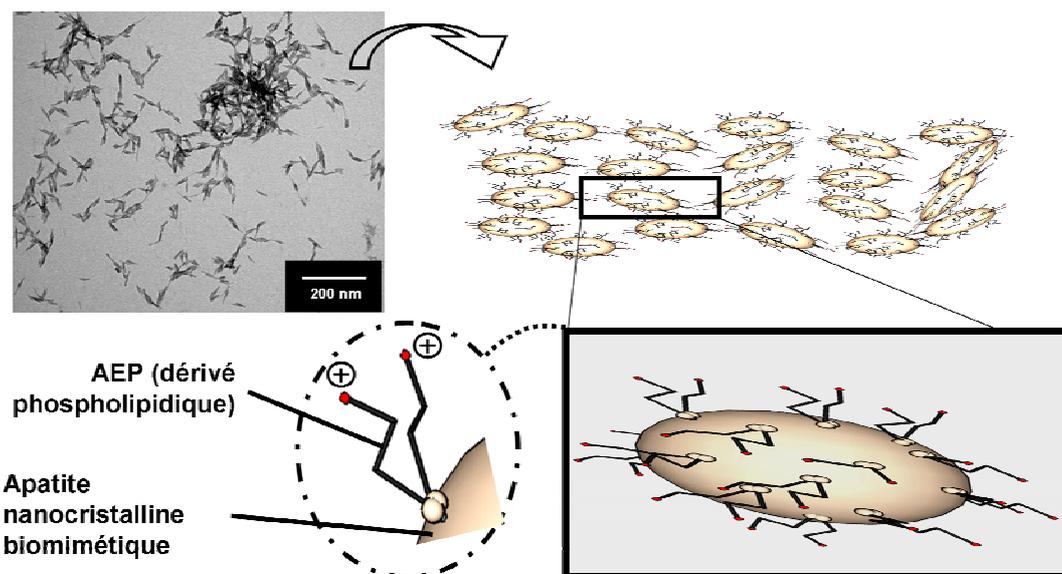


Figure 81 : Modèle descriptif proposé pour les nanoparticules colloïdales préparées ici

CHAPITRE 3 :
CONSIDERATIONS PRATIQUES VERS UNE
APPLICATION BIOMEDICALE
ET
TESTS BIOLOGIQUES PRELIMINAIRES

Comme nous l'avons déjà mentionné dans le Chapitre 1, la mise au point et le développement de nano-vecteurs ou nanosondes luminescentes (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 tels nano-systèmes, en particulier sous la forme de suspensions colloïdales permettant d'envisager des modes d'administration peu invasifs (voie intraveineuse, injection intra-tumorale...), on se doit également de prendre en compte diverses considérations additionnelles en particulier liées à la purification de ces nano-systèmes et à l'étude du mode d'interaction avec les cellules/tissus biologiques.

Dans ce contexte, nous nous sommes penchés dans ce chapitre sur divers aspects liés à ces considérations d'ordre inter-disciplinaires et se rapprochant de problématiques concrètes liées à une possible utilisation biomédicale. En particulier, nous nous sommes intéressés ici à :

- l'étude d'un procédé de purification des colloïdes préparés,
- la possibilité d'ajuster, après synthèse, le pH des suspensions à la valeur physiologique,
- la possibilité de remettre en suspension des colloïdes lyophilisés,
- le comportement des nanoparticules colloïdales à pH 5 simulant le pH des compartiments cellulaires,
- la détermination de la cytotoxicité des colloïdes,
- l'interaction entre nanoparticules colloïdales et macrophages humains,
- une étude préliminaire de l'internalisation des nanoparticules par des cellules cancéreuses,
- et la possibilité de détecter les particules par microscopie couplée à un spectrofluorimètre.

Certains de ces aspects faisant appel à l'interaction entre nanoparticules et milieu biologique, il nous a paru judicieux de rappeler en première partie de ce chapitre certains concepts de base relatifs aux barrières biologiques qu'un nano-vecteur/nano-système peut avoir à franchir (selon le mode d'administration) pour atteindre sa cible.

Partie A : Rappel bibliographique sur les principales barrières biologiques

Les barrières biologiques sont essentielles à la protection de notre organisme de toutes agressions externes ou internes (thermiques, chimiques, physiques, bactéries, virus...). En plus de leur fonction de protection, elles participent aux échanges métaboliques et gazeux entre les tissus et le sang, nécessaires au bon fonctionnement de nos cellules. Parmi les principales barrières biologiques on trouve : les épithéliums et endothéliums, les éléments du sang et les membranes plasmiques. La barrière épithéliale concerne plutôt l'administration par voie muqueuse, alors que l'endothélium ainsi que les éléments du sang interviennent plutôt dans l'administration par voie intraveineuse. La membrane plasmique constitue la dernière barrière que le vecteur doit franchir.

I) Barrière épithéliale

Les épithéliums sont des tissus qui marquent une bordure entre un tissu généralement conjonctif et l'extérieur du corps, une cavité interne ou externe. Un épithélium est un tissu de cellules étroitement juxtaposées reposant sur une lame basale qui le sépare du tissu conjonctif [Prugnolle et Thoreau (1996)] (Figure 82).

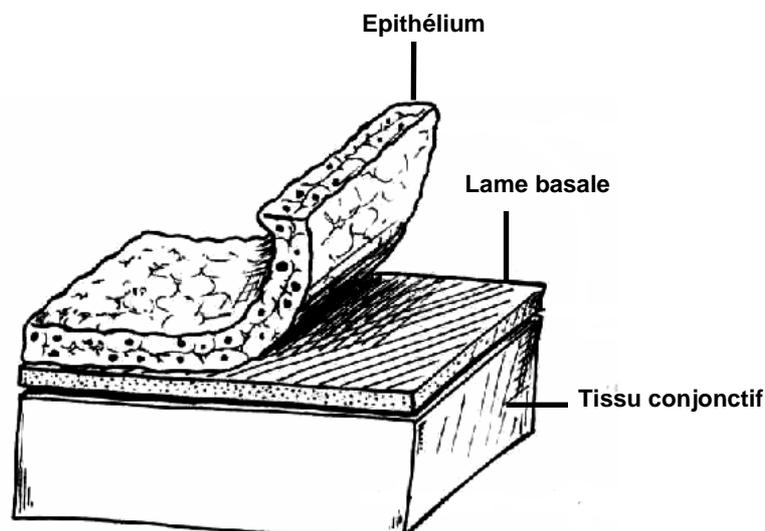


Figure 82 : Tissu épithéliale [Prugnolle et Thoreau (1996)]

Sa fonction de barrière est assurée par la perméabilité variable au type de molécule de sa lame basale, et son rôle de défense est joué par le tissu conjonctif dans les réactions inflammatoires. L'épithélium est appelé « *épiderme* » ou « *épithélium* », selon qu'il revête respectivement l'extérieur du corps ou des cavités en relation avec l'extérieur de l'organisme (tube digestif, voies urinaires et respiratoires). L'ensemble épiderme, lame basale et tissu conjonctif constituent la barrière biologique la plus visible de notre organisme à savoir notre *peau*. Dans le cas des cavités en relation avec l'extérieur de l'organisme, l'ensemble épithélium, lame basale et tissu conjonctif est appelé la *muqueuse*. Les muqueuses offrent chez l'homme une surface de contact d'environ 400 m² [Anjuère et Czerkinsky (2007)] constituant ainsi des cibles de choix pour l'administration de vecteurs par cette voie. Ainsi celle-ci constitue une barrière biologique pour tous les vecteurs destinés à être administré par voie muqueuse. Dans le cadre de cette thèse nous ne traiterons pas de cet aspect.

II) Endothélium et éléments du sang

Lorsqu'un vecteur est destiné à être administré par voie intraveineuse deux barrières biologiques interviennent : *l'endothélium et les éléments du sang*.

II-1) Endothélium

L'endothélium est un épithélium mais qui recouvre des cavités closes, notamment les cavités vasculaires (intima) dans lesquelles les nanoparticules seront injectées et où les éléments du sang circulent [Prugnolle et Thoreau (1996)]. Comme pour le tissu épithélial, les cellules endothéliales sont jointives et reposent sur une lame basale et un tissu conjonctif qui participe à la défense immunitaire (Figure 83) :

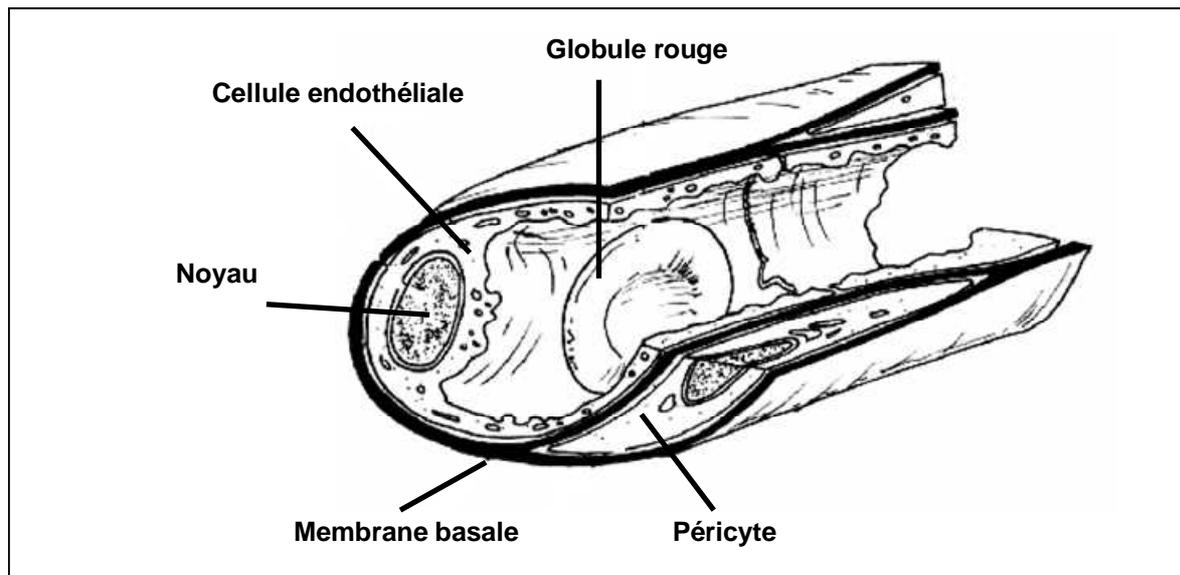


Figure 83 : Endothélium [Prugnolle et Thoreau (1996)]

Sa fonction de barrière biologique est également assurée par la présence de pores de 9 à 50 nm de diamètre [Fukumori et Ichikawa (2006)], dans le cytoplasme des cellules endothéliales, qui ne laissent traverser que des molécules de petites tailles. Dans le cas d'une tumeur la structure du tissu endothélial est cependant différente. En effet celui-ci est alors discontinu pour permettre une meilleure vascularisation des cellules tumorales et acheminer ainsi plus d'éléments nutritifs nécessaires à leur prolifération [Andrieux et al. (2003)]. A certains endroits la lame basale est totalement absente et une très grande partie des pores ont une taille de l'ordre de 100 nm [Taylor et Granger (1983)]. Cette différence de structure entre le tissu sain et le tissu tumoral facilite donc la traversée des nanoparticules à travers l'endothélium malade à condition que celles-ci soient inférieures à 100 nm [Maitani et al. (1997) ; Fukumori et Ichikawa (2006)]. D'autre part le manque de présence (dans le tissu tumoral par rapport à un tissu sain) de cellules lymphatiques nécessaires à l'élimination d'élément étranger, favorise l'internalisation des nanoparticules par les cellules tumorales [Maeda (1992)].

II-2) Eléments du sang

Le sang est un tissu fluide formé de *plasma* et de *cellules sanguines* appelées *éléments figurés du sang* [Prugnotte et Thoreau (1996)] :

-Le plasma :

Il représente 55% de volume sanguin. Composé de *fibrinogène* (glycoprotéine) et de *sérum*, le plasma est un liquide de pH 7,4 dans lequel baignent les cellules sanguines. Le fibrinogène joue un rôle important dans le phénomène de coagulation (transformation en fibrine et formation de caillot). Le sérum représente la fraction du plasma qui se sépare du caillot à la fin de la coagulation. Il contient des nutriments (lipides, glucides, sels minéraux, eau) et des hormones nécessaires au bon fonctionnement et au développement de nos cellules. Le sérum contient également plus de 3700 types de protéines différentes [Cedervall et al. (2007)]. Certaines d'entre elles, appelées opsonines, telles que les immunoglobulines de type G (IgG), les éléments du « complément », et la fibronectine [Maillet (1995) ; Andrieux et al. (2003)] ont pour rôle d'alerter les cellules de l'immunité (ex: macrophages) du *système réticulo-endothélial (RES)* (cf *Les éléments figurés du sang*) quant à la présence d'éléments étrangers.

-Les éléments figurés du sang :

Ils représentent 45% du volume sanguin. Les éléments figurés du sang sont synthétisés dans la moelle osseuse sous la forme de cellules souches dites « totipotentes » [Prugnotte et Thoreau (1996)]. Celles-ci, sous l'influence de certains facteurs vont se différencier en *plaquettes*, *globules rouges*, et *globules blancs*. Ils constituent les trois groupes des *éléments figurés du sang*. Les plaquettes (ou *thrombocytes*) interviennent dans la coagulation du sang. Les globules rouges (ou *hématies*) ont pour fonction de transporter le CO₂ des tissus aux poumons et le O₂ des poumons vers les tissus. Le dernier groupe d'éléments figurés sont les globules blancs (ou *leucocytes*) qui jouent un rôle fondamental dans la défense immunitaire de l'organisme contre tout corps considéré comme étranger : virus, bactéries, voir vecteurs...

Il existe trois variétés de leucocytes: *les granulocytes*, *les lymphocytes* et *les monocytes*. Les monocytes, ou plus précisément *les macrophages* (leur forme mature), assurent la phagocytose (destruction par digestion) du corps étranger alors appelé *antigène*. Les leucocytes présents dans le sang, le tissu conjonctif, les ganglions, la rate et la moelle osseuse, constituent le *système réticulo-endothélial (SRE)*, avec les *cellules de Kupffer* du foie (qui possèdent également une capacité d'absorption et de digestion de l'antigène). Ce système SRE a en particulier pour fonction de synthétiser les éléments figurés du sang mais également d'orchestrer par des mécanismes immunitaires complexes la destruction des antigènes détectés dans la circulation systémique [Göppert et Müller (2005)].

Dans le cas des macrophages, ce sont plus particulièrement les cellules du foie (cellules de Kupffer) et d'une zone marginale de la rate qui assurent l'élimination du corps étranger [Andrieux et al. (2003)]. On parle dans ce cas de *système des phagocytes mononucléés (SPM)* issus des monocytes [Prugnotte et Thoreau (1996)]. Dans le processus de reconnaissance d'éléments étrangers dans la circulation sanguine, une des étapes clés est l'adsorption à leur surface d'opsonines présentes dans le plasma sanguin [Göppert et Müller (2005)]. Ces protéines ont pour rôle, dans la défense immunitaire, de se combiner aux antigènes (ou débris cellulaires) pour permettre leur détection par les macrophages et faciliter leur phagocytose (internalisation dans le macrophage par endocytose et dégradation dans les lysosomes grâce aux enzymes lysosomiales). En effet les opsonines sont reconnues par des récepteurs spécifiques localisés à la surface des macrophages du système SPM [Maillet (1995)].

Les nano-systèmes à visée diagnostique ou thérapeutique (vecteurs) pouvant être identifiés comme « éléments étrangers », nous allons dans la partie suivante préciser la notion d'interactions nanoparticule-protéine, qui peuvent s'établir dès les premiers instants après administration.

II-3) Interaction nanoparticule-protéine

La notion d'interaction « nanoparticule-protéine » est fondamentale dans la compréhension du devenir immédiat et à long terme du vecteur après injection dans la circulation sanguine. Ceci inclut non seulement les interactions avec les opsonines, mais également potentiellement toute autre protéine présente dans le milieu.

L'étude détaillée de complexes « nanoparticule-protéines » permet d'identifier les altérations éventuelles provoquées par l'adsorption des protéines sur les caractéristiques physico-chimiques de la nanoparticule, voire de mettre en évidence des modifications de fonction biologique des protéines à l'état adsorbé [Lynch et al. (2008)].

Du point de vue des nanoparticules (par exemple stabilisées sous forme colloïdale par greffage d'un agent dispersant), une des conséquences que l'on peut aisément anticiper est le risque de désorption de l'agent dispersant (compétitivité d'adsorption avec des protéines environnantes), nécessaire à la stabilité de la suspension. Ceci peut alors conduire à l'agrégation des nanoparticules dans la circulation systémique et provoquer un risque potentiel d'embolie pour le patient [Couvreur et Vauthier (2006)].

Rappelons par ailleurs que les protéines sont constituées d'acides aminés dont l'agencement ou plus exactement le repliement constitue la *conformation* protéique, qui contribue à conférer à la protéine sa fonction biologique. Il n'est donc pas à exclure que l'interaction nanoparticule-protéine puisse engendrer des modifications conformationnelles pouvant conduire à un dysfonctionnement [Lynch et al. (2008)]. Cela pose potentiellement le problème de la toxicité que la nanoparticule peut induire sur le fonctionnement du métabolisme. Enfin l'étude de l'interaction « protéine-nanoparticule », malgré sa complexité, permet d'identifier les différents paramètres (taille, forme, charge, propriétés hydrophiles/hydrophobes...) de la nanoparticule qui influencent l'identité et/ou la quantité de protéines adsorbées. Ainsi, les paramètres taille et forme ont plutôt un impact sur la *quantité* de protéines adsorbées, alors que les paramètres chargés (négative, nulle, positive), propriétés hydrophiles/hydrophobes ont un impact aussi bien sur la *quantité* que sur l'*identité* des protéines (Tableau 22).

Il faut néanmoins garder à l'esprit qu'en raison de la complexité du milieu biologique, chaque type de système aura un profil d'interaction « nanoparticule - protéine » particulier, dépendant en particulier de la nature chimique du vecteur.

Paramètres physico-chimiques de la nanoparticule	Effet sur l'interaction avec les protéines	Références bibliographiques
Charge de surface	Plus la charge est neutre, plus l'opsonisation est lente.	[Roser et al. (1998)] [Owens et Peppas (2006)]
Propriétés hydrophile/hydrophobe	<ul style="list-style-type: none"> • Les nanoparticules hydrophobes s'opsonisent plus rapidement que les nanoparticules hydrophiles. • L'hydrophilie et l'hydrophobie influencent à la fois la quantité et l'identité de la protéine. 	[Carstensen et al. (1992)] [luck et al. (1998)] [Göppert et Müller (2003)] [Göppert et Müller (2005)] [Cedervall et al. (2007)]
Taille et forme	Elles influencent la quantité de protéines adsorbées mais ont peu d'effet sur leur identité	[Cedervall et al. (2007)]

Tableau 22 : Différents paramètres influençant l'interaction « nanoparticule-protéines»

Comme évoqué précédemment, le plasma humain contient plus de 3700 protéines différentes [Cedervall et al. (2007)] dont environ 50 ont été identifiées en association avec une très grande variété de nanoparticules, destinées aussi bien au traitement qu'au diagnostic de tumeurs. Parmi ces 50 protéines on trouve en grande majorité l'albumine, la famille des immunoglobulines G (IgG), la fibronectine et les apolipoprotéines (Tableau 23).

Cedervall et al. (2007) ont suggéré que ce profil particulier d'interaction « nanoparticule-protéine », s'expliquait par l'abondance de ces protéines dans le sang. Néanmoins, ces protéines peuvent dans un second temps être déplacées par d'autres moins abondantes mais ayant une meilleure affinité avec les nanoparticules, et ceci en quelques secondes [Vroman et al. (1980); Vroman et Adams (1986)]. Ce processus de compétition entre les protéines est appelé «*Effet Vroman*».

Nanoparticules (systèmes)	Protéines identifiées	Références bibliographiques
Liposomes	Albumine, fibronectine, apolipoprotéines, IgG, IgM, α 1-antitrypsin, α 2-macroglobuline	[Diederichs. 1996]
Nanoparticules lipidiques, recouvertes du poloxamer 188	Fibronectine, IgG, IgM, apolipoprotéines, transthyretin, albumine	[Göppert et Müller (2003)]
Nanoparticules d'acide polylactique recouvertes de polyéthylène glycol (PEG)	Fibronectine, IgG, apolipoprotéines, albumine	[Gref et al. (2000)]
Nanoparticules d'oxyde de fer	Albumine, fibronectine, apolipoprotéines (A-1), IgG, IgM, C3b	[Thode et al. (1997)]
Nanotubes de carbone (mono paroi)	Albumine, apolipoprotéines, fibronectine, C1q	[Salvador-Morales et al. (2006)]

Tableau 23 : Protéines les plus fréquemment retrouvées à la surface de nanoparticules à visé biomédicale

Lorsque des nanoparticules sont incubées dans une solution protéique, se sont les protéines les plus abondantes qui vont se fixer en premier. L'adsorption de protéines à la surface de la nanoparticule se décompose en deux temps : il y a d'abord un transfert (diffusion) de la protéine, suivi de sa fixation à la surface de la nanoparticule. La fixation protéique sur un substrat peut faire intervenir différents types de liaisons dont les liaisons hydrogène et les liaisons électrostatiques. Par exemple, Dong et al. (2007) ont montré que la fixation de la protéine BMP-2 (facteur de croissance) à la surface d'apatites est assurée par trois types de liaisons électrostatiques. La première est effectuée entre des fonctions COO^- de la protéine et des ions Ca^{2+} présents à la surface de l'apatite. Les deux autres liaisons sont des liaisons hydrogène réalisées entre les groupements OH et NH_2 de la protéine et les ions PO_4^{3-} de l'apatite.

Lorsque des nanoparticules sont incubées dans du plasma, donc en présence de nombreuses protéines, l'adsorption protéique peut souvent se décrire par des isothermes de type Langmuir ou Freundlich [Lee et Kim (1974)]. L'adsorption se déroule en deux phases : une première phase rapide de fixation des protéines (les plus abondantes), suivie d'une phase de plateau où la surface de la nanoparticule n'adsorbe plus de protéines. En effet, à ce stade un équilibre s'établit entre protéines dissoutes et protéines adsorbées. La nature de la surface de

la nanoparticule conditionne cet échange. Ainsi si la surface de la nanoparticule est hydrophile, elle adsorbera plutôt l'albumine ; en revanche pour une surface hydrophobe, celle-ci adsorbera plutôt du fibrinogène. L'adsorption protéique peut également entraîner des modifications de la surface de la nanoparticule : ainsi, des polymères à surface initialement hydrophobe peuvent devenir hydrophiles après adsorption protéique.

Vroman et al. (1980) ont montré que des nanoparticules lipidiques placées dans du plasma humain sont d'abord recouvertes par de l'albumine, protéine la plus abondante du plasma, (3500-5000 mg/100ml⁻¹) [Blunk et al. (1993)]. Celle-ci est ensuite remplacée par du fibrinogène, moins abondant (200-450 mg/100ml⁻¹) [Blunk et al. (1993)], l'IHRP (protéine de concentration non déterminée mais inférieure à celle du fibronogène) [Göppert et Müller (2005)] et enfin par une apolipoprotéine « l'apoJ » (3,5-10,5 mg/ml⁻¹) [Blunk et al. (1996)]. D'autre part, la conformation en α -hélice de cette dernière est relativement flexible [Graham et Philips (1979)], ce qui lui permet de s'adapter et d'améliorer sa surface de contact avec la nanoparticule. D'ailleurs la flexibilité de sa structure lui en fait une protéine très efficace pour l'élimination de résidus non-polaires.

Contrairement à l'albumine et au fibrinogène, qualifiés de « hard proteins » [Arai et Norde (1990) ; Philips (1992)], les apolipoprotéines sont ainsi qualifiées de « soft proteins » [Graham et Philips (1979)].

Un tel échange successif de protéines adsorbées sur les nanoparticules s'explique par des affinités croissantes pour la surface en question. Ainsi, les protéines les plus abondantes fixées en premier lieu cèdent leur place à des protéines moins nombreuses mais présentant une affinité plus importante pour la surface du vecteur.

La fixation de protéines à la surface de la nanoparticule peut avoir à la fois des avantages et des inconvénients [Sant et al. 2008]. Par exemple, la fixation d'apolipoprotéines peut faciliter la traversé des barrières hémato-encéphaliques [Göppert et Müller (2005)], mais également augmenter l'élimination des nanoparticules par les cellules du système SPM [Owens et Peppas (2006)]. Ainsi pour des nanoparticules lipidiques injectées dans la circulation systémique, 90% des celles-ci [O'Mullane et al. (1987)] sont éliminées par les cellules du système SPM et ceci au bout de 5 minutes [Illum et al. (1987)]. Une des problématiques rencontrées pour la mise au point de système à long temps de circulation consiste alors à éviter l'interaction entre nanoparticules et protéines, ce qui est l'objet du point suivant.

II-4) Comment « éviter » l'interaction protéine-nanoparticule ?

Comme nous venons de l'évoquer ci-dessus les protéines peuvent être considérées, du moins dans certains cas, comme une « barrière » biologique additionnelle qui peut altérer et/ou initier l'élimination prématurée des nanoparticules en alertant le système SPM.

Une stratégie déployée afin d'empêcher l'approche et l'ancrage de protéines à la surface de nano-systèmes consiste à protéger ou encore « masquer » leur surface [Gref et al. (2000)]. Cette protection a par exemple pu être réalisée par le greffage de polymères (cf Tableau 24) jouant un rôle de « bouclier protecteur » grâce à la répulsion stérique qu'ils engendrent.

Parmi les polymères les plus utilisés, le polyéthylène-glycol (PEG) constitue une protection efficace. En effet, ce polymère hydrophile et flexible, greffé par des liaisons covalentes [Kohler et al. (2004)] ou adsorbé à la surface de la nanoparticule [Bhattacharya et al. (2007)] a démontré son efficacité sur de nombreux systèmes. Il limite considérablement l'adsorption à la fois de protéines de type albumine, fibrinogène et des protéines sentinelles (C3). Woodle et Lasic (1992) ont ainsi montré que le greffage de PEG à la surface de liposomes a pour effet d'augmenter leur temps de demi-vie dans le torrent circulatoire et d'en diminuer l'élimination par les cellules du système SPM. Il a également été montré dans cet exemple que cette absence de reconnaissance par le système SPM, appelé caractère « furtif », est d'autant plus prononcé que :

- 1) la taille du liposome est petite,
- 2) le poids moléculaire du PEG est supérieur ou égal à 2000 D [Andrieux et al. (2003)].
- 3) La densité de PEG entourant les nanoparticules est importante [Andrieux et al. (2003)].

Polymères greffés en surface de la nanoparticule	Formules semi-développées	Références bibliographiques
Polyéthylène glycol (PEG)		[Andrieux et al. (2003)]
Poloxamer		[Göppert et Müller (2003)]
Poloxamine		[Moghimi et al. (1993)]
Dextran		[Lemarchand et al. (2006)]
Polysorbate	$C_{58}H_{114}O_{26}$ ⁽¹⁾	[Göppert et Müller (2005)]
Chitosane		[Donadel et al. (2008)]
Phospholipides	⁽²⁾	[Duan et al. (2008)]

⁽¹⁾ Pour des raisons de clarté la formule semi-développée de polysorbate n'est pas présentée.

⁽²⁾ La structure des phospholipides sera rappelée dans la partie III-1 ci-dessous.

Tableau 24 : Quelques exemples de polymères greffés à la surface de nanoparticules pour limiter l'interaction protéique

III) Membrane plasmique

III-1) Rappels sur la membrane plasmique

Dans le long chemin périlleux que doit traverser le vecteur pour atteindre la cellule cible, la membrane cellulaire (membrane plasmique) constitue la dernière barrière biologique que doit franchir le vecteur pour agir à des fins thérapeutiques et/ou diagnostiques. Cette membrane est constituée par un assemblage de lipides et de protéines (souvent glycosylées) (Figure 84).

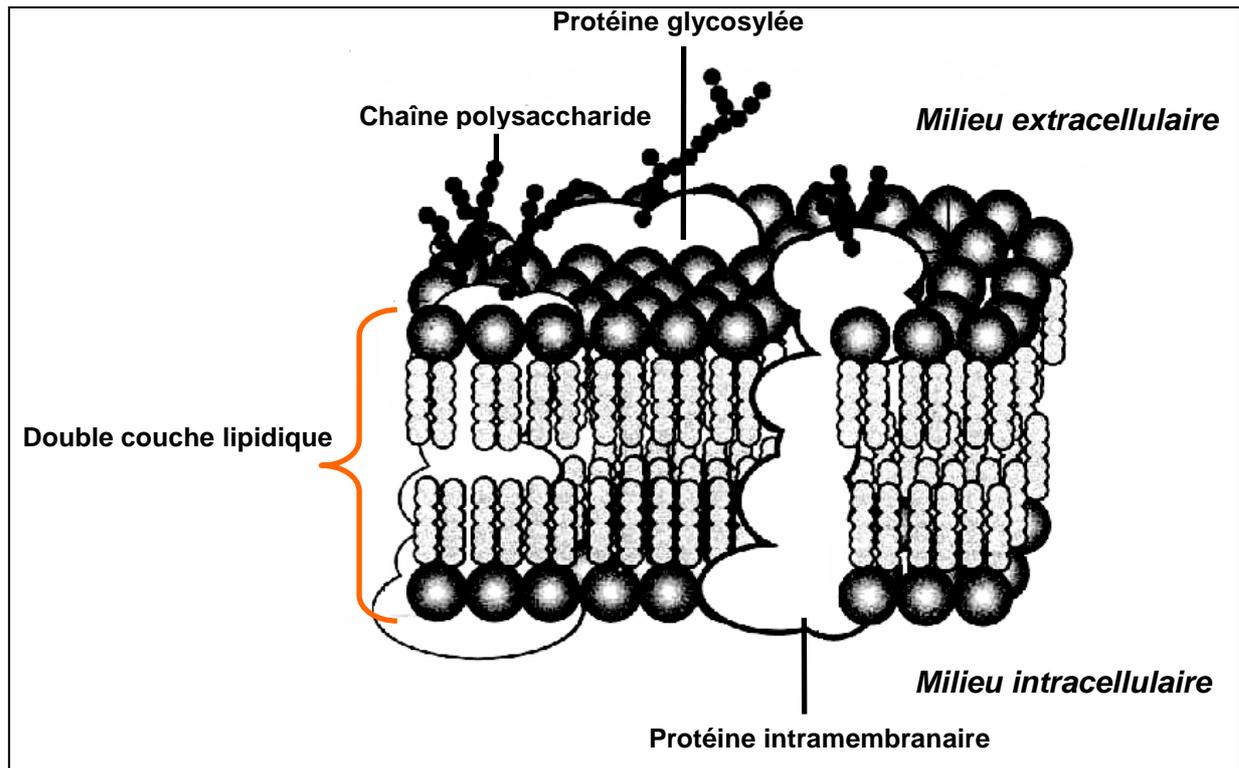


Figure 84 : Représentation de la membrane plasmique [Maillet (1995)]

Les *lipides*, principalement les phospholipides, se disposent en double couche (double feuillet) pour réaliser une barrière presque imperméable aux molécules hydrosolubles.

Les groupes polaires des phospholipides occupent la face externe (feuillet osmiophile externe) et la face interne (feuillet osmiophile interne) de la membrane cellulaire. La tête polaire est une association de trois molécules :

- un groupement terminal (ex : choline (a), éthanolamine (b), sérine (c))
- un phosphate
- une molécule de glycérol

Les groupes apolaires se situent dans le feuillet médian osmiophobe : leurs chaînes carbonées (chaînes aliphatiques saturées: $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2\dots$ ou insaturées $-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2\dots$) sont orientées perpendiculairement de la membrane dans l'espace séparant les groupes polaires (Figure 85).

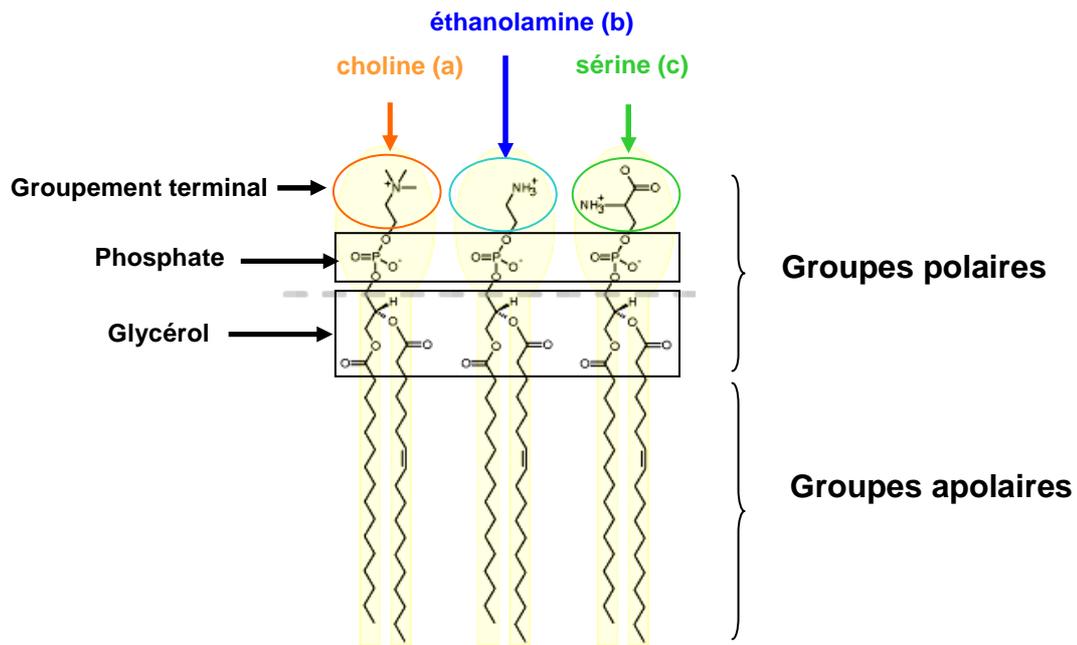


Figure 85 : Schéma de molécules lipidiques formant la membrane plasmique

Les principaux lipides membranaires comprennent les phospholipides, le cholestérol et les glycolipides : les phospholipides (phosphatides ou glycérophosphatides) résultent de l'estérification du glycérol par deux acides gras et par un acide phosphorique. Présents sous diverses formes (acides phosphatidiques, phosphatidyl-éthanolamine...), ils jouent un rôle important dans la fluidité de la membrane plasmique. En effet la présence ou l'absence de double liaison dans la chaîne aliphatique détermine la fluidité de la membrane. Le cholestérol possède un groupement polaire et un noyau stéroïde. Les molécules de cholestérol en s'intercalant entre les chaînes aliphatiques des lipides jouent le rôle de renfort mécanique. Enfin les glycolipides, quant à eux, interviennent dans la détermination du groupe sanguin.

Outre les (phospho)lipides constitutifs de la membrane cellulaire, on peut également noter l'existence de *protéines membranaires* ; celles-ci pouvant jouer un rôle de barrière « additionnelle », notamment par la présence à leurs extrémités de groupements chargés de type amino-terminal (NH_2) et carboxy-terminal (COOH), pouvant potentiellement interagir avec les nano-systèmes administrés. Ces protéines sont cependant moins nombreuses que les lipides (50 lipides pour 1 protéine), mais plus importantes par leur taille (30 à 50 fois plus volumineuses que les lipides). En fonction des acides aminés qui la constituent, tout au long de la protéine, alternent des zones hydrophobes et hydrophiles. On distingue deux types de protéines : les protéines membranaires intrinsèques et les protéines membranaires

périphériques. Les protéines membranaires intrinsèques traversent en une ou plusieurs fois la membrane plasmique (Figure 86). Leurs parties hydrophobes sont dans la zone intramembranaire. Elles interagissent avec les chaînes carbonées des lipides. Les extrémités hydrophiles terminent, l'une dans l'espace extracellulaire, l'autre dans le cytoplasme. Quelle que soit leur localisation, ces extrémités peuvent être soit amino-terminales soit carboxy-terminales. Les protéines membranaires périphériques peuvent être extra ou intracellulaires. Elles sont liées par l'intermédiaire de chaînes d'acides gras ou d'oligosaccharide respectivement au milieu extra ou intracellulaire. Outre leur rôle dans les échanges métaboliques (substances nutritionnelles, informations hormonales...), elles participent également aux mécanismes de reconnaissance cellulaires et à la fixation de virus, toxines ou encore de médicament.

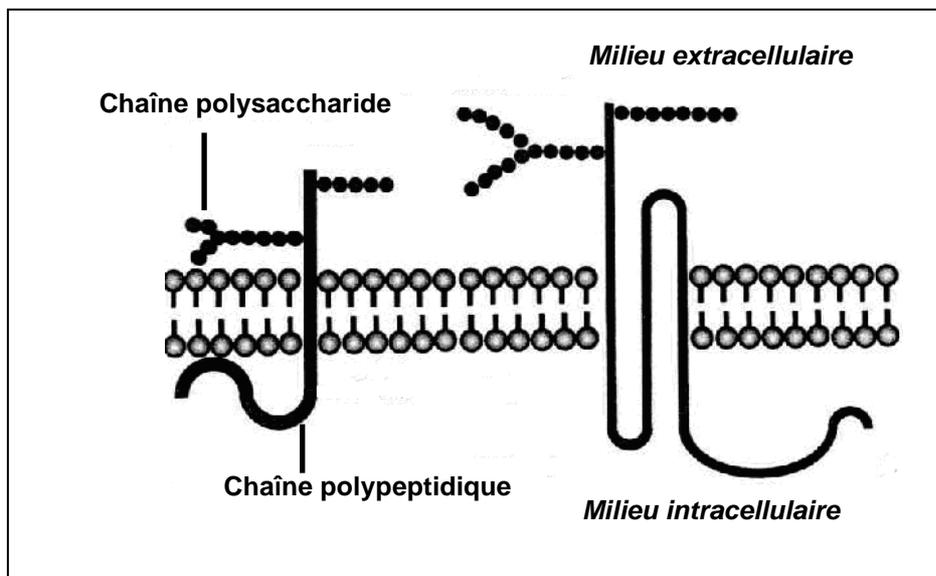


Figure 86 : Les protéines intrinsèques [Maillet (1995)]

A travers son architecture et ses constituants (lipides et protéines) la membrane plasmique joue ainsi un rôle essentiel dans la pénétration de substances (et donc de nanoparticules) dans le milieu intracellulaire. Selon les cas, le processus de pénétration peut engendrer ou non une modification de morphologie de la membrane plasmique : on parlera alors respectivement de *transport cytotique* et de *transport passif*.

III-2) Transport passif et transport cytotique

III-2-a) Transport passif

Le transport passif est le passage d'un ion ou une molécule à travers les pores de la membrane cellulaire. Ce mode de transport n'induit pas de modification notable de la membrane cellulaire. Plusieurs paramètres évoqués précédemment tels que la taille, la charge, l'hydrophilie/hydrophobie, entrent en jeu dans la facilité avec laquelle une nanoparticule pénètre ou non la membrane plasmique de la cellule :

-*La taille de la nanoparticule* : la vitesse de pénétration est inversement proportionnelle à son volume.

-*L'absence de polarité* : une nanoparticule polarisée ne traverse pas ou peu la membrane plasmique (par transport passif).

-*L'absence de charge* : une nanoparticule chargée et ayant un degré élevé d'hydratation, ne pénètre pas la membrane.

-*Le coefficient de partition* (rapport solubilité dans les lipides/ solubilité dans l'eau) : Plus ce rapport est élevé, plus la facilité de passage transmembranaire de la substance augmente. Ainsi les molécules telles que les alcools ou les aldéhydes, traversent très rapidement la membrane plasmique.

-*Le gradient de concentration* : la vitesse de progression à travers la membrane repose (si le transport est possible) sur la différence de concentration de la molécule de part et d'autre de la membrane. Plus le gradient de concentration est important, plus la vitesse de migration de la molécule est rapide vers la zone de faible concentration.

III-2-b) Transport cytotique

Le transport cytotique correspond à la pénétration des substances grâce à des mouvements de petite amplitude de la membrane plasmique, qui aboutissent à la formation, (par *endocytose*, *phagocytose*, *exocytose*) de vacuoles ou vésicules contenant le matériel à transporter. Une fois ces vacuoles formées, le matériel contenu à l'intérieur (ex : vecteur) pourra jouer son rôle, voire être éliminé par voie chimique. Concernant les nanoparticules, se sont les processus d'endocytose et de phagocytose qui sont les plus fréquemment rencontrés. Nous allons donc ici nous limiter à décrire plus précisément ces deux processus.

L'endocytose :

L'endocytose d'une entité extracellulaire fait appel à des récepteurs membranaires regroupés en « puits ». Après reconnaissance de l'entité extracellulaire, le puits recouvert de récepteurs s'invagine rapidement pour finir par s'isoler (Figure 87).

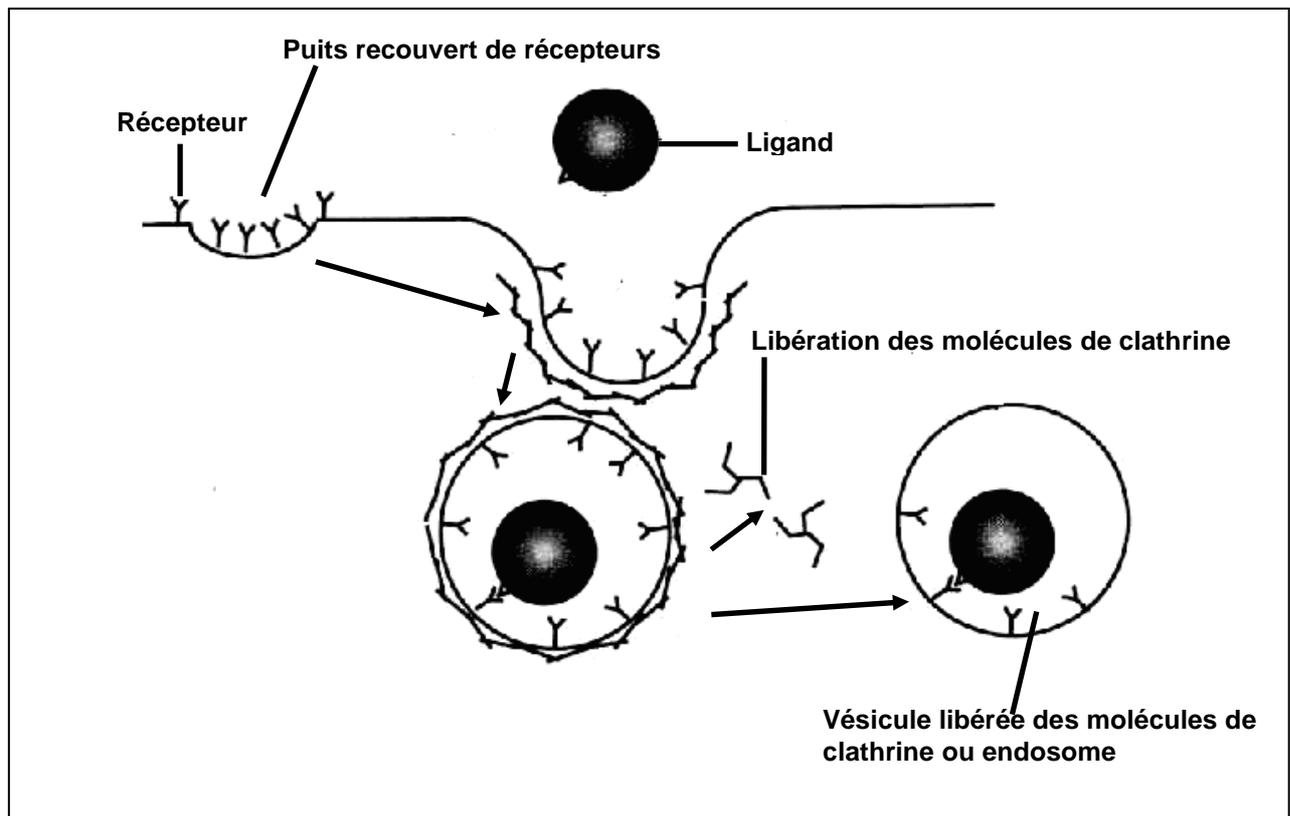


Figure 87 : Mécanisme d'endocytose (d'après Darnell, [Maillet (1995)])

Le processus d'endocytose implique généralement la médiation d'un complexe protéique : la clathrine. Celle-ci est constituée de trois longues chaînes polypeptidiques et de trois chaînes polypeptidiques courtes, qui constituent un édifice à trois pieds (triskélion) (Figure 88a). Avant endocytose, la membrane plasmique se recouvre sur sa face interne (dans la région où l'intériorisation se produira) d'un réseau hexa- ou pentagonal de clathrine. L'assemblage des triskélions aboutit à la formation d'une sorte de corbeille à mailles hexagonales ou pentagonales dans laquelle se trouve l'entité invaginée (Figure 88b).

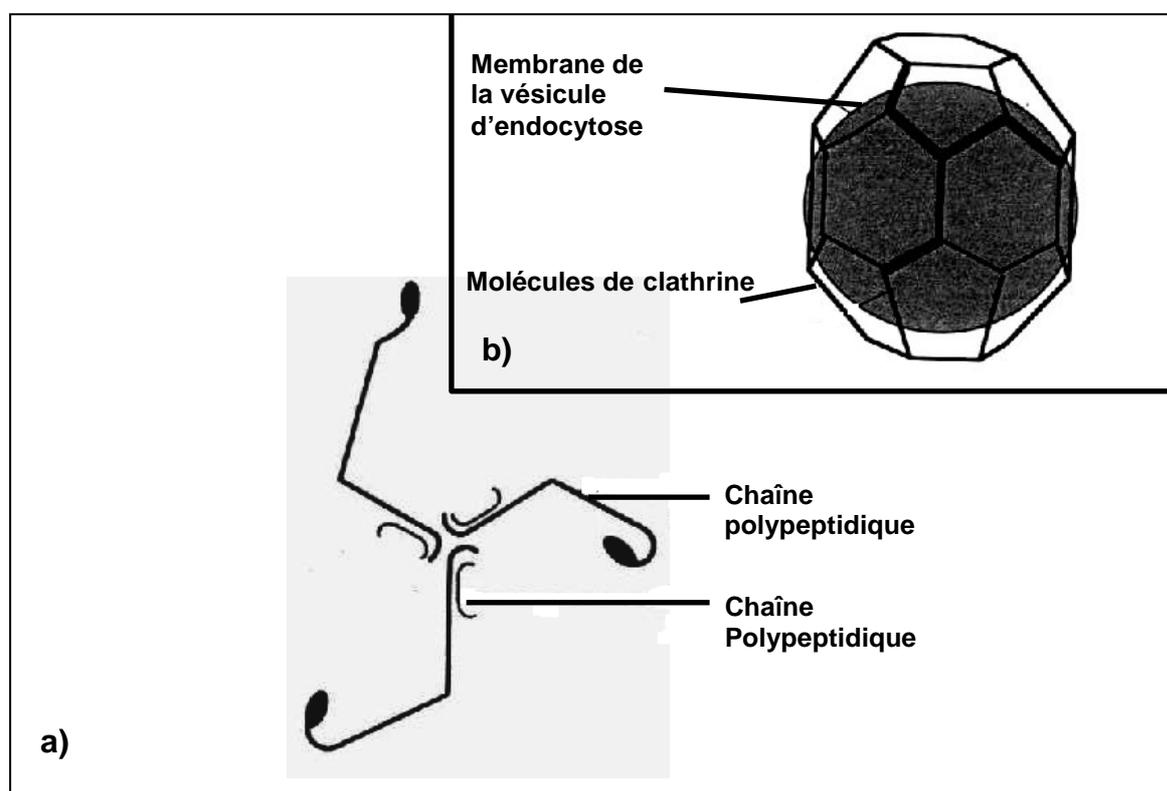


Figure 88 : a) Molécule de triskélium b) Représentation tridimensionnelle d'une vésicule d'endocytose

Une fois cette vésicule formée, très rapidement (sous l'action d'une enzyme l'ATPase de « déshabillage »), la vésicule se débarrasse des molécules de clathrine. En perdant ce revêtement, elle se transforme en *endosome* qui fusionne avec une vésicule « découplante » dénommée CURL (compartment of uncoupling of receptor and ligand) comme indiqué sur la Figure 89. L'élimination des entités ayant subi l'endocytose est alors dépendante de leur stabilité à un pH acide de l'ordre de 5 [Lee et al. (1996)] présent dans le compartiment endosomal (lequel possède des pompes à protons lui permettant un ravitaillement en continu). L'endosome se scinde alors en deux parties : une partie contenant l'entité (ex : vecteur) qui se retrouve dépourvue de récepteurs, et une partie qui bourgeonne en vésicule et qui regroupe l'ensemble des récepteurs. Cette vésicule retourne alors vers la membrane plasmique pour s'y intégrer (exocytose) et recycler ainsi les récepteurs membranaires (Figure 89).

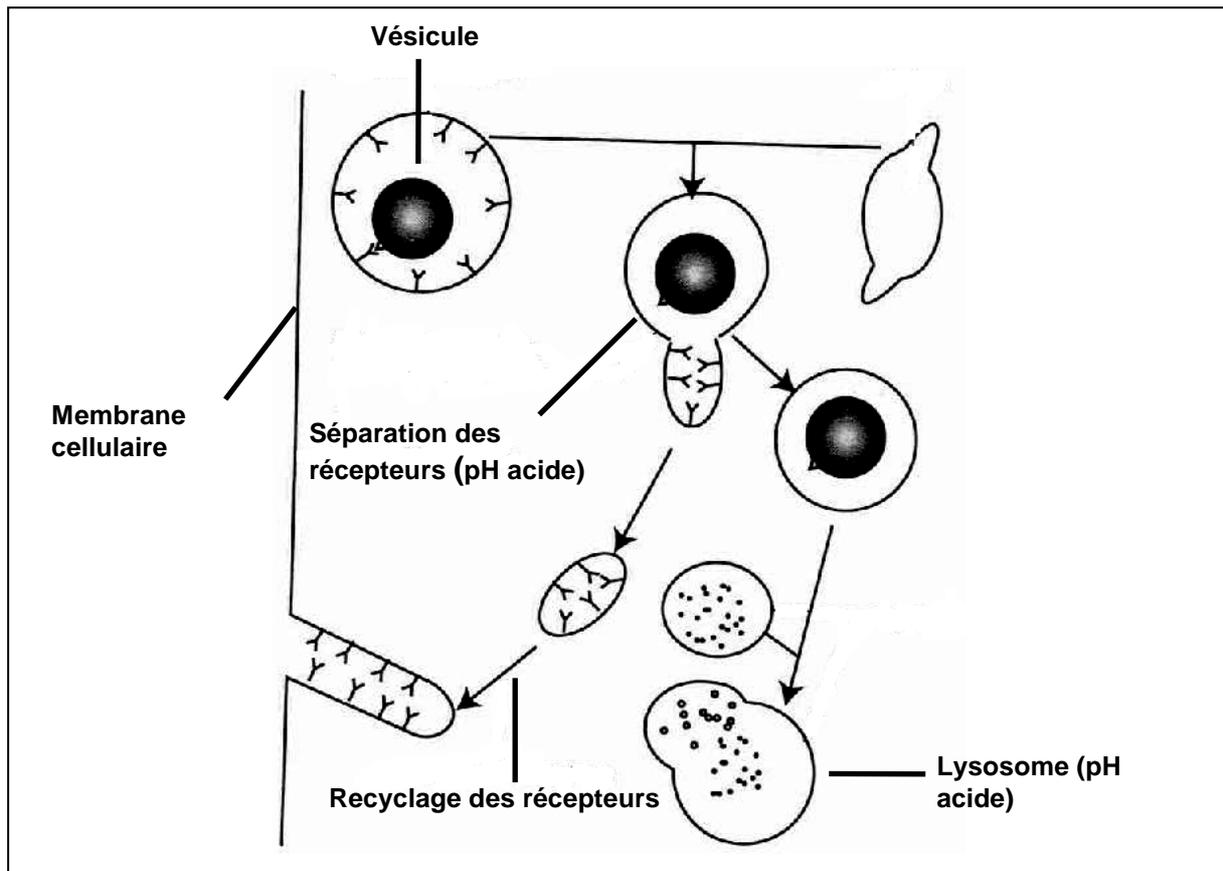


Figure 89 : Évolution d'une vésicule d'endocytose (d'après Darnell, Maillet (1995))

La phagocytose :

Comme nous l'avons évoqué précédemment, la phagocytose est un phénomène qui intervient notamment dans la défense immunitaire. Elle concerne en particulier les cellules du système des phagocytes mononuclées (SPM) telles que les macrophages. Elle intervient dans la destruction de corps étrangers (ex: bactérie, vecteur [Abra et Hunt (1981)]) mais également dans l'élimination de débris cellulaires. Notons que la phagocytose se déroule en plusieurs étapes (Figure 90):

- L'opsonisation (fixation de protéines sur le corps étranger)
- Le chimiotactisme (migration des granulocytes vers le corps étranger)
- Le contact (formation d'excroissances par les granulocytes autour du corps étrange)
- L'adhésivité (formation de complexes récepteur-ligand)

- La phase rhéologique (formation d'une vacuole (phagosome) dans laquelle le corps étranger pourra être éliminé).

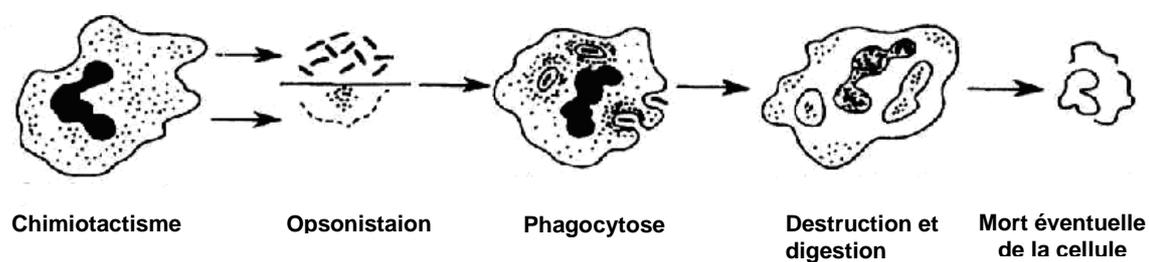


Figure 90 : Mécanisme de phagocytose (d'après Darnell, Maillet (1995))

Partie B : Etude du processus de purification des colloïdes par dialyse

La purification de nano-systèmes colloïdaux développées à des fins biomédicales apparaît comme une problématique en soi. Le procédé de purification se doit en effet d'éliminer les possibles résidus de synthèse qui pourraient contrecarrer les propriétés biologiques ; d'ailleurs la pureté des échantillons à visée biologique/médicale est largement prise en compte dans les aspects réglementaires associés au développement de nouveaux systèmes dans ce domaine d'activité.

Dans ce travail, nous avons abordé la purification des suspensions par le procédé de dialyse. Rappelons que deux catégories de procédés sont en général rencontrées dans le but de purifier des suspensions nanométriques :

Une première approche consiste à séparer dans une étape préliminaire les particules solides de la phase liquide par filtration ou par séchage rapide (lit fluidisé...) suivi d'un lavage de la poudre ou du gel obtenu à l'aide du solvant approprié (par exemple l'eau). Cependant, cette procédure n'est pas directe puisqu'elle nécessite deux sous-étapes, par ailleurs, la phase de filtration peut elle-même s'avérer délicate (passage de particules au travers des pores de filtration, obstruction de membranes...). Enfin, la possibilité de remettre en suspension les particules à la fin du procédé est souvent problématique à cause d'une agglomération irréversible entre des particules adjacentes durant la phase de séparation.

La seconde approche a au contraire pour but de laisser les nanoparticules dans un état humide durant l'ensemble du procédé de purification, afin d'éviter tout effet d'agglomération potentielle pendant la phase de séchage. La centrifugation peut alors être considérée ici pour activer la sédimentation des particules, ce qui permet un échange régulier du surnageant. Cependant, une centrifugation classique montre des limitations pour la sédimentation de systèmes nanométriques, et l'ultracentrifugation ne peut être mise en œuvre que pour la purification de petits volumes de suspension (coût élevé d'utilisation, en temps et en énergie).

En se basant sur ces considérations, nous avons donc étudié ici, d'un point de vue physico-chimique, la possibilité de purifier nos colloïdes hybrides en faisant appel à un procédé de dialyse, en conditions aqueuse. La dialyse représente en effet une autre méthode de purification permettant de rester en milieu humide durant l'ensemble du processus de purification de suspensions nanométriques. Ce procédé est d'ailleurs déjà utilisé en médecine. Contrairement à l'ultrafiltration ou à l'osmose inverse, la dialyse ne nécessite pas

l'application d'un gradient de pression, ce qui représente donc un avantage conséquent et reste une méthode relativement peu coûteuse.

La dialyse est basée sur la diffusion de molécules à travers une membrane perméable, et ce à l'aide d'un gradient de concentration [Pastor et Pauli (1995)] qui est appliqué de part et d'autre de la membrane. Les substances dissoutes (ions n'ayant pas réagi, molécules organiques non adsorbées...) passent alors de la partie de forte concentration (à l'intérieur de la membrane de dialyse, généralement tubulaire) vers la région de faible concentration (à l'extérieur de la membrane).

Dans ce travail, chaque dialyse a été réalisée à l'aide d'une membrane tubulaire de cellulose (longueur : 15 cm, diamètre : 3 cm, seuil de coupure : 6000-8000 Daltons), préalablement placée dans l'eau désionisée pendant 5 min pour une hydratation préliminaire. Les 25 ml de la suspension à dialyser ont été introduits en une seule étape. La membrane a été suspendue verticalement et introduite dans le milieu de dialyse (800 ml d'eau désionisée) sous agitation constante. Ce milieu de dialyse a alors été échangé de façon régulière (jusqu'à 3 jours) afin de régénérer le gradient de concentration et accélérer le processus de purification.

Le principe de base de la purification par dialyse est reporté sur la Figure 1.

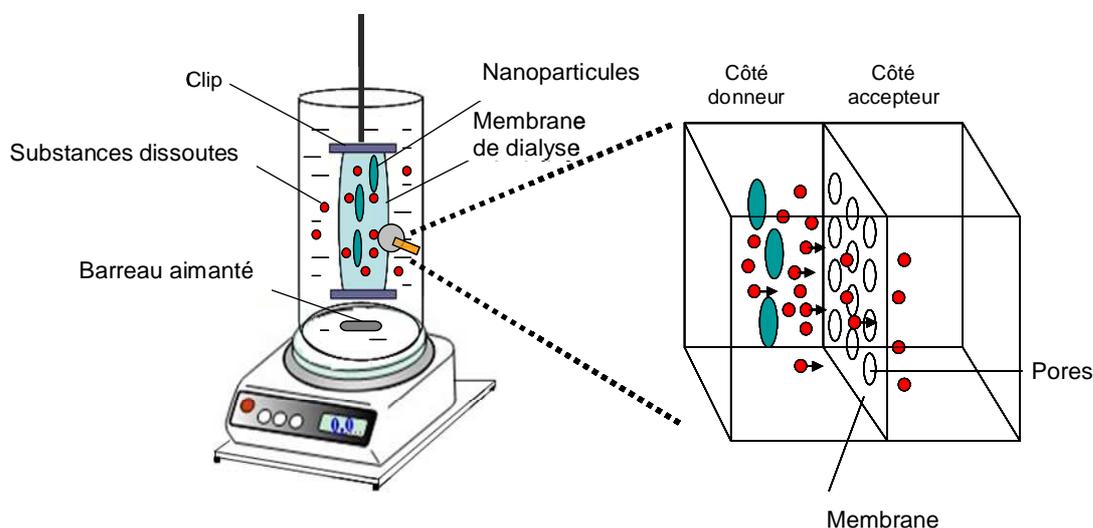


Figure 91 : Schéma de principe du processus de dialyse

Dans un premier temps, la progression de la purification par dialyse a été suivie dans le cas de colloïdes exempts d'euporium, sur un total de 3 jours à température ambiante. Le milieu de dialyse a été changé toutes les 4 heures (excepté la nuit, celle-ci ayant duré 16 heures). L'évolution de la dialyse en fonction du temps a alors été suivie par analyse

spectroscopique FTIR sur suspensions préalablement récupérées et lyophilisées (Figure 92a). Cette technique est en effet une technique de choix pour la détection de divers types d'impuretés (notamment des ions nitrates).

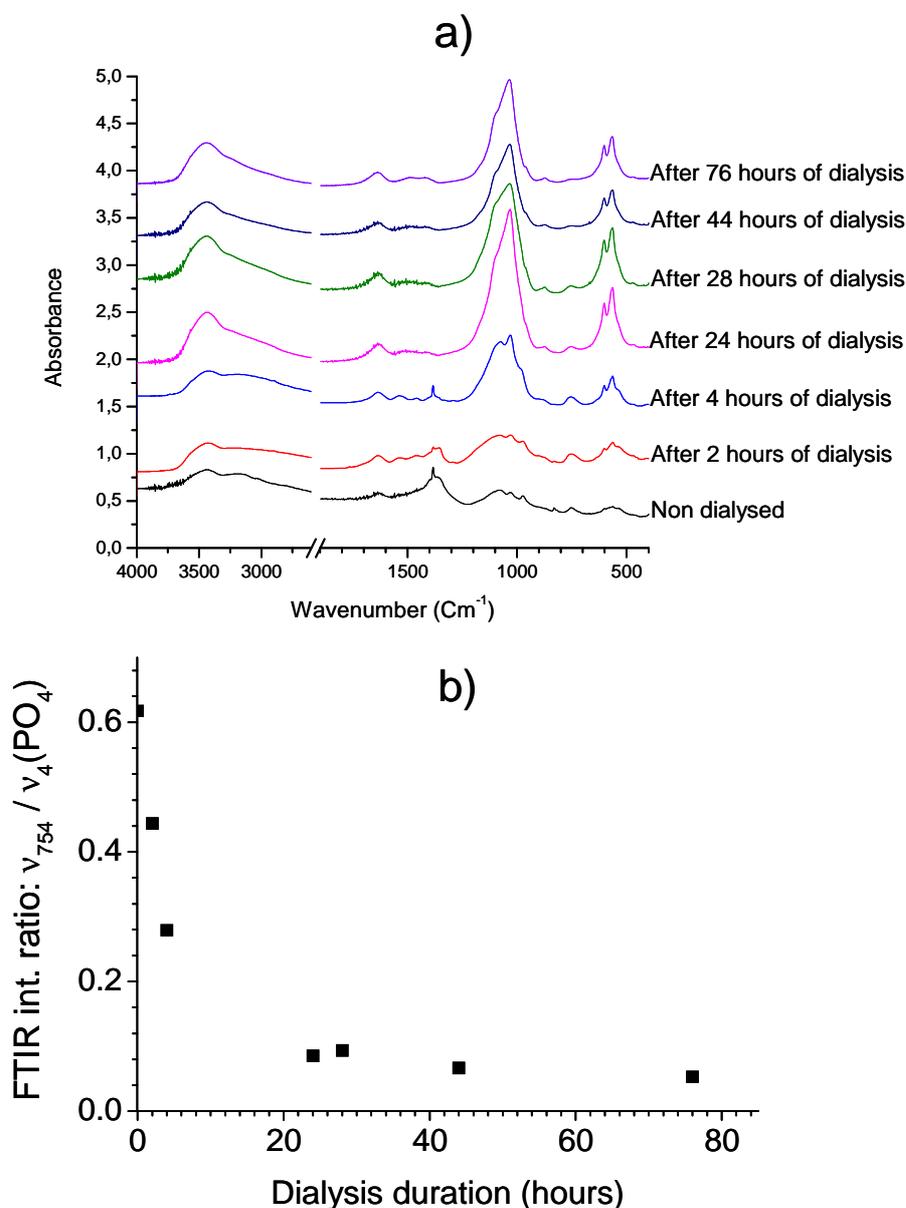


Figure 92 : Evolution a) des spectres FTIR en fonction du temps de dialyse pour une suspension exempte d'euporium, et b) rapport d'intensités $\nu_{754} / \nu_4(\text{PO}_4)$

A $t = 0$, le spectre FTIR indique des bandes d'absorption larges, en particulier à 3176, 1000 et 500 cm^{-1} dues à la présence de grandes quantités de sels initiaux n'ayant pas réagi. Bien que le spectre caractéristique de la phase apatitique ne soit pas aisément identifiable compte-tenu de recouvrements de bandes, les absorptions à 1024 and 601 cm^{-1} sont cependant

caractéristiques des modes de vibration ν_3 et ν_4 des groupements phosphates de l'apatite. Par ailleurs, l'observation d'un pic à 1383 cm^{-1} caractéristique des ions nitrates apparaît comme un paramètre « interne » permettant de suivre l'avancement du procédé de purification, du moins pour les hautes concentrations en nitrates. Enfin, la bande FTIR observée à 754 cm^{-1} , attribuée à la présence de molécules d'AEP, est notée.

Après 2 h de dialyse, le spectre FTIR indique que l'intensité de la bande nitrate a commencé à diminuer, témoignant de la migration de ces espèces chimiques du côté « donneur » de la membrane vers le côté « accepteur » (voir Figure 91). Ceci est également confirmé par la meilleure détection des bandes d'absorption IR des groupes phosphates de l'apatite ainsi que de la bande à 754 cm^{-1} due à la présence d'AEP sur les nanoparticules. Cependant, le spectre FTIR caractéristique de l'apatite ne demeure que partiellement visible à ce stade. Au contraire, après 4 h de dialyse, le spectre FTIR révèle qu'une partie importante des espèces n'ayant pas réagi a été transférée vers le milieu de dialyse, hors de la membrane. Néanmoins, la présence d'ions nitrate est toujours détectée à 1383 cm^{-1} . Les données de spectroscopie FTIR indiquent que le processus de purification du colloïde est achevé après environ 24 h de dialyse (Figure 92a). En effet, à $t = 24\text{ h}$, aucune trace de sels résiduels n'a été détectée par spectroscopie FTIR et toutes les bandes caractéristiques de la phase apatitique (en particulier à $1095, 1024, 875, 601$ and 563 cm^{-1}).

Le suivi de l'intensité de la bande liée à l'AEP à 754 cm^{-1} est un autre moyen d'évaluer l'efficacité de la dialyse. En effet, cela permet de suivre la quantité totale d'AEP dans le système (incluant les molécules d'AEP non greffées de manière stable sur les particules). La Figure 92b montre l'évolution du rapport entre l'intensité de la bande à 754 cm^{-1} et la bande (multiple) présentant un maximum à 565 cm^{-1} (et correspondant à $\nu_4(\text{PO}_4)$ de l'apatite). La courbe obtenue en fonction du temps fait apparaître une diminution importante de la quantité d'AEP dans le système, particulièrement durant les 4 premières heures de dialyse. Au contraire, la teneur en AEP après environ 10 h de dialyse atteint une stabilisation, qui témoigne alors de l'élimination complète des molécules d'AEP n'ayant pas réagi. Les analyses chimiques sur les nanoparticules dialysées à ce stade indiquent un rapport molaire AEP/apatite de 0,81 (avec une phase apatitique présentant un rapport molaire Ca/P proche de 1,40).

Signalons qu'une augmentation progressive de la viscosité de la suspension en cours de dialyse a été observée (en particulier après 5 h). Cependant, la quantification de la viscosité de telles suspensions s'est avérée relativement complexe à cause de leur caractère non « Newtonien », et un comportement pseudo-plastique avec une viscosité apparente dépendant

du taux de cisaillement appliqué. De façon générale, nous avons néanmoins évalué la viscosité apparente initiale des suspensions dans la gamme 1-2 mPa.s pour des taux de cisaillements de 100-1000 s⁻¹, valeur qui augmente de plus d'un ordre de magnitude après dialyse. Une telle variation de la viscosité de la suspension pendant dialyse est vraisemblablement liée à la désorption de certaines molécules d'AEP, permettant alors la formation de quelques ponts inter-particulaires ; ce qui est d'autant plus plausible dans le cas de tels cristaux ioniques où les phénomènes de dissolution-reprécipitation sont souvent observés en surface (une reprécipitation partielle se faisant alors en milieu moins riche en AEP que lors de la synthèse). Bien que les résultats ci-dessus montrent que le processus de dialyse demeure efficace malgré une augmentation de viscosité, il était intéressant d'examiner des moyens de limiter cet effet.

Une manipulation a alors été effectuée dans un milieu eau désionisée enrichie en AEP afin de limiter spécifiquement le départ de quelques molécules d'AEP initialement associées aux nanoparticules solides (ceci ayant pour effet de diminuer spécifiquement le gradient de concentration en AEP de part et d'autre de la membrane). Dans ce cas, le spectre FTIR (après lyophilisation) a indiqué une quantité plus importante d'AEP, confirmant la migration plus lente de ces molécules à travers la membrane dans ces conditions expérimentales. Cependant, nous n'avons pas noté une diminution significative de viscosité dans ce cas.

Une autre cause possible pour la modification des interactions AEP-apatite peut être la diminution du pH subie pendant le procédé de dialyse. Une expérience a donc été menée en milieu alcalin, à pH 9, par ajout de soude dans l'eau de dialyse. Cependant, de nouveau, aucun changement majeur de viscosité finale post-dialyse n'a été observé.

Dans ce contexte, l'augmentation de viscosité semble alors pouvoir être principalement reliée au départ, pendant dialyse, des contre-ions localisés autour de chaque particule, menant alors à l'établissement de nouvelles interactions inter-particules voire eau-particules. Cependant, puisqu'aucune sédimentation n'a été observée pendant le processus de dialyse, remarquons que ces nouvelles interactions entre particules demeurent faibles et ne mènent pas à la déstabilisation du colloïde, ni à un blocage du processus de purification.

Toutes les considérations précédentes ont également été validées pour les suspensions dopées à l'euporium (Figure 93). On peut cependant noter que le processus de dialyse semble se terminer après 28 h de traitement, contre 24 h environ pour les suspensions exemptes d'euporium. Il semble raisonnable d'attribuer les causes de cette différence aux variations intrinsèques des caractéristiques des nanoparticules sans et avec euporium, en particulier en

termes d'états de cristallinité (plus faible pour les particules dopées en raison de l'effet inhibiteur de l'euporium).

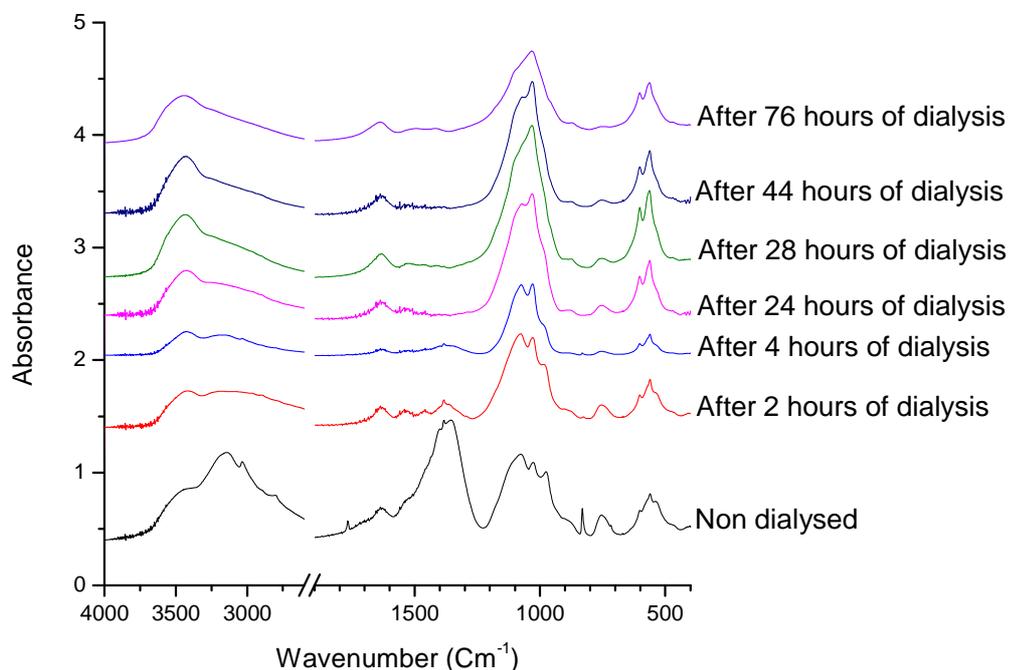


Figure 93 : Evolution des spectres FTIR en fonction du temps de dialyse pour une suspension colloïdale dopée à l'euporium (Sc_{1,5}(2)Eu)

Comme déjà mentionné au Chapitre 2, l'efficacité de la dialyse a également été démontrée sur la base d'analyses par microscopie électronique en transmission (Figure 94a) réalisées sur colloïde dopé à 1,5% initial en Eu (2% expérimental par rapport au calcium), et dialysé pendant 24 h ; ces analyses indiquant en effet que les nanoparticules étaient bien dispersées et présentaient une bonne homogénéité de forme et de taille, sans détection de morphologies « étrangères ». Les analyses de DRX ont par ailleurs confirmé l'absence de phase secondaire cristallisée détectable après complétion de la dialyse (Figure 94b).

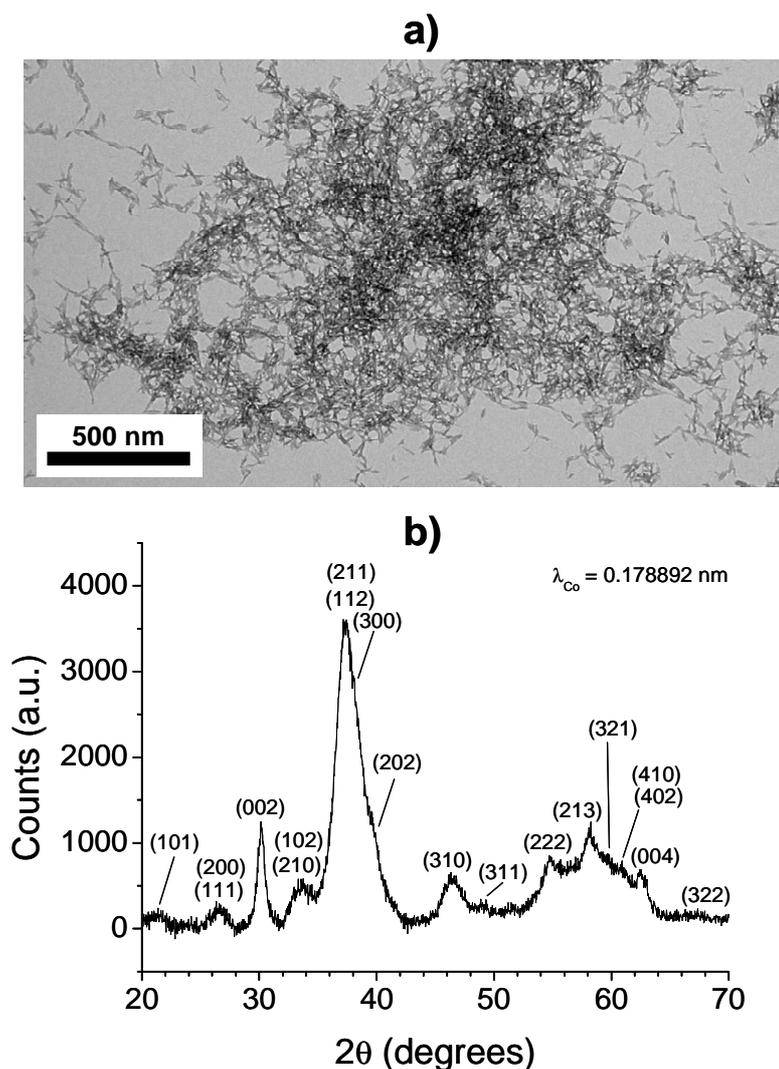


Figure 94 : a) Micrographie TEM pour Sc_{1,5}(₂)Eu dialysée 24 h dans l'eau désionisée et b) diagramme DRX correspondant

L'évolution du pH du milieu de dialyse a aussi été suivie, en fonction du temps (Figure 95). Sur cette figure, la dialyse a été réalisée à température ambiante et sous la forme de 4 étapes successives, et le milieu de dialyse (eau désionisée à un pH initial proche de 6,5) a été changé avant chaque étape pour régénérer des gradients de concentration. Après initiation du processus de dialyse, le pH du dialysat a augmenté en quelques minutes jusqu'à environ 8,5 et est resté stable durant l'étape noté « étape 1 » (premières 4 h de dialyse), témoignant de la diffusion des ions OH⁻ à travers la membrane. Pendant les étapes 2 et 3 (ayant duré 16 h (soit 1 nuit) et 4 h respectivement), le pH est resté globalement constant dans la gamme 7,1-7,25 et a atteint 6,5 durant l'étape 4.

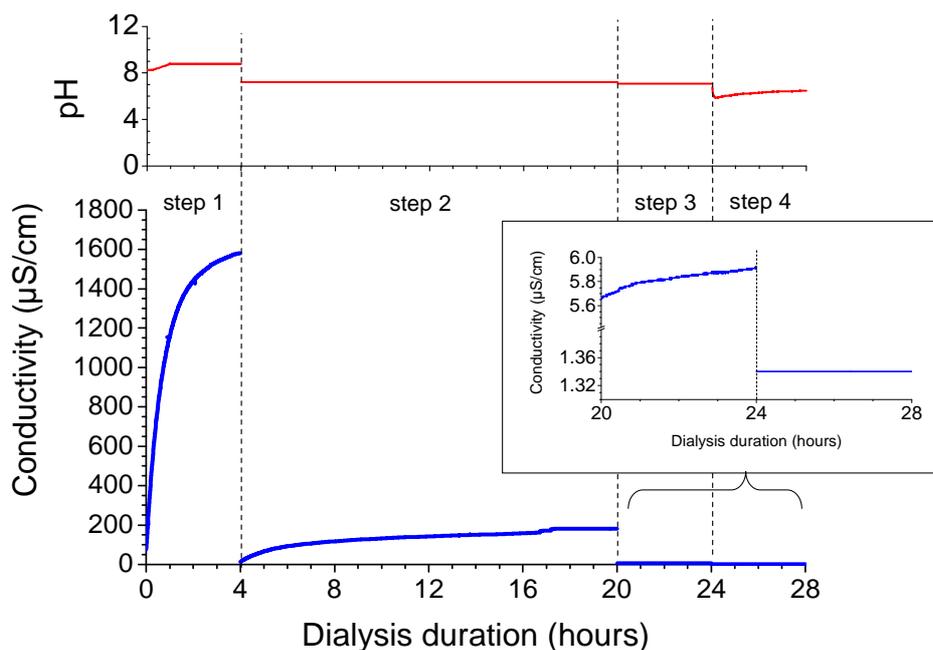


Figure 95 : Evolution de la conductivité et du pH du milieu de dialyse en fonction du temps, pour Sc1,5(2)Eu

Cette variation globale de pH en fonction du temps de dialyse illustre le départ progressif des ions hydroxydes et illustre l'efficacité du processus de dialyse, ce qui est confirmé par la valeur légèrement acide du pH du dialysat en la fin du traitement.

Le processus de dialyse a également été suivi par conductimétrie (Figure 95), en enregistrant la conductivité du milieu de dialyse (hors de la membrane) en fonction du temps. Pendant les premières 4 h de dialyse (étape 1), cette conductivité a rapidement augmenté de $75 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ à $1581 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$. La valeur initiale de $75 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ (obtenue après 5 secondes de dialyse) est supérieure à la valeur typique de l'eau désionisée ($1,3\text{-}1,5 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$) et indique donc que le processus de dialyse débute dès l'introduction de la suspension dans le milieu de dialyse. Ceci peut être expliqué par l'existence de forts gradients de concentration à ce stade. Aux environs de la 4^{ème} heure de dialyse, la conductivité commence à se stabiliser et un changement de milieu peut alors régénérer les gradients de concentration. Au cours de l'étape 2, la valeur de la conductivité augmente de $12,24 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ à $159,6 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$. On peut noter qu'après les premières 4 h de l'étape 2, la conductivité atteint $117 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ à comparer à la valeur $1581 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ atteinte à la fin de l'étape 1. Ce faible niveau de conductivité est alors indicatif des faibles concentrations d'espèces chimiques chargées résiduelles. A la fin de

l'étape 2, la conductivité atteint la faible valeur de $159 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ et se stabilise. Bien que les analyses par spectroscopie FTIR (voir Figure 92 et Figure 93) ont indiqué que le processus de purification continuait même au-delà de 20 h, la conductivité mesurée pendant les étapes 3 et 4 (voir Figure 95) demeure extrêmement faible, témoignant ainsi d'un haut niveau de purification de la suspension. La sensibilité élevée de la technique de spectroscopie IR peut alors être utilisée pour affiner les stades finaux de purification.

Chaque étape de la courbe de conductivité, jusqu'à stabilisation, peut être décrite par une augmentation rapide de la conductivité suivie d'une progressive stabilisation. Cette évolution en fonction du temps ne peut pas se modéliser par une simple loi logarithmique et est mieux décrite graphiquement, en première approximation, comme une équation du type $y = a - b \cdot \exp(-k.t)$. Il est important de grader en mémoire à ce stade que la conductivité d'un électrolyte est directement liée à la concentration de chaque espèce ionique constituant la solution, par le biais d'une combinaison linéaire impliquant la charge ionique et la taille de l'ion. Par conséquent, l'augmentation de la conductivité totale hors de la membrane est directement liée à l'augmentation de la concentration en espèces ioniques passant dans le dialysat.

La modélisation mathématique de la diffusion membranaire a été étudiée dans la littérature [Shieh (1975), Annesini (2000)] en se basant en particulier sur les lois de diffusion de Fick. A une température donnée et dans le cas d'un soluté unique dans une solution de volume V et en contact avec une surface S de la membrane, la concentration en soluté à l'intérieur de la membrane au temps t , notée « $c_{\text{int}}(t)$ », suit l'équation :

$$\ln\left(\frac{c_{\text{int}}(t)}{c_0}\right) = -\frac{S \cdot P}{V} \cdot t$$

soit, de façon équivalente :

$$c_{\text{int}}(t) = c_0 \cdot \exp\left(-\frac{S \cdot P}{V} \cdot t\right)$$

où c_0 est la concentration initiale du soluté dans la solution et P est la perméabilité de la membrane par rapport à ce soluté (P dépendant de la nature et des caractéristiques de la membrane, du soluté et de la température). Prenant en compte la quantité totale de soluté dans le système (le nombre de moles total de soluté étant distribué à l'intérieur et à l'extérieur de la

membrane), la concentration du soluté, notée « $c_{ext}(t)$ » dans le milieu de dialyse de volume V_{ext} est donné par :

$$c_{ext}(t) = c_0 \cdot \frac{V}{V_{ext}} \cdot \left[1 - \exp\left(-\frac{S \cdot P}{V} \cdot t\right) \right] = a \cdot \left[1 - \exp\left(-\frac{S \cdot P}{V} \cdot t\right) \right]$$

où le paramètre « a » dépend alors de la concentration initiale en soluté.

Si plusieurs solutés sont présents dans la solution, la concentration de chaque soluté dans le dialysat va alors théoriquement suivre une équation de cette forme (du moins si les interactions entre ions peuvent être négligées). Puisque la conductivité du dialysat (qui est expérimentalement mesurée ici) est une combinaison linéaire des concentrations des « n » ions présents dans le système, la conductivité globale $C_{sol}(t)$ varie alors comme :

$$C_{sol}(t) = a_0 + \sum_n \lambda_n \cdot a_n \cdot \left[1 - \exp\left(-\frac{S \cdot P_n}{V} \cdot t\right) \right]$$

où « a_0 » est la conductivité initiale du milieu de dialyse, « a_n » et « P_n » sont les paramètres équivalents à « a » et « P » dans l'équation précédente, et « λ_n » est la conductivité molaire de l'ion « n » (qui dépend de sa taille et de sa charge).

Plusieurs types d'ions, minéraux (calcium, europium, phosphate, nitrate, ammonium et hydroxyde) ou organiques (AEP), sont impliqués dans la présente étude. Puisque ces ions diffèrent par leur charge et taille, ils sont susceptibles de mener à des perméabilités membranaires différentes, et il n'a pas été possible ici de séparer les contributions respectives de chaque type d'ion. Cependant, il est intéressant de noter que les profils de conductivité obtenus sont, comme l'on pouvait s'y attendre, en parfait accord avec l'expression mathématique précédente, ce qui peut expliquer une variation globale de conductivité suivant une loi du type « $a - b \cdot \exp(-k \cdot t)$ ».

Les premières 4 h de dialyse ont également été suivies, à température ambiante, dans le cas de suspensions préparées avec un rapport molaire $R = \text{AEP}/(\text{Ca}+\text{Eu})$ décroissant (0,8, 0,6 et 0,4) à comparer au rapport $R = 1$ utilisé dans ce qui précède. Il était en effet intéressant d'examiner comment le profil de conductivité du milieu de dialyse pouvait être impacté par une modification de la teneur en AEP de la suspension. Nos mesures ont montré que la conductivité augmentait de façon relativement monotone avec le rapport R (entre 1079 et

1633 $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ après 4 h de dialyse). Le fait que la courbe de conductivité suive directement la proportion relative en AEP du milieu est une autre preuve que la diffusion des ions moléculaires AEP⁻ à travers la membrane de dialyse débute dès que le processus de dialyse est initié. Par ailleurs, puisqu'un changement dans la teneur initiale en AEP permet de préparer des nano-systèmes de taille contrôlable (pour une adaptation aux finalités biomédicales visées), il est intéressant de signaler que le processus de dialyse décrit ici peut s'appliquer à nos suspensions colloïdales quelle que soit la teneur en AEP initiale.

Le profil de conductivité correspondant aux premières 4 h de dialyse menée à 25°C (étape 1, Figure 95) a été retracé sur la Figure 96 et comparé à la courbe équivalente obtenue à 45°C. L'analyse du profil indique que, de nouveau, une équation pluri-exponentielle peut s'appliquer pour modéliser la courbe de conductivité. Cependant, le niveau stabilisé de la conductivité atteint après 4 h à 45°C (1879 $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$) est notablement supérieur à la valeur correspondante obtenue à 25°C (1581 $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$). De plus, le demi-temps de dialyse « $t_{1/2}$ » (correspondant au temps pour lequel la moitié du niveau stabilisé est atteint) est de 0,21 h à 45°C contre 0,48 h à 25°C. Ces résultats révèlent donc une cinétique de diffusion plus rapide lorsque la température de dialyse augmente.

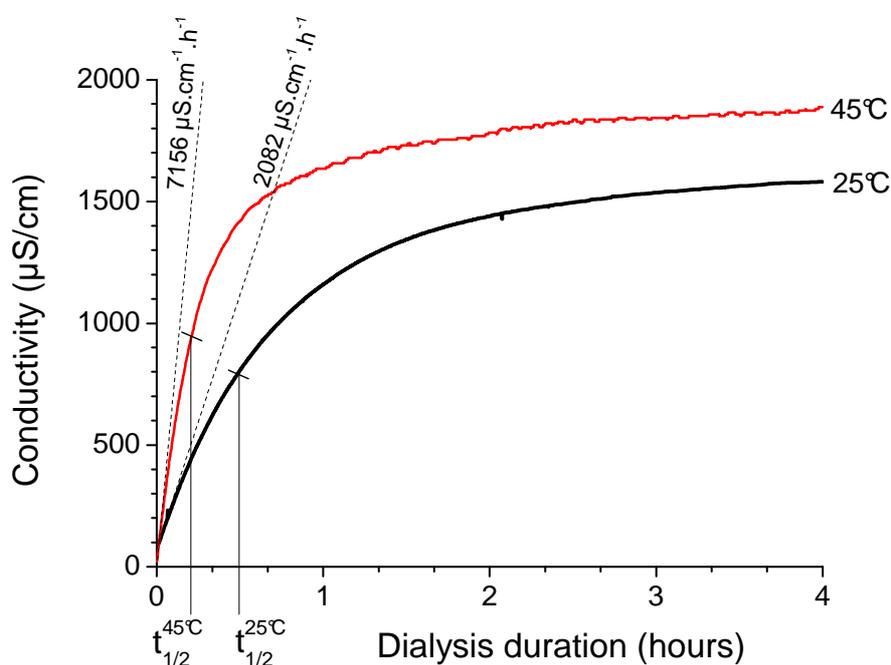


Figure 96 : Effet de la température de dialyse (25 and 45°C) sur la conductivité dans le milieu de dialyse ; Indication des pentes à l'origine et des temps de demi-vie de dialyse

Cet effet peut aussi être visualisé en comparant les pentes à l'origine des courbes de conductivité (matérialisées par les lignes en pointillés sur la Figure 96), soit 2082 et 7156 $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ respectivement pour 25 et 45°C (soit un facteur 3,4 entre les deux valeurs). Cet effet accélérateur lié à la température peut être relié à une augmentation de l'activation thermique des ions diffusant, permettant à ces espèces chimiques de traverser plus rapidement la membrane de dialyse afin d'égaliser leur potentiel chimique de part et d'autre de la membrane (minimisant ainsi les gradients de concentration).

La possibilité d'activer le processus de dialyse en modulant la température apparaît donc comme un moyen de réduire la durée de la phase de purification, ce qui présente un intérêt pour une industrialisation potentielle de ces nano-systèmes.

Une autre voie possible d'activation du processus de dialyse consiste à diminuer la durée de chaque étape, menant ainsi à un changement plus fréquent de milieu de dialyse. Dans une expérience additionnelle, nous avons dialysé une suspension similaire aux précédentes en procédant à un changement de milieu toutes les heures, avec un total de 3 étapes consécutives. Les analyses par spectroscopie FTIR ont cependant mené dans ce cas à un spectre très similaire à celui obtenu pendant 4 h consécutives de dialyse sans interruption. Ces résultats suggèrent donc que la réduction drastique de la durée de chaque étape de dialyse n'est pas une voie spécifiquement avantageuse à retenir pour la purification de nos suspensions.

Nous concluons des résultats présentés dans cette section que le procédé de dialyse, déjà utilisé en sciences pharmaceutiques ou agro-alimentaire, semble particulièrement bien adapté à la purification des colloïdes hybrides développés dans ce travail (qu'ils soient dopées ou non en europium), et qu'un suivi couplé entre spectroscopie infrarouge et conductimétrie semble bien adapté à la détermination de l'efficacité du processus de purification (et ce quelle que soit la quantité d'agent dispersant AEP initialement présent dans le système). De plus, la température de dialyse apparaît comme un paramètre clé, permettant de moduler la durée totale du processus de dialyse, ce qui est potentiellement avantageux en vue d'un passage de l'échelle du laboratoire à une échelle plus large.

Partie C : Ajustement du pH des suspensions colloïdales au pH physiologique

I) Introduction

Cette partie est consacrée à la mise au point d'un protocole visant à ajuster le pH des suspensions colloïdales (préparées au Chapitre 2) à une valeur proche du pH physiologique. En effet comme nous l'avons déjà signalé, la synthèse de nanoparticules hybrides à base d'apatite a été réalisée préférentiellement à un pH alcalin (9,5) afin d'obtenir une suspension colloïdale fluide (voir Chapitre 2). Or un tel pH alcalin ne permet pas une utilisation directe des nano-systèmes développés ici en médecine. Nous avons donc mis au point un protocole de post-traitement des colloïdes dialysés, permettant l'abaissement de ce pH à une valeur proche du pH physiologique (7,4) tout en conservant les propriétés physico-chimiques des suspensions.

II) Protocole d'ajustement du pH des suspensions colloïdales au pH physiologique

L'ajustement du pH des suspensions a été réalisé ici par ajout d'un polyphosphate minéral : l'hexamétaphosphate de sodium (HMP), $\text{Na}_6(\text{PO}_3)_3$.

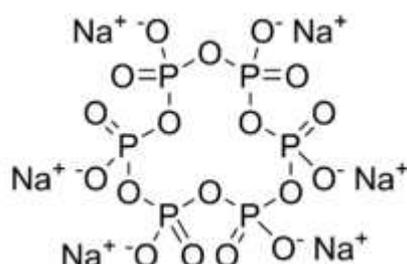


Figure 97 : Formule chimique de l'hexamétaphosphate de sodium (HMP)

En effet celui-ci est très utilisé dans l'industrie alimentaire comme agent régulateur de pH : il stabilise par exemple dans les boîtes de conserve les pigments naturels des légumes et des fruits pour empêcher leur détérioration, et ne présente aucun danger pour les voies

intestinales. Il est par ailleurs utilisé dans la formulation de dentifrices et autres produits parapharmaceutiques. Son mode d'action est généralement lié à la présence de multiples têtes polaires phosphatées permettant un effet de répulsion électrostatique accru. Nous n'avons cependant pas, à ce jour, eu accès à des informations détaillées rendant compte de son interaction avec les fluides biologiques tels que le sang ou la lymphe. Nous avons néanmoins utilisé ce composé comme modèle d'agent dispersant polyfonctionnel.

Remarquons cependant que des tests préliminaires ont indiqué l'impossibilité d'obtenir des suspensions colloïdales en n'utilisant que l'HMP comme « agent stabilisant », en substitution totale de l'AEP, et que ce dernier s'est avéré dans nos manipulations nécessaire pour l'établissement d'une formulation colloïdale fluide et stable.

Cette étape d'ajustement du pH a été réalisée sur des suspensions colloïdales dialysées. Plus précisément, une fois l'étape de dialyse achevée, nous avons rajouté à la suspension colloïdale 3 ml de solution d'HMP à $0,081 \text{ mol.L}^{-1}$. Nous avons en effet pré-déterminé cette valeur de concentration de telle manière à obtenir simultanément un abaissement du pH jusqu'à 7,4 ainsi qu'une re-fluidification des suspensions (dont la viscosité avait augmenté à l'issue du traitement de dialyse comme mentionné dans la section précédente). Après introduction de la solution d'HMP, la suspension a ensuite été traitée par sonification pendant 30 secondes pour l'établissement d'un colloïde (stabilité dans le temps : 3 semaines à température ambiante).

III) Caractérisation physico-chimique de $\text{Sc}_{1,5}(\text{2})\text{Eu}$ traité avec HMP

Les analyses de diffraction de rayons X réalisées sur la suspension $\text{Sc}_{1,5}(\text{2})\text{Eu}(\text{HMP})$ dont le pH a été ajusté à 7,3 avec de l'HMP (Figure 98) mettent de nouveau en évidence une phase apatitique faiblement cristallisée. Par ailleurs, les spectres FTIR ont confirmé, aux côtés de l'apatite, la présence de la bande FTIR à 754 cm^{-1} due aux molécules d'AEP en interaction avec des ions Ca^{2+} de surface, malgré le traitement à l'HMP. Notons cependant l'apparition de bandes supplémentaires, en particulier à 1264 et 895 cm^{-1} , vraisemblablement reliées à la présence d'HMP dans le milieu.

Afin d'étudier plus avant cet aspect, et compte-tenu de la présence de 6 têtes phosphatées pour la molécule d'HMP susceptibles d'interagir fortement avec les cations Ca^{2+} , nous avons préparé un échantillon de référence d'hexamétaphosphate de calcium (obtenu par

mélange d'un nitrate de calcium et d'HMP de sodium). La comparaison des spectres FTIR de ce dernier avec le spectre de la suspension a alors permis d'attribuer les bandes additionnelles à ce composé (voir Figure 99). Par ailleurs, des mesures de potentiel Zêta ont indiqué que les nanoparticules présentaient une surface chargée négativement (-16 ± 4 mV), témoignant vraisemblablement de la présence de molécules d'HMP autour des particules préalablement chargées positivement.

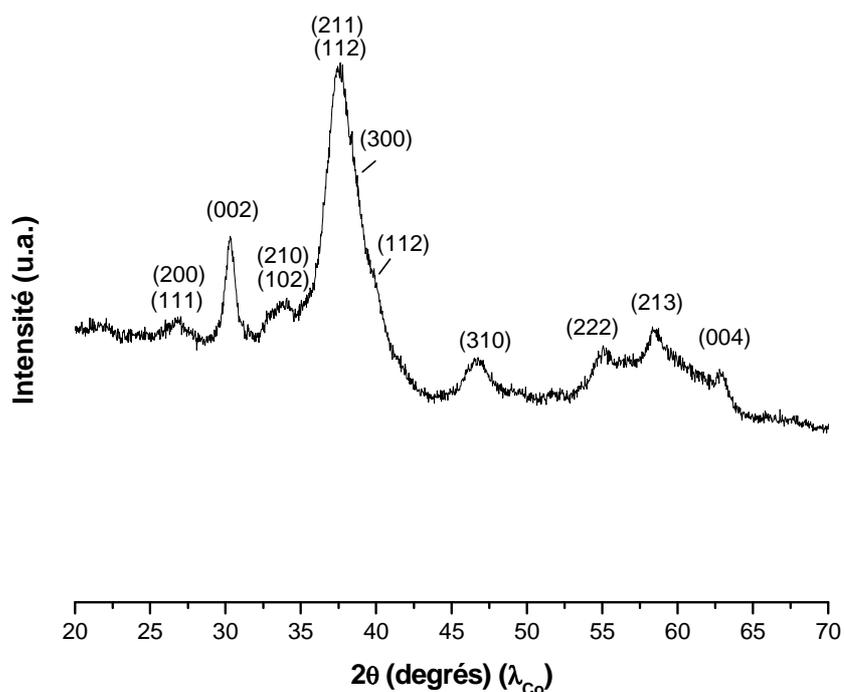


Figure 98 : Diagramme de diffraction des rayons X de Sc_{1,5}(2)Eu(HMP)

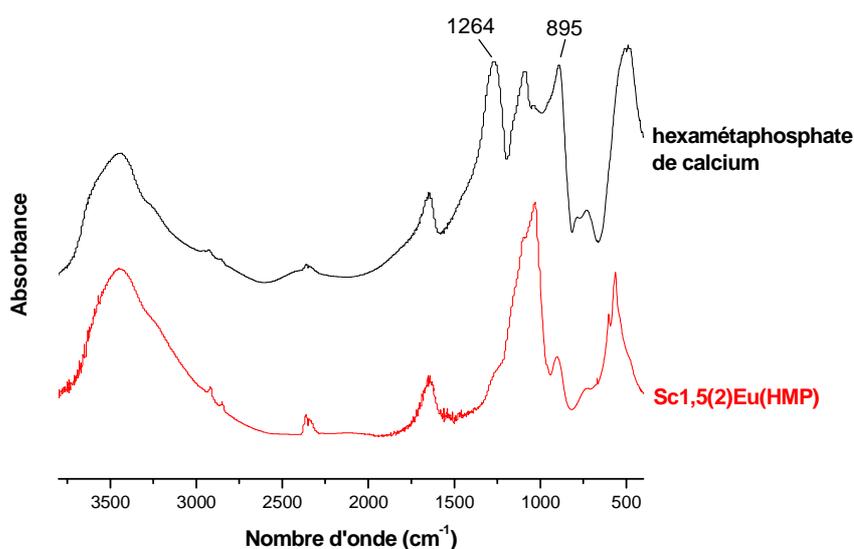


Figure 99 : Spectre FTIR de Sc_{1,5}(2)Eu(HMP) et d'hexamétaphosphate de calcium

Des analyses de microscopie électronique en transmission réalisées directement sur la suspension $\text{Sc}_{1,5}(\text{2})\text{Eu}(\text{HMP})$ traitée avec l'HMP (Figure 100) ont en outre montré que celui-ci n'impliquait aucune modification notable de morphologie ou de taille des nanoparticules. En effet, on retrouve une morphologie ellipsoïdale et une taille moyenne de l'ordre de 30 nm.

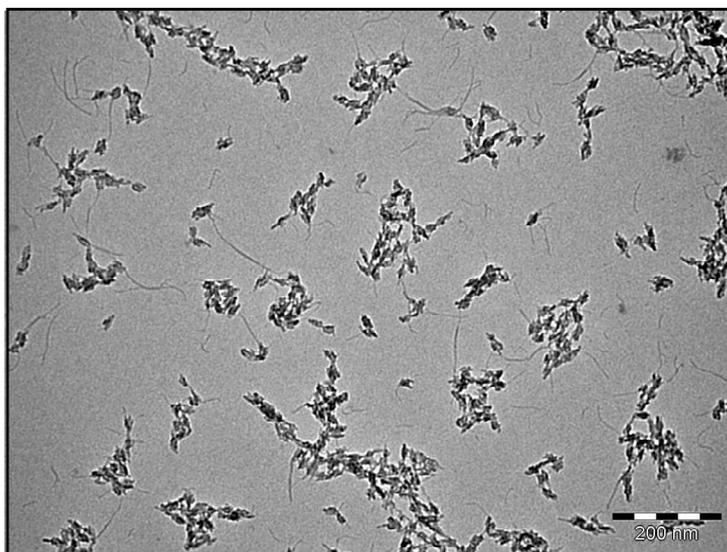


Figure 100 : Cliché de microscopie électronique en transmission de $\text{Sc}_{1,5}(\text{2})\text{Eu}(\text{HMP})$

Par ailleurs cette ordre de grandeur de taille a également été confirmée par diffusion dynamique de la lumière (DLS) où l'on constate que les suspensions ont une distribution granulométrique monomodale centrée sur 35 nm.

Enfin des mesures de spectrofluorimétrie (Figure 102 et Figure 102) ont montré que la suspension $\text{Sc}_{1,5}(\text{2})\text{Eu}(\text{HMP})$ gardait des propriétés de luminescence (émission caractéristique de Eu^{3+} et durée de vie de luminescence de l'ordre de la milliseconde) proches de celles de la suspensions sans HMP. Cependant nous notons une exaltation de la bande d'émission à 611 nm, qui suggère l'existence d'environnements chimiques de certains ions europium légèrement modifiés, possiblement par une interaction importante avec les têtes phosphatées de l'HMP, comme suggéré par les mesures de potentiel Zêta.

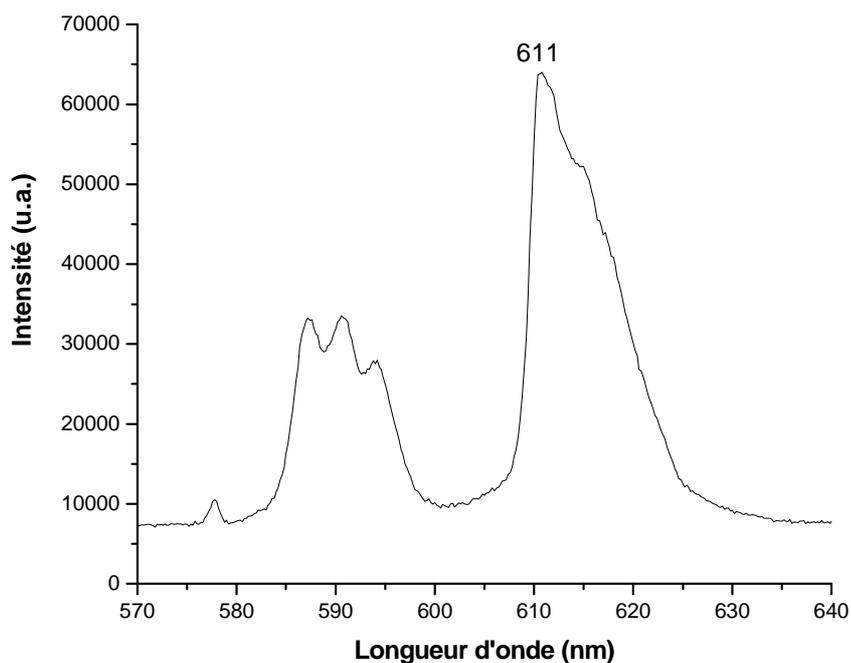


Figure 101 : Spectres d'émission de luminescence obtenus par excitation à 392,8 nm et à température ambiante de Sc_{1,5}(2)Eu(HMP)

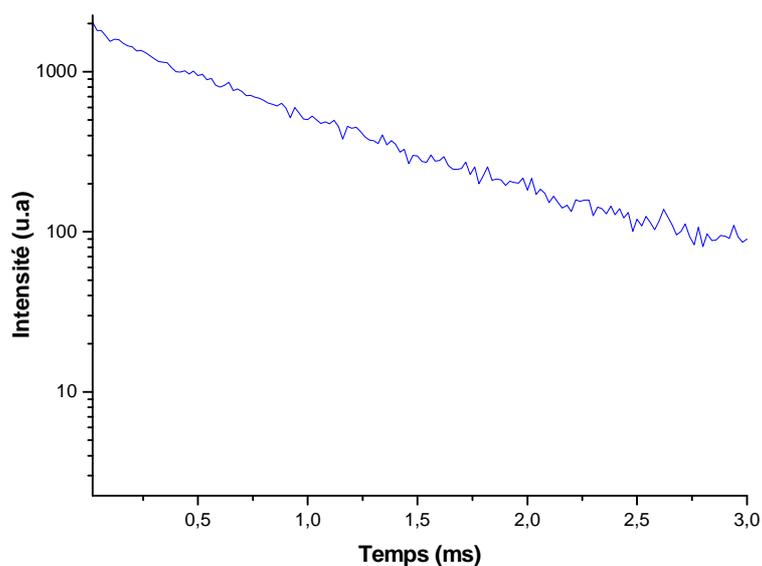


Figure 102 : Profil de déclin de luminescence du niveau émetteur 5D_0 de l'ion Eu^{3+} de Sc_{1,5}(2)Eu(HMP), sous excitation à 392,8 nm et à température ambiante

En conclusion de cette section, nous avons montré la possibilité d'ajuster le pH des suspensions colloïdales (initialement à 9,5) à une valeur proche du pH physiologique (7,3) en vue d'applications bio-médicales ; et ce à partir de l'ajout d'un agent dispersant multifonctionnel modèle : l'hexamétaphosphate de sodium, permettant une re-fluidification du

système malgré un abaissement de pH. Les caractéristiques physico-chimiques des nanoparticules (taille, morphologie, propriétés de luminescence) n'ont en revanche subi aucune modification notable. Signalons de plus que des tests préliminaires en tubes à essai ont indiqué que les suspensions traitées à l'HMP demeuraient stables pendant 1 semaine après contact à pH 7 avec :

- une solution d'albumine (à concentration physiologique de 43 g/l)
- une solution de fluide biologique simulé (SBF)
- ou un mélange des deux solutions précédentes.

Dans ce contexte, l'ensemble des expériences biologiques (tests de cytotoxicité, mise en présence de macrophages, test d'internalisation cellulaire, manipulations de microscopie confocale) a été réalisé sur les suspensions re-fluidifiées par l'HMP.

Partie D : Etude d'une possible remise en suspension après lyophilisation des colloïdes

Nous avons jusqu'à présent considéré la formulation colloïdale de nos nanoparticules à l'état liquide comme « produit final » potentiellement injectable par voie intraveineuse (ou intra-tumorale). Cependant, les contraintes de stabilité dans le temps des suspensions liquides, de stockage, voire de stérilisation, peuvent présenter certains inconvénients. Dans ce cadre, il peut paraître judicieux de procéder à un traitement de lyophilisation des colloïdes, ces dernières pouvant ensuite être remises en suspension à la demande, par exemple par le clinicien en bloc opératoire. Néanmoins, cette étape de remise en suspension est loin d'être triviale car le procédé de lyophilisation/séchage mène très souvent à l'agglomération irréversible des particules initiales. Nous nous sommes donc penchés ici sur la question d'une remise en suspension des colloïdes préparés ici, après dialysés, traitement avec HMP et lyophilisation.

Un premier test réalisé par simple réintroduction de la poudre lyophilisée dans de l'eau désionisée n'a pas permis de détruire les agglomérats formés durant la phase de lyophilisation, menant à une sédimentation rapide. Le même résultat a par ailleurs été obtenu après réintroduction dans une solution d'HMP dissout dans l'eau désionisée. Ces observations tendent à confirmer le caractère irréversible de l'agglomération occasionnée durant l'étape de lyophilisation. Elles suggèrent alors la nécessité d'empêcher ce phénomène d'agrégation par *ajout d'une matrice biocompatible, soluble dans l'eau, et permettant d'éviter le rapprochement de nanoparticules adjacentes durant le séchage*. Nous avons choisi de travailler en présence de glucose (sucre naturellement présent dans l'organisme et largement utilisé dans l'industrie pharmaceutique), introduit après traitement à l'HMP mais avant lyophilisation.

Trois concentrations différentes de glucose ont été testées ici. Dans 13,5 ml de suspension Sc_{1,5}(2)Eu(HMP) (c'est-à-dire 12,5 ml de Sc Sc_{1,5}(2)Eu auxquels a été rajouté 1 ml de solution d'HMP) sont rajoutés 50, 150 ou 250 mg de glucose, respectivement, sous agitation. Une fois la dissolution du glucose complète, la suspension Sc_{1,5}(2)Eu(HMP) a été lyophilisée pendant 3 jours. Par la suite la remise en suspension a consisté à ajouter 12,5 ml d'eau désionisée sur la poudre de Sc_{1,5}(2)Eu(HMP) lyophilisé. Le mélange obtenu a ensuite été traité par sonification pendant environ 10 secondes. Après ce traitement, nous avons constaté que la remise en suspension fluide était partielle lorsque 50 mg de glucose avait été

rajouté, et totale pour 150 et 250 mg de glucose. On retrouve alors la coloration translucide légèrement violacée qui caractérise nos suspensions. Ces observations indiquent qu'une quantité minimale de glucose est nécessaire dans le milieu pour retrouver un colloïde fluide après ajout d'eau désionisée. Pour appuyer nos observations nous avons caractérisé par diffusion dynamique de la lumière (DLS) et par spectroscopie FTIR les deux suspensions traitées avec 50 et 150 mg de glucose. Pour 50 mg, nous avons ainsi constaté que le diamètre hydrodynamique médian des nanoparticules (suivi ici en intensité) était de l'ordre de 315 nm avec une distribution bimodale. Cela va dans le sens des observations macroscopiques qui montrent que l'agglomération n'est pas totalement empêchée. En revanche concernant les suspensions traitées avec 150 mg de glucose, on retrouve un diamètre hydrodynamique habituel de l'ordre de 40 nm et avec une distribution monomodale. Cela tend à montrer que la remise en suspension est totale avec 150 et 250 mg de glucose. Les spectres FTIR réalisés sur les suspensions traitées avec 50, 150 et 250 mg demeurent similaires à ceux de la suspension originale traitée à l'HMP mais n'ayant pas subi de lyophilisation, avec cependant présence de bandes d'absorption attribuables au glucose (Figure 103). Ces analyses tendent à montrer que l'ajout de glucose n'a pas d'effet notable sur la physico-chimie des nanoparticules. Au regard de ces résultats, bien que des analyses complémentaires (diffraction de rayons X, spectrofluorimétrie, analyses chimiques) soient nécessaires pour affiner la caractérisation physico-chimique des colloïdes remis en suspensions, l'ajout de glucose apparaît comme une technique simple offrant la possibilité de conserver les nanoparticules en voie sèche.

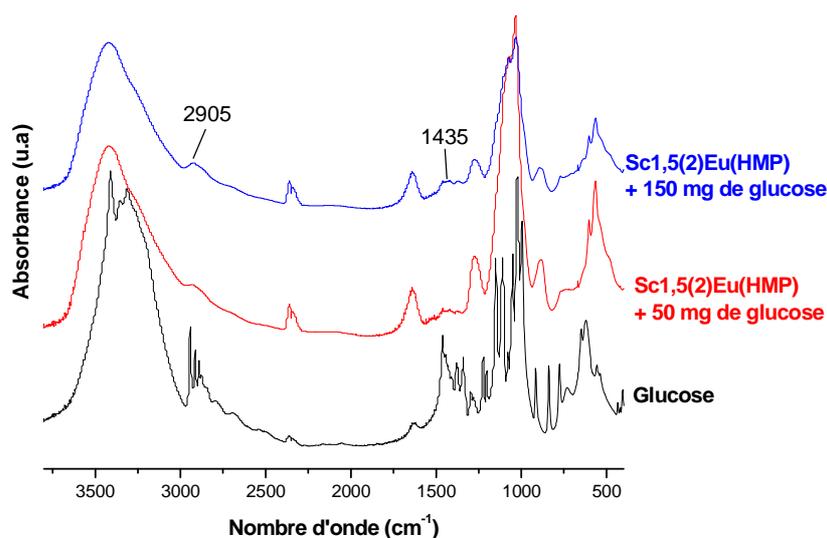


Figure 103 : Spectre FTIR de suspensions colloïdales remises en suspension en présence de glucose (50 ou 150 mg), et spectre de référence du glucose

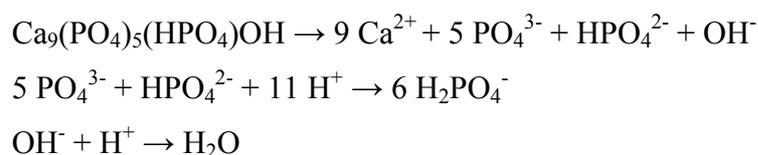
Partie E : Etude de la dissolution de nanoparticules colloïdales à pH acide (pH 5)

Cette étude a pour objectif d'évaluer le comportement de nanoparticules colloïdales préparées dans ce travail lorsqu'elles sont placées dans un milieu acide à un pH voisin de 5, afin de se rapprocher des conditions régnant au sein des lysosomes. En effet comme évoqué plus haut, des nanoparticules internalisées par des cellules vont se retrouver, en fin d'endocytose, dans ces petits organismes qui ont pour rôle de les éliminer, et qui mettent en présence un pH très acide de l'ordre de 5.

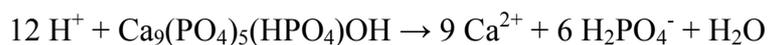
Cette étude a été réalisée sur une suspensions lyophilisée poudres de Sc_{1,5}(2)Eu, et dans un second temps directement sur les suspensions Sc₀Eu(HMP) et Sc_{1,5}(2)Eu(HMP). Dans le cas des poudres, 10 mg de Sc_{1,5}(2)Eu lyophilisée (valeur expérimentale : 10,8 mg) ont été utilisés. Pour cette étude, l'échantillon a été placé dans 150 ml d'une solution d'acide nitrique à pH = 5 contenue dans un creuset en verre à double paroi permettant de maintenir une température constante de 37°C. La solution a été maintenue sous agitation au moyen d'un agitateur magnétique. Le pH a été mesuré grâce à une électrode de verre préalablement étalonnée. Le pH-mètre a été relié à un pH-stat dont la consigne a été fixée à pH 5 : ce pH-stat permet d'assurer le maintien du pH à cette valeur grâce au contrôle de l'ajout (dès une variation de pH de l'ordre de 0,005 unités par rapport à la consigne) d'une solution mère d'acide nitrique (qui présente un pH de 2,96). La courbe enregistrée donne ainsi la quantité d'acide ajouté automatiquement en fonction du temps, permettant ainsi de remonter à la quantité d'échantillon dissous.

Estimation de la quantité de composé dissoute par la solution d'acide nitrique :

La solution qui amène les ions H₃O⁺ (notés H⁺ dans ce qui suit) dans le système, en vue du maintien d'un pH constant de 5, est la solution d'acide nitrique à pH = 2,96 pour laquelle [H⁺] = 10^{-2,96} = 1,096 10⁻³ mol/l (les activités ioniques ont ici été approximées aux concentrations). Si l'on considère en première approximation que les nanoparticules ont une stœchiométrie proche de celles du TCP apatitique, dont la formule chimique est Ca₉(PO₄)₅(HPO₄)OH, et en négligeant la formation de paires d'ions, nous aurons pendant la dissolution les réactions chimiques suivantes :



En effet, les ions phosphates présenteront à pH la forme largement prépondérante H_2PO_4^- . Ceci conduit alors à l'équation bilan :



Ainsi dans ces conditions de pH, 1 ml de solution d'ajout à pH 2,96 peut dissoudre 0,086 mg d'HAP. La Figure 104 reporte le suivi expérimental du volume d'ajout en fonction du temps.

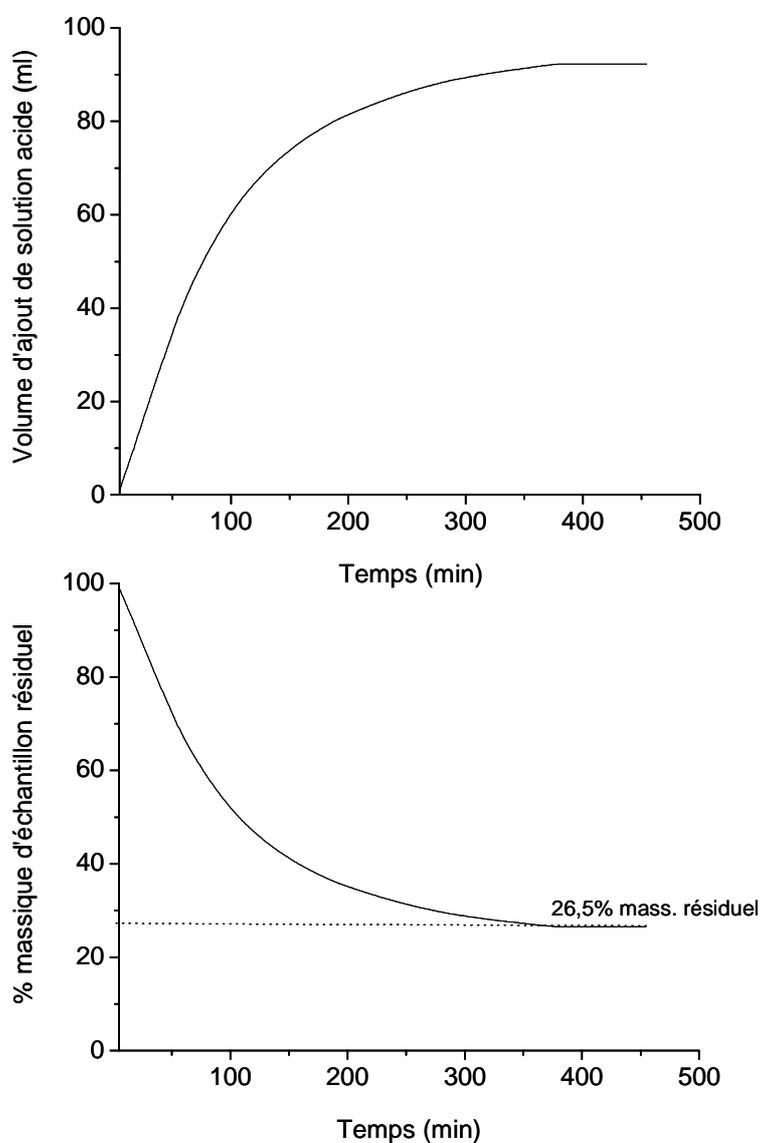


Figure 104 : Evolution du volume d'ajout de solution acide en fonction du temps, et suivi du pourcentage massique résiduel d'échantillon (données pour pH 5)

Dans les conditions citées ci-dessus, la dissolution s'arrête après environ 360 min (6 heures) à pH 5 et 37°C, et cela correspond à une dissolution de 73,5% de l'échantillon (26,5% résiduel, voir Figure 104).

Bien que ces conditions d'analyse soient relativement éloignées des conditions biologiques réelles au sein des lysosomes (conditions dynamiques et non statiques, flux d'ions vers l'extérieur des lysosomes permettant d'atteindre une dissolution totale, etc...), cette étude fournit néanmoins un ordre de grandeur de la cinétique de dissolution de nos nano-systèmes à un pH de 5 et à 37°C. Elle suggère également qu'il existerait une fenêtre temporelle (plusieurs heures ici) pendant laquelle les nanoparticules seraient effectivement « exploitables » au sein de la cellule, pouvant par exemple être exploitées comme nanosondes luminescentes.

Notons en revanche que ces nanoparticules se doivent à terme de disparaître (par le biais de leur dissolution en milieu acide comme discuté ci-dessus) et non de s'accumuler au sein des cellules : la mise en œuvre de pH acide proches de 5 en « système ouvert » (possibilité pour les ions issus de la dissolution de sortir du lysosome) semble alors être adaptés à la disparition progressive de nos nanoparticules. Notons que, dans ces conditions, cela permet également d'envisager la vectorisation intracellulaire d'agents thérapeutiques pouvant être greffés de façon stable sur les nanoparticules pour une application non plus diagnostique mais thérapeutique. En particulier, nous avons signalé précédemment la possibilité de substituer l'acide folique (totalement ou partiellement) par du méthotrexate (MTX), et le développement d'applications à visée thérapeutique apparaît donc comme une perspective possible de ce travail.

Partie F : Etude de la cytotoxicité des nanoparticules colloïdales par test

MTT

Afin d'évaluer la cytotoxicité de colloïdes préparés dans ce travail, nous avons réalisé des tests de type MTT sur cellules souches mésenchymateuses humaines issues du tissu adipeux (AMSC, pouvant à terme être impliquées dans le processus de cancérisation par exemple dans le cas de cancers du sein) et sur des cellules du cancer du sein de type ZR-75-1 ; ces tests ayant pour but d'évaluer la viabilité cellulaire après mise en contact des nanoparticules avec les cellules, et ce 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 (3-[4,5-diméthylthiazol-2yl]-2,5-diphényltétrazolium bromide) précipite pour donner des cristaux de coloration rouge de « formazan ». La quantité de formazan produite par les cellules à partir du réactif MTT est alors mesurée par spectrophotométrie (à 570 nm). 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.

Lorsque les cellules sont mises en présence des nanoparticules, 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'elle prolifère 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.

Dans notre étude nous avons réalisé ce test avec les suspensions colloïdales Sc1,5(2)Eu et Sc1,5(2)Eu(5FA), dialysées puis ajustées à pH physiologique avec HMP. Avant mise en contact avec les cellules, les suspensions ont été stérilisées par traitement en autoclave (1 heure à 120°C). A l'issue de l'étape de stérilisation, une partie des suspensions a été lyophilisée et caractérisée par spectroscopie FTIR afin de vérifier que ce traitement ne dégradait pas les nanoparticules : nous n'avons en effet pas détecté de modification spectrales

après lyophilisation, témoignant du fait que le traitement de stérilisation n'affectait pas les nanoparticules colloïdales d'apatite.

Avant de présenter les résultats, nous allons rappeler le protocole d'incubation de Sc2Eu et Sc2Eu5Fa dans le milieu de culture.

I) Protocole d'incubation des suspensions colloïdales dans le milieu de culture :

Pour ces tests MTT, les cellules ont été cultivées dans une atmosphère humidifiée avec 5% de CO₂ à 37°C dans du Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplémenté avec 10% de serum bovin fœtal et 1% d'antibiotiques (pénicilline / streptomycine).

Dans un premier temps les cellules ont été placées dans une plaque de 96 puits à hauteur de 30 000 cellules par puits (en triplicate). Après 24 h d'incubation, le milieu de culture a été remplacé par du DMEM (exempt de rouge phénol) et les tests MTT ont été initiés.

La toxicité des nanoparticules colloïdales a été évaluée à différentes concentrations en nanoparticules dans le milieu : 0, 0,1 ; 1 ; 2 ; 5 et 10 mg/ml et à différents temps, J1, J2, J3, J5 et J7 (J pour jour). Après chaque temps, 50µl de MTT (5mg/ml) ont été ajoutés dans chaque puits puis incubés pendant 4h à 37°C pour permettre la formation des cristaux de formazan. Ensuite le milieu de culture a été aspiré puis remplacé par une solution de solubilisation (H₂O, 66% DMF, 20% SDS, 5 % triton X100, pH 7) incubée toute la nuit. L'absorbance a ensuite été mesurée (à 570 nm) par spectrophotométrie. Les résultats sont présentés ci-après.

II) Résultats expérimentaux

Les tests MTT réalisés sur les cellules souches mésenchymateuses humaines avec une suspension colloïdale Sc1,5(2)HMP montrent que la viabilité cellulaire est de l'ordre de 100% quelle que soit la durée d'incubation pour une concentration comprise entre 0 et 1 mg/ml (Figure 105). Ce résultat nous permet ainsi de fixer la limite de cytotoxicité à 1 mg/ml pour laquelle les tests biologiques sont envisageables. En effet au-delà de 1mg/ml on observe une diminution prononcée de la viabilité cellulaire.

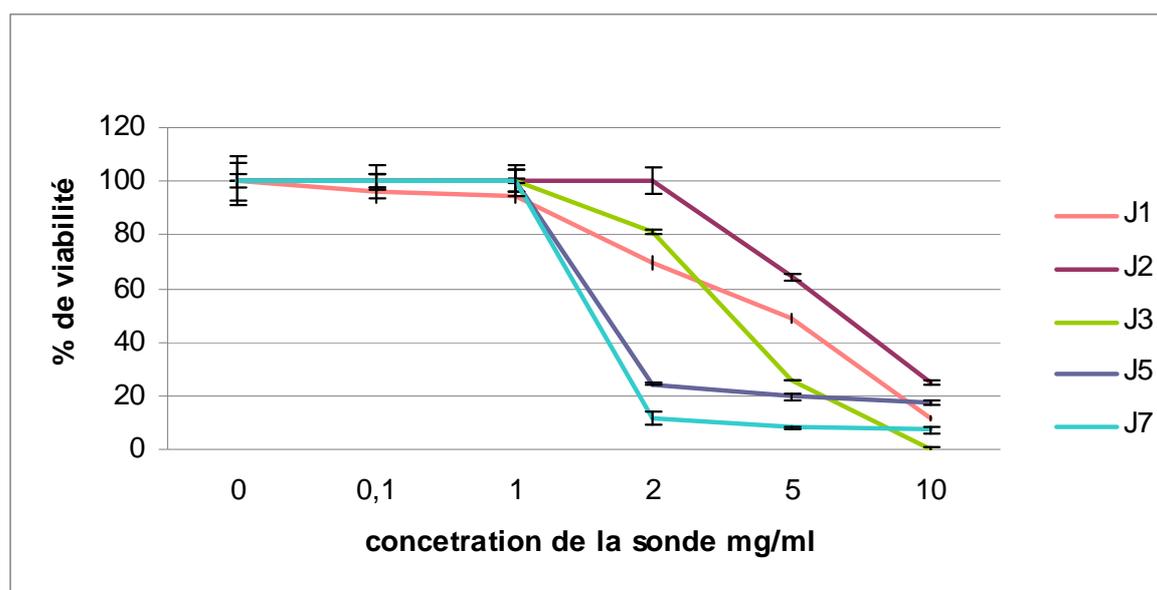


Figure 105 : Résultats des tests MTT pour Sc1,5(2)Eu (cellules souches mésenchymateuses humaines)

Lorsque les cellules souches sont incubées avec une suspension colloïdale synthétisée en présence d'acide folique, Sc1,5(2)HMP(5FA), on constate que la viabilité cellulaire reste globalement identique. En effet, on observe (Figure 106) une viabilité cellulaire proche de 100% quel que soit le temps d'incubation entre 1 et 7 jours et pour des concentrations toujours comprises entre 0 et 1 mg/ml. Ces premiers résultats tendent ainsi à montrer que FA n'a pas d'effet détectable sur la limite de cytotoxicité des suspensions colloïdales mises en présence de cellules souches mésenchymateuses (issues du tissu adipeux).

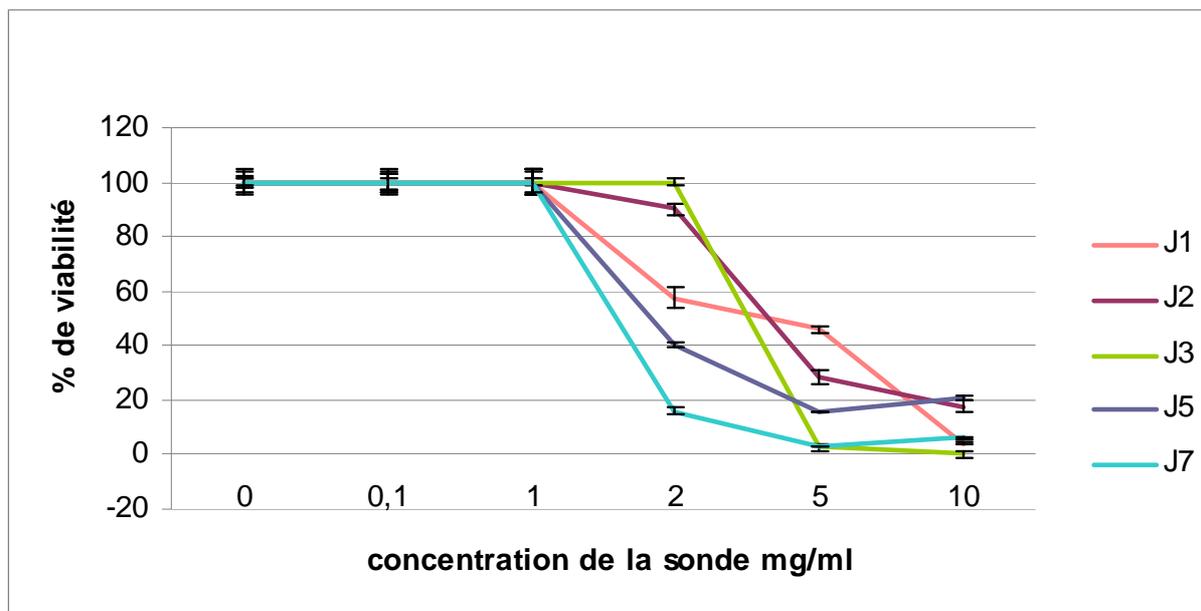


Figure 106 : Résultats des tests MTT pour Sc_{1,5(2)}Eu(5FA) (cellules souches mésenchymateuses humaines)

La Figure 107 reporte les résultats pour la suspension Sc_{1,5(2)}Eu (exempte d'acide folique) mise en contact avec des cellules du cancer du sein de type ZR-75-1. On constate ici que la viabilité cellulaire est très proche de 100% pour des concentrations comprises entre 0 et 2 mg/ml et ce quelle que soit la durée d'incubation. On observe également qu'au-delà de 2 mg/ml la viabilité entame sa décroissance dès le premier jour d'incubation. Ceci tend à montrer qu'on dispose pour cette suspension colloïdale exempte d'acide folique d'une concentration maximale proche de 2 mg/ml pour laquelle la viabilité cellulaire est très acceptable et l'on n'observe pas de toxicité significative.

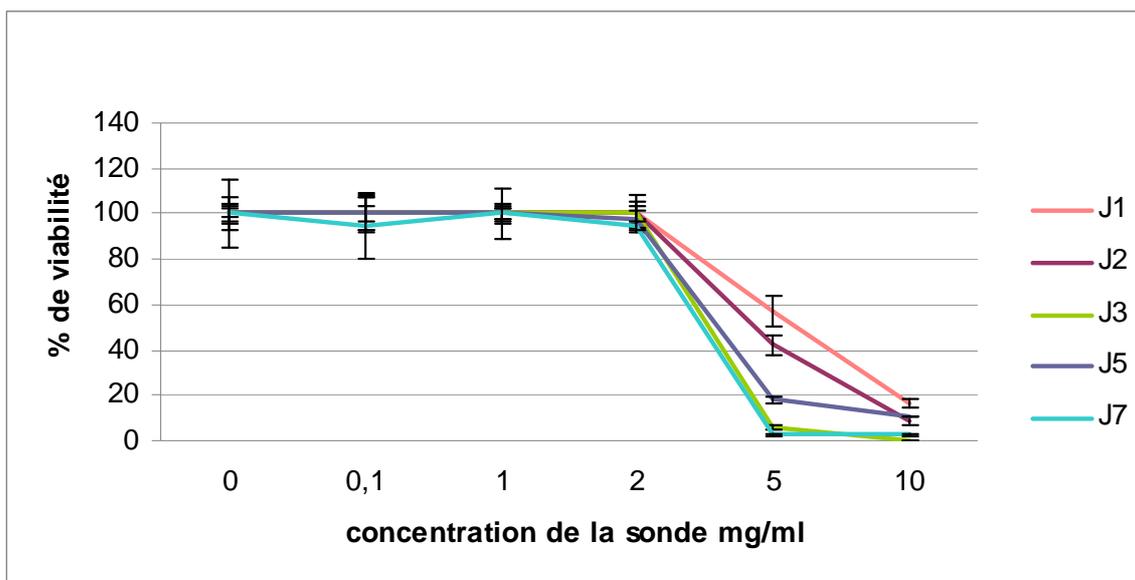


Figure 107 : Résultats des tests MTT pour Sc1,5(2)Eu (cellules du cancer du sein de type ZR-75-1)

Les résultats obtenus pour la suspension Sc1,5(2)Eu(5FA) enrichie en acide folique sont par ailleurs reportés sur la Figure 108. Dans ce cas, on constate que la viabilité cellulaire est de 90 à 100% pour des concentrations comprises entre 0 et 1 mg/ml. On observe par ailleurs que la viabilité cellulaire diminue globalement à partir de cette valeur. Pour 2 mg/ml, la viabilité mesurée reste néanmoins située entre 70 et 90% pour un temps de contact entre 1 et 7 jours. La mortalité cellulaire devient importante pour des concentrations comprises entre 5 et 10 mg/ml et ce dès les premiers jours. On peut conclure que, là encore, nous disposons d'un domaine de concentration entre 0 et 2 mg/ml (au moins jusqu'à 5 jours) dans lequel la viabilité cellulaire reste tout à fait acceptable.

Pour conclure cette étude il faut noter qu'il n'existe pas de norme standardisée permettant de comparer ces viabilités avec d'autres études. Ainsi chaque système aura son potentiel de toxicité propre qu'il convient de prendre en compte en fonction des applications visées. Dans notre cas, ces résultats suggèrent que le seuil de cytotoxicité est légèrement décalé vers les plus faibles concentrations et l'on peut s'interroger sur l'origine de cet effet lié à la présence d'acide folique. Une hypothèse pouvant être avancée pourrait être liée au fait que FA puisse faciliter l'incorporation des nanoparticules dans les cellules par voie d'endocytose, menant alors à une concentration intracellulaire en nanoparticules plus importante que pour la suspension sans acide folique, à concentration constante dans le milieu

de culture. L'investigation de ce point devra faire l'objet de manipulations additionnelles visant à déterminer l'effet de la présence de FA sur le taux d'endocytose.

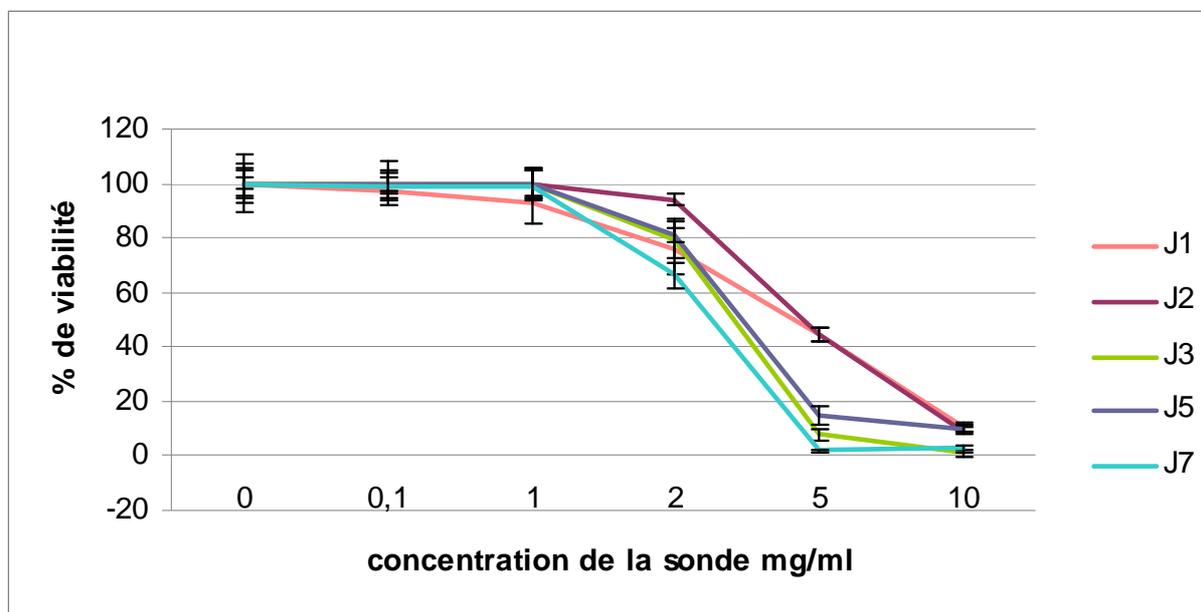


Figure 108 : Résultats des tests MTT pour Sc_{1,5}(2)Eu(5FA) (cellules du cancer du sein de type ZR-75-1)

Partie G : Etude de l'interaction entre nanoparticules colloïdales et macrophages humains

Comme évoqué plus haut, les macrophages ont la propriété de phagocyter les corps étrangers et les cellules mortes ou lysées. De plus lorsqu'il y a réaction inflammatoire ils produisent des radicaux libres oxygénés (RLO), essentiellement grâce à une enzyme, la NADPH oxydase. En général, la phagocytose induit l'apparition de RLO. La mesure de la production de RLO par les macrophages est donc une méthode intéressante pour évaluer l'interaction entre nanoparticules et macrophages, et évaluer ainsi le potentiel pro-inflammatoire des particules.

Cette étude a été menée en collaboration avec l'équipe du Prof. B. Pipy du laboratoire des Macrophages de l'inflammation et interaction du métabolisme.

Le protocole de mesure de la production RLO a consisté ici à mettre en présence une suspension Sc(1,5)2Eu(HMP) avec des monocytes humains, c'est-à-dire la forme immature des macrophages. En effet c'est pendant la mise en contact des monocytes avec les nanoparticules qu'ils finissent leur développement en macrophages. Les mesures de RLO se sont déroulées de la manière suivante : dans un premier temps les monocytes sont adhérents dans des puits sur plaque après avoir placés en incubation. Dans un deuxième temps les nanoparticules colloïdales de Sc1,5(2)Eu(HMP) sont mises en culture avec les monocytes pour un temps d'incubation déterminé. Une fois le temps d'incubation terminé, dans un troisième temps du luminol (5-amino-2,3dihydro-1,4-phthal-azinedione) est ajouté dans le milieu de culture. En effet les radicaux libres oxygénés (RLO), encore appelés ions superoxydes ne peuvent pas être mesurés « directement » : en réagissant sous sa forme réduite avec les ions superoxydes, le luminol va produire des photons qui seront détectés à l'aide d'un luminomètre. Ainsi, à une quantité d'ions superoxydes produite correspond une quantité de photons émis.

Les premières mesures de RLO réalisées après un temps d'incubation d'1 heure des nanoparticules de Sc(1,5)2Eu(HMP) en contact avec les monocytes ont montré (Figure 109) qu'il n'avait pas de production de RLO pour les différentes concentrations testées (1,2 ; 12 ; 60 ; et 120 µg/ml), en comparaison avec l'expérience contrôle réalisée dans les mêmes conditions mais sans nanoparticules. Autrement dit après une mise en contact de 60 min la suspension Sc1,5(2)Eu(HMP) n'a pas induit de réaction inflammatoire.

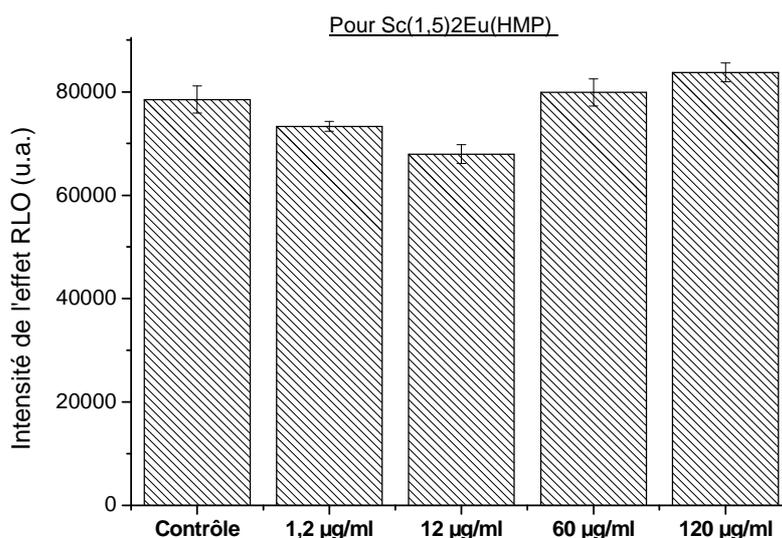


Figure 109 : Intensité de l'effet RLO en fonction de la concentration en nanoparticules de Sc(1,5)2Eu(HMP) dans le milieu, et pour le contrôle (réalisé en absence de nanoparticules). Manipulations réalisées avec un temps de mise en contact de 1 heure

Ces observations sont également valables pour l'HMP seul que nous avons également évalué (Figure 110). Cette information nous renseigne ainsi précieusement sur l'interaction de l'HMP avec le milieu biologique et conforte son utilisation à ce stade. D'ailleurs, notons même qu'une diminution de la production de RLO est observée pour des concentrations croissantes en HMP (voir Figure 110) mettant en évidence un effet inhibiteur d'inflammation.

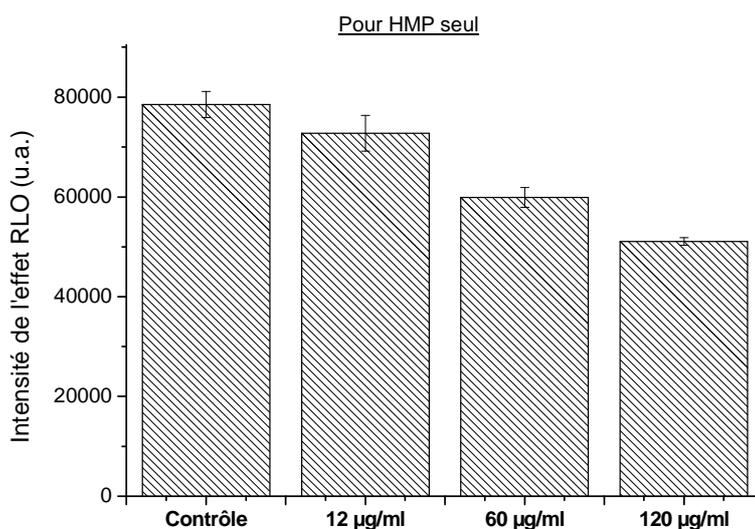


Figure 110 : Intensité de l'effet RLO en fonction de la concentration en HMP seul dans le milieu, et pour le contrôle (réalisé en absence d'HMP). Manipulations réalisées avec un temps de mise en contact de 1 heure

A la suite des ces premières mesures de « l'effet propre » (potentiel pro-inflammatoire intrinsèque) de Sc1,5(2)Eu(HMP) sur les monocytes, nous avons étudié cet effet à un temps plus long de mise en contact (24 h) et à la concentration la plus élevée (120 µg/ml). Nous avons constaté dans ces conditions une augmentation de la production de radicaux libres oxygénés, pratiquement doublée. Il sera cependant nécessaire, dans des manipulations additionnelles, de comparer les valeurs absolues de production de RLO observées ici avec des composés « standards » connus pour leur effet inflammatoire afin d'évaluer dans quelle mesure la production RLO que nous obtenons est significative. Les premières comparaisons tendent à indiquer que l'effet inflammatoire propre noté ici reste faible. Par ailleurs, l'effet de la concentration en nanoparticules devra aussi être étudié de manière plus détaillée.

A la suite de ces mesures de « l'effet propre » d'autres mesures de RLO ont été réalisées mais cette fois-ci en rajoutant des agents stimulants qui ont pour rôle *d'induire* une production RLO en agissant sur des récepteurs spécifiques qui sont présents soit à l'intérieur du monocyte mûri en macrophage (c'est le cas du TPA, 13-acétate de 12-o-tétradécanoyl-phorbol) soit à sa surface (c'est le cas du zymosan opsonisé (ZO) et du zymosan non opsonisé (ZNO)). L'ajout de ces agents stimulants a lieu après que les monocytes aient été mis en présence avec les nanoparticules pendant un temps défini pour l'expérience.

Nous avons réalisé ces mesures sur deux lots de monocytes différents (provenant de deux sujets humains). Dans les deux cas ils s'agissait de la suspension Sc1,5(2)Eu(HMP) incubée (à 120 µg/ml) avec des monocytes pendant 24 heures. Après ce temps de contact, les agents stimulants ont été rajoutés ainsi que de le luminol pour permettre les mesures de RLO. Les résultats de RLO ont montré que pour le premier lot de monocytes, les nanoparticules colloïdales avaient un effet activateur de la production RLO avec une production doublée. Cela nous amène encore une fois à nous interroger sur la significativité ou non de cette augmentation par rapport à des composés reconnus pour produire une réaction notablement inflammatoire.

En réalisant les mêmes types de mesures mais avec un lot de monocytes différent, c'est-à-dire provenant d'un patient humain différent, nous avons au contraire observé l'effet inverse : dans ce cas, les nanoparticules ont en effet induit un effet inhibiteur de production RLO. De tels effets a priori contradictoires car variables d'un patient à un autre ne sont cependant pas rares dans le domaine de l'immunologie. Ces résultats signifient cependant que ces suspensions colloïdales pourront induire une réponse inflammatoire (dont « l'intensité » devra néanmoins être évaluée de manière plus précise) chez certains patients. Par ailleurs

l'effet inhibiteur de production de RLO observé pour le deuxième lot de monocytes met probablement en lumière le fait que les nanoparticules peuvent interagir au niveau des récepteurs des agents stimulants qui voient leur action « court-circuitée ».

En conclusion de cette étude préliminaire de l'interaction nanoparticules-macrophages, nous avons observé que les nanoparticules colloïdales préparées dans ce travail n'induisaient pas de réaction inflammatoire pour un temps d'incubation de 1 heure quelle que soit la concentration testée (1,2 ; 12 ; 60 ; et 120 $\mu\text{g/ml}$). En revanche pour un temps d'incubation plus long de 24 heures (testé uniquement pour 120 $\mu\text{g/ml}$) nous constatons que la production de RLO est doublée. Néanmoins cette augmentation devra être évalué en la comparant par exemple avec des composés présentant une réponse une inflammatoire connue. Les mesures de RLO (pour un temps d'incubation de 24 heures) réalisés après ajout d'agents stimulants ont par ailleurs montré que la réponse inflammatoire était dépendante des patients.

Partie H : Etude de l'internalisation des nanoparticules colloïdales luminescentes par des cellules cancéreuses

Cette étude visait à mettre en présence une quantité connue de nanoparticules colloïdales relatives à la suspension Sc1,5(2)Eu avec des cellules cancéreuses. Les cellules sur lesquelles ont été réalisées ces expériences sont des cellules de cancer du sein de type ZR-75-1. Une concentration de nanoparticules dans les puits de culture de 1,5 mg/ml a été utilisée ici.

Le protocole a impliqué plusieurs étapes consécutives et a été réalisé par la société ICELLTIS (Verniolle, France) :

- préparation des cellules : étape d'adhésion sur puits de culture (24 h à 37°C),
- mise en contact entre le colloïde et les cellules en culture pendant 20 h à 37 °C,
- élimination du surnageant et lavage des cellules avec un tampon (PBS),
- décollage et comptage des cellules (environ 800 000 - 1 000 000),
- centrifugation et récupération du culot,
- remise en suspension du culot dans HCl concentré (37%) et incubation pendant 30 minutes à -80°C (afin de détruire les cellules et obtenir une solution dont les teneurs en Ca et Eu seront mesurées par ICP-AES).

Un contrôle a également été effectué, correspondant au même traitement que précédemment mais sans nanoparticules. Les manipulations ont été réalisées en triple. Le Tableau 25 reporte les valeurs expérimentales obtenues pour les teneurs en Ca et Eu.

Solution (volume : 3 ml)	Ca (mg/l)	Incertitude* sur Ca (mg/l)	Eu (mg/l)	Incertitude* sur Eu (mg/l)
Contrôle test 1	0,680	0,001	0,000	0,000
Contrôle test 2	0,644	0,001	0,000	0,000
Contrôle test 3	0,724	0,001	0,000	0,000
Sonde test 1	1,319	0,001	0,058	0,003
Sonde test 2	1,553	0,001	0,076	0,004
Sonde test 3	1,576	0,001	0,075	0,004

*incertitude de mesure ICP-AES

Tableau 25 : Détermination (ICP-AES) des teneurs en Ca et Eu après mise en contact avec les cellules ZR-75-1

Ces résultats indiquent que, pour les deux séries de manipulations, les teneurs en Ca et Eu mesurées après destruction des cellules sont significativement accrues (la teneur initiale en Eu étant nulle) lorsque les cellules ont été mises en contact avec les nanoparticules. Ceci se retrouve graphiquement, ramené en masse de Ca et Eu incorporés, sur la Figure 111.

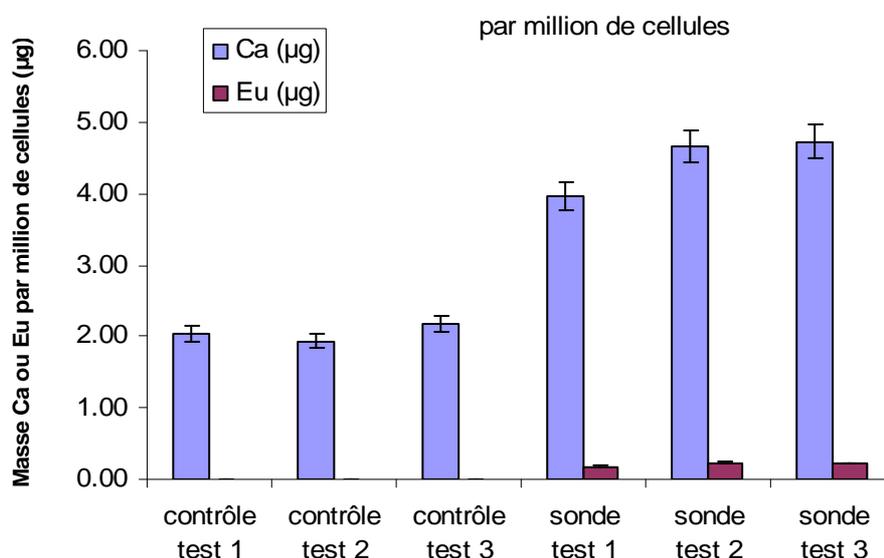


Figure 111 : Détermination des teneurs en Ca et Eu (données en µg) associées aux cellules ZR-75-1 après mise en contact avec Sc_{1,5}(₂)Eu

Ces résultats ne peuvent s'expliquer que par une interaction forte entre les cellules et les nanoparticules pendant la phase de mise en contact. Compte-tenu de la faible taille des nanoparticules (de l'ordre de 30-40 nm), le processus d'endocytose apparaît ici comme le plus probable pour expliquer ces résultats. Dans ce contexte, ces résultats confirment la possibilité d'utiliser de tels nano-systèmes pour des applications biomédicales nécessitant une action intracellulaire (diagnostique ou thérapeutique).

Nous nous sommes ensuite intéressés à vérifier si les résultats quantitatifs ci-dessus, en termes d'augmentation des teneurs en Ca et Eu, étaient cohérents avec la composition chimique initiale de la suspension. La teneur en europium, initialement absent des cellules atteint en moyenne une valeur de $0,21 \pm 0,02$ µg/million de cellules après mise en contact avec les nanoparticules. De même, le calcium subit une augmentation moyenne de $2,4 \pm 0,4$ µg/million de cellules. Le rapport de ces deux valeurs mène alors au rapport massique $\text{Eu}/\text{Ca} = 0,088 \pm 0,002$, soit encore de façon équivalente au rapport molaire $\text{Eu}/(\text{Ca}+\text{Eu}) = 0,022 \pm 0,006$, ce qui correspond à une teneur molaire en Eu, par rapport au calcium, très

proche de la valeur caractéristique des nanoparticules (2%). Cette comparaison révèle donc que les augmentations des teneurs en Ca et Eu correspondent à des proportions relatives entre Ca et Eu similaires à celles de la suspension initiale, et ces résultats sont donc parfaitement cohérents avec une internalisation de nos nanoparticules.

Il sera intéressant par la suite (manipulations en cours) de déterminer si la présence d'acide folique sur les nanoparticules permet ou non d'augmenter de façon significative le nombre de nanoparticules internalisées par les cellules, en particulier dans le cas de cellules surexprimant les récepteurs folates. Comme déjà signalé ci-dessus, des manipulations sur ce point sont en cours (sur des cellules de type T-47-D) en collaboration avec la société Icelltis.

Partie I : Etude préliminaire par microscopie optique couplée à un spectrofluorimètre

Ce travail de thèse visait principalement à élaborer puis caractériser d'un point de vue physico-chimique une nouvelle formulation colloïdale de nanoparticules à base d'apatites biomimétiques, en vue d'applications biomédicales en particulier dans le domaine du diagnostic de cancers. Une des finalités visées concernait la possibilité d'utiliser de tels nano-systèmes comme sondes luminescentes permettant la détection de cellules cancéreuses.

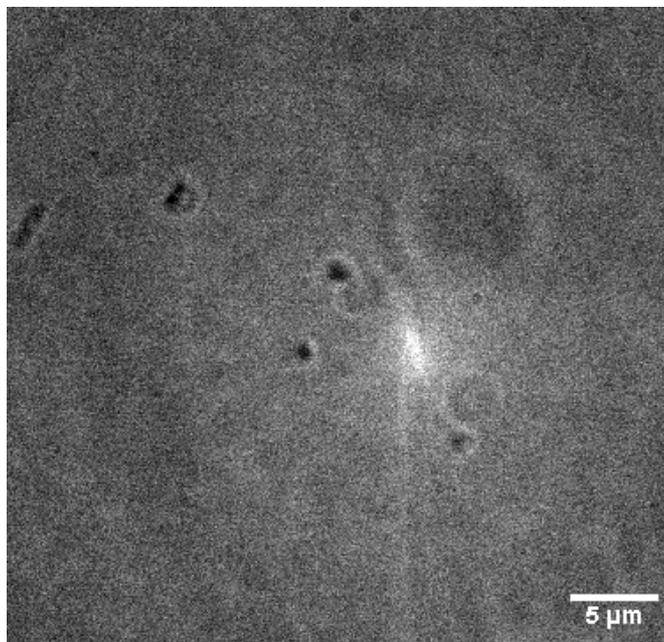
Dans ce contexte, nous avons souhaité aborder, sous la forme d'une « preuve de concept », la problématique de l'observation de telles nanoparticules dopées à l'euporium sous microscope optique (à champ large ou confocal) couplé à un spectrophotomètre.

Les premiers tests réalisés en microscopie en champ large, en collaboration avec S. Mazères du laboratoire IPBS de Toulouse, ont montré qu'il était possible (Figure 112) de distinguer les particules, sur lame de verre (après dépôt d'une goutte de suspension et séchage à l'air), après excitation à 365 nm (correspondant aux possibilités techniques de l'appareil). Ceci permet de confirmer la présence de l'euporium au sein des objets visualisés. Notons cependant que, dans ces conditions de préparation d'échantillon utilisées, seuls des agglomérats microniques de particules sont détectés (l'agglomération étant liée au séchage ayant accompagné la préparation de l'échantillon pour la microscopie). Remarquons cependant la bonne correspondance entre l'image obtenue en transmission (Figure 112a) et celle obtenue après excitation à 365 nm (Figure 112b), confirmant que les objets visualisés correspondent bien à nos nanoparticules dopées. Il sera nécessaire de se pencher plus en détail sur la préparation des échantillons pour l'analyse en microscopie afin de s'affranchir de phénomènes parasites non désirables tels qu'une agglomération liée au séchage non contrôlé de gouttes de suspension sur lame de verre. L'analyse directe des particules à l'état de suspension devra être privilégiée.

Une autre test, cette fois-ci en microscopie confocale (M.C.), a également été réalisé (Figure 113). De la même manière qu'en microscopie en champ large, nous observons des particules agglomérées de taille micronique, ce qui pose de nouveau le problème des conditions de préparation (conditions de séchage lors de la préparation des échantillons pour l'observation par M.C.) de nos échantillons qui devront être améliorées. Les mesures de spectrofluorimétrie réalisées sur ces mêmes particules ont néanmoins, là encore, montré que

la luminescence observée était bien caractéristique de l'ion Eu^{3+} , ce qui confirme les observations de microscopie en champ large.

a)



b)



Figure 112 : Observations (échelle commune) en microscopie à champ large (objectif x100, détection caméra EMCCD) pour Sc_{1,5}(2)Eu : a) en transmission, b) sous excitation à 365 nm

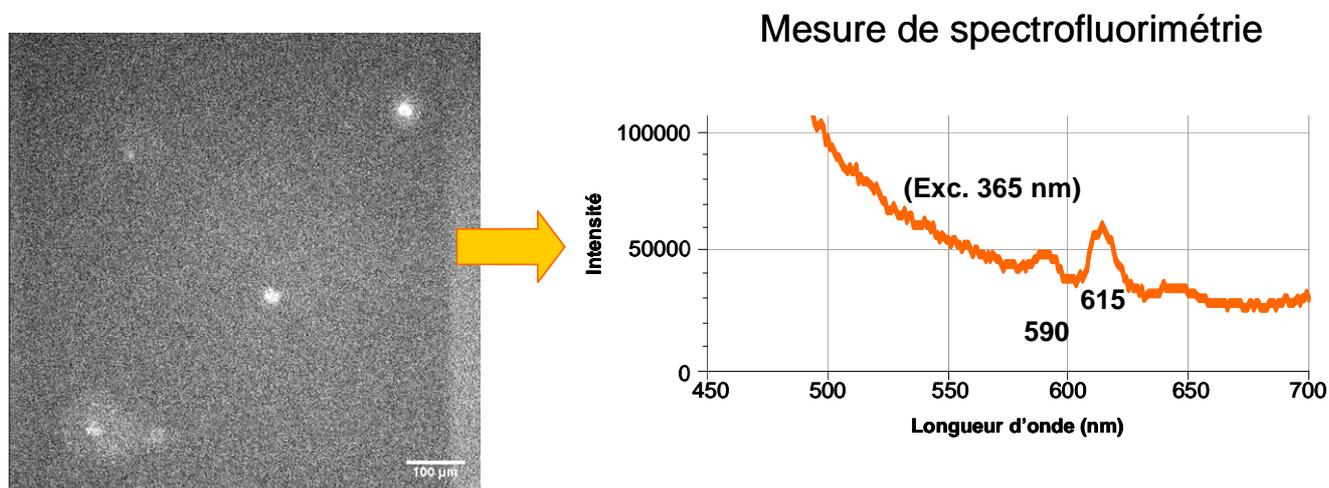


Figure 113 : Observation en microscopie confocale de Sc_{1,5}(₂)Eu (figure de gauche), et mesure de spectrofluorimétrie (longueur d'excitation 365 nm) (figure de droite).

Il sera intéressant, dans les perspectives de ce travail, d'étudier plus en détail la possibilité d'observer ces nanoparticules après internalisation dans des cellules, voire d'utiliser les techniques de microscopie/spectrofluorimétrie en temps retardé compte-tenu de la longue durée de vie de luminescence de ces particules en comparaison avec l'auto-fluorescence du milieu biologique.

CONCLUSION GENERALE

Ce travail avait pour objectif de mettre au point une « preuve » de concept concernant la possible utilisation de nano-systèmes hybrides à base d'apatites nanocristallines biomimétiques (de caractéristiques proches du minéral osseux) dans le domaine biomédical, et ce à des fins de diagnostic, voire de thérapeutiques.

Une grande partie de ce travail a porté sur la recherche d'un protocole expérimental permettant d'obtenir des nanoparticules colloïdales de taille contrôlée, typiquement dans la gamme 30-100 nm ; puis sur la caractérisation physico-chimique de ces systèmes. Nous nous sommes ici inspirés de travaux antérieurs menés aux laboratoires, que nous avons adaptés afin de rendre possible une éventuelle industrialisation (synthèse en milieu aqueux, à base de sels aisément manipulables, ...). L'effet des paramètres expérimentaux majeurs (pH, concentrations, température) a également été déterminé. Nous nous sommes plus spécifiquement intéressés dans ce travail à une application de type « diagnostic » dont l'objectif final serait la détection de cellules cancéreuses par luminescence. Pour cela, nous avons étudié la possibilité de rendre luminescentes les nanoparticules en question par le biais d'une substitution de quelques ions Ca^{2+} par des ions d'euporium Eu^{3+} . Nous nous sommes alors penchés en particulier sur la teneur limite incorporable d'euporium pour conserver une phase cristalline unique, apatitique. Nous nous sommes également questionné sur le mécanisme de substitution pouvant être mis en jeu pour cette substitution entre ions de charges différentes. Nous avons également déterminé les principales caractéristiques de luminescence des composés préparés, et avons ainsi pu montrer que la longue durée de vie de luminescence (de l'ordre de la milliseconde) alliée à une excitation dans le visible (464 nm) ou proche du visible (~ 393 nm) permettait vraisemblablement d'envisager l'étude de matériel biologique, possiblement en temps retardé.

La formulation colloïdale que nous avons obtenue a fait appel à l'introduction dans le milieu de synthèse d'un dérivé phospholipidique biocompatible : le 2-aminoéthylphosphate (AEP), qui avait déjà fait l'objet d'études antérieures au laboratoire. Dans cette thèse, nous avons en particulier cherché à examiner le rôle de l'AEP dans le contrôle du caractère colloïdal des suspensions d'apatite obtenues, ainsi qu'au mode d'interaction pouvant exister entre molécules d'AEP et nanocristaux d'apatite.

Nous avons ensuite, plus ponctuellement, étudié la possibilité d'adjoindre une possible fonction de reconnaissance cellulaire par le biais d'un greffage (adsorption) d'acide folique

(vitamine B9) sur les nano-systèmes hybrides apatite-AEP préparés. En effet, l'acide folique permet dans certains cas de cibler plus spécifiquement certaines cellules cancéreuses.

Une seconde partie de ce travail a consisté à se rapprocher des contraintes liées à l'utilisation potentielle de nano-systèmes en interaction avec le corps humain ou tout au moins avec des matériels biologiques.

Nous nous sommes ainsi penchés sur la purification des colloïdes par dialyse afin d'éliminer toute trace résiduelle de réactifs ainsi que les contre-ions. Nous avons également examiné la possibilité d'ajuster le pH des suspensions à la valeur physiologique, ainsi que de remettre éventuellement les nanoparticules en suspension après un traitement de lyophilisation (permettant d'envisager une facilité de stockage). Nous avons ensuite étudié le comportement à pH acide (pH 5) de nos nano-systèmes afin de se rapprocher des conditions régnant au sein de lysosomes.

Nous avons ensuite réalisé quelques études biologiques préliminaires, visant à évaluer la cytotoxicité de ces systèmes et leur potentiel pro-inflammatoire. Nous avons également mis en contact les nanoparticules colloïdales avec des cellules cancéreuses (cellules ZR-75, cancer du sein) afin d'étudier leur internalisation par un suivi par ICP-AES.

Enfin, nous avons réalisé quelques expériences préliminaires de microscopie optique en champ large, couplé à un spectrophotomètre, afin d'évaluer dans une première approche le potentiel de tels systèmes pour l'imagerie médicale.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Abra R.M., Hunt A. ; Liposome disposition in vivo : III. Dose and vesicle-size effects ; Biochim. Biophys. Acta., **1981**, vol 3, 493-503.

Andrieux K., Desmaële D., D'Angélo J., Couvreur P. ; Nanotechnologies et nouveaux médicaments ; L'actualité chimique, **2003**, Novembre-Décembre, 135-139.

Anjuère F., Czerkinsky C. ; Immunité muqueuse et vaccination ; Médecine sciences, **2007**, vol. 23, n°4.

Annesini M.C., Memoli A., Petralito S. ; Kinetics of surfactant-induced release from liposomes: a time-dependent permeability model ; J. Membr. Sci., **2000**, vol 180, 121-131.

Aprahamian M., Michel C., Humbert W., Devissaguet J.P., Damge C. ; Transmucosal passage of polyalkylcyanoacrylate nanocapsules as a new drug carrier in the small intestine ; Biol. Cell., **1987**, vol 61, 69-76

Arai T., Norde W. ; The behaviour of some model proteins at solid-liquid interfaces 2. sequential and competitive adsorption ; Colloids Surf., **1990**, vol 51, 186-216.

Arends J., Christoffersen J., Christoffersen M.R. Eckert H., Fowler O., Heughebaert J.C., Nancollas G.H., Yesinowski J.P., Zawacki S.J. ; A calcium hydroxyapatite precipitated from aqueous solution - an international multimethod analysis ; J. Crystal Growth, **1987**, vol 84, 515-532.

Becquerel J. ; Compte rendu hebdomadaire de l'académie des sciences ; **1906**, 775-779.

Bernkop-Schnürch A. ; Thiomers : a new generation of mucoadhesive polymers ; Adv. Drug Deliv. Rev., **2005**, vol 57, 1569-1582.

Bhattacharya R., Patra C.R., Earl A., Wang S., Katarya A., Lu L., Kizhakkedathu J.N., Yaszemski M.J., Greipp P., Mukhopadhyay D., Mukherjee P. ; Attaching folic acid on gold nanoparticles using noncovalent interaction via different polyethylene glycol backbones and targeting of cancer cells ; Nanomedicine : Nanotechnology, Biology and Medicine, **2007**, vol 3, 224-238.

Bertholon I., Ponchel G., Labarre D., Couvreur P., Vauthier C. ; Bioadhesive properties of poly(alkylcyanoacrylate) nanoparticles coated with polysaccharide ; J. of Nanoscience and Nanotechnology, **2006**, vol 6, 3102-3109.

Blunk T., Hochstrasser D.F., Sanchez J.C., Muller B.W., Müller R.H., Colloidal carries for intravenous drug targeting : plasma protein adsorption patterns on surface-modified latex particles evaluated by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis ; Electrophoresis, **1993**, vol 14, 1382-1387.

Blunk T., Lück M., Clavör A., Hochstrasser D.F., Sanchez J.-C. Müller B.W., Müller R.H. ; Kinetics of plasma protein adsorption on model particles for controlled drug delivery and drug targeting ; Eur. J. Pharm. Biopharm., **1996**, vol 42, 262-268.

Bornhop D.J., Contag C.H., Licha K., Murphy C.J. ; Advance in contrast agents reporters, and detection ; J. Biomed. Opt., **2001**, vol 6, 106-110.

Bouladjine A., Al-kattan A., Dufour P., Drouet C. ; New advances in nanocrystalline apatite colloïds intended for cellular drug delivery ; Langmuir, **2009**, vol 25, 12256-12265.

Boyer L., Piriou B., Carpena J., Lacout J.-L. ; Study of sites occupation and chemical environment of Eu^{3+} in phosphate-silicates oxyapatites by luminescence ; J. of Alloys and compounds, **2000**, vol 311, 143-152

Bravo-Osuna I., Vauthier C., Farabollini A., Palmieri G.F., Ponchel G. ; Mucoadhesion mechanism of chitosan and thiolated chitosan-poly(isobutyl cyanoacrylate) core-shell nanoparticles ; Biomat., **2007**, 28, 2233-2243.

Buissette V., Giaume D., Gacoin T., Boilot J.-P. ; Aqueous routes to lanthanide-doped oxide nanophosphors ; J. of materials chemistry, **2006**, vol 16, 529-539.

Campbell A.A., LoRe M., Nancollas G.H. ; The influence of carbonate and magnesium-ions on the growth of hydroxyapatite, carbonated apatite and human powdered enamel ; Colloids Surf., **1991**, vol 54, 25-31.

Carlos L. D., Ferreira R. A. S., Bermudez V. de Z., Ribeiro S. J. L. ; Lanthanide-Containing Light-Emitting Organic–Inorganic Hybrids: A Bet on the Future ; *Advanced materials*, **2009**, vol 21, 509-534.

Carstensen H., Müller R.H., Müller B.W. ; particles size, surface hydrophobicity and interaction with serum of parenteral fat emulsions and model-drug carries as paramteres related to RES uptake ; *Clinical Nutrition*, **1992**, vol 11, 289-297.

Cedervall T., lynch I., Foy M., Berggard T, Donnelly S.C., Cagney G., Linse S., Dawson K.A. ; Detailed identification of plasma proteins adsorbed on copolymer nanoparticles ; *Angew. Chem.*, **2007**, vol 46, 5754-5756.

Chane-ching J.Y., Lebugle A. , Rousseloti, Pourpoint A. , Pllé F. ; Colloidal synthesis and characterization of monocrystalline apatite nanophosphors ; *J. of Materials Chemistry*, **2007**, vol 17, 2904-2913.

Christoffersen J., Christoffersen M.R. ; Kinetics of dissolution of calcium hydroxyapatite : IV. The effect of some biologically important inhibitors ; *J. Cryst. Growth*, **1981**, vol 53, 42-54.

CNRS international magazine, **2010**, n°16.

Couvreur P., Vauthier C. ; Nanotechnology : intelligent design to treat complex disease ; *Pharm. Res.*, **2006**, vol 23, 1417-1450.

Diederichs J.E. ; Plasma protein adsorption patterns on liposomes : establishment of analytical procedure ; *Electrophoresis*, **1996**, vol 17, 607-611.

Doat A. ; Synthèse de nanoparticules de phosphate de calcium et de magnétite pour l'imagerie dans le domaine du vivant ; Thèse de l'institut national polytechnique de Toulouse, **2003**.

Donadel K., Felisberto M.D.V., Favere V.T., Rigoni, M., Batistela N.J., Laranjeira M.C.M. ; Sunythesis and characterisation of the iron oxide magnetic particles coated with chitosan biopolymer ; *Mat. Science & Engineering C : Biomimetic and Supermolecular Systems*, **2008**, vol 28, 509-514.

Dong X., Wang Q., Wu T., Pan H ; Understanding adsorption-desorption of BMP-2 on hydroxyapatite (001) surface ; *Biophys. J.*, **2007**, vol 93, 750-759.

Drouet C., Bosc F., Banu M., Largeot C., Combes C., Dechambre G., Estournès C., Raimbeaux G., Rey C. ; Nanocrystalline apatites: From powders to biomaterials powder Technology, *Powder Technology*, **2009**, vol 190, 118–122.

Duan H.W., Kuang M., Wang X.X., Wang Y.A. , Mao H., Nie S.M. ; Reexamining the effects of particle size and surface chemistry on the magnetic properties of iron oxide nanocrystals : New insights into spin disorder and proton relaxivity ; *J. of Physical Chemistry C*, **2008**, vol 112, 8127–8131.

Dubertret B., Skourides P., Norris D.J., Noireaux V., Brivanlou A.H., Libchaber A. ; In vivo imaging of quantum dots encapsulated in phospholipid micelles ; *Science*, **2002**, vol 298, 1759-1762.

Eichert D. ; Etude de la réactivité de surface d'apatites de synthèse nanocristalline ; Thèse de l'institut national polytechnique de Toulouse, **2001**.

Eichert D., Drouet C, Sfihi H, Rey C, Combes C. ; Nanocrystalline apatite-based biomaterials: synthesis, processing and characterization. In : Kendall BJason, editor, *Biomaterials Research Advances*. Nova Science Publishers; 2007

Eldridge J.H., Hammond C.J., Meulbroek J.A., Staas J.K., Gilley R.M., Tice T.R. ; Controlled vaccine release in the gut-associated lymphoid tissues. I. Orally administered biodegradable microspheres target the peyer's patches ; *J. Control. Release*, **1990**, vol 11, 205-214.

Elliot J.C. ; Structure and chemistry of apatites and other calcium orthophosphate, *Studies in Inorganic Chemistry* 18, Eds : Elsevier, Amsterdam, London, New York, Tokyo, **1994**.

Faure A.-C., Dufort S., Josserand V., Perriat P., Coll J.-L., Roux S., Tillement O. ; Control of the in vivo biodistribution of hybrid nanoparticles with different pol(etylen glycol) coatings ; *Small*, **2009**, vol 5, 2565-2575.

Feldheim D.L., Foss C.A. ; Metal Nanoparticles : Synthesis, characterization, and application ; New York, Marcel Dekker, **2002**.

Fizet J., Rivière C., Bridot J.L., Charvet N., Louis C., Billotey C., Raccurt M., Morel G., Roux S., Perriat P., Tillement O. ; Multi-luminescent hybrid gadolinium oxide nanoparticles as potential cell labelling ; J. Nanosci. Nanotechnol., **2009**, vol 9, 5717-5725.

Fukumori Y., Ichikawa H. ; Nanoparticles for cancer therapy and diagnosis ; Adv. Powder Technology, **2006**, vol 17, 1-28.

Funovics M.A., Kapeller B., Hoeller C., Su H.S., Kunstfeld R., Puig S., Macfelda K. ; MR imaging of the her2/neu and 9.2.27 tumor antigens using immunospecificcontrast agents ; Magnetic Resonance Imaging, **2004**, vol 22, 843–850.

Glimchert M., Bonar L., Grynopas M., Landis W., Roufousse A. ; Recent studies of bone mineral : Is the amorphous calcium phosphate theory valid ? ; J. Cryst. Growth, **1981**, vol 53, 100-119.

Goppert T.M., Müller R.H. ; Plasma protein adsorption of tween 80- and poloxamer 188-stabilised solid lipid nanoparticles ; J. Drug Target., **2003**, vol 11, 225-263.

Goppert T.M., Müller R.H. ; Adsorption kinetics of plasma proteins on solid lipid nanoparticles for drug targeting ; Int. J. Pharm., **2005**, vol 302, 172-186.

Graham D.J., Philips M.C. ; Proteins at liquid interface : I. kinetics of adsorption and surface denaturation ; J. Colloid Interface Sci., **1979**, vol 70, 403-414.

Gref R., Luck M., Quellec P., Marchand M., Dellacherie E., Harnisch S., Blunk T., Müller R.H. ; « Stealth » corona-core nanoparticles surface modified by polyethylene glycol (PEG): influences of the corona (PEG chain length and surface density) and of the core composition on phagocytic uptake and plasma protein adsorption ; Colloids and Surfaces B : Biointerfaces, **2000**, vol 18, 301-313.

Häfeli U., Tiefenauer L.X., Schbiger P.A., Weder H.G. ; A lipophilic complex with ¹⁸⁶Re/¹⁸⁸Re incorporated in liposomes suitable for radiotherapy ; Int. J. Rad. Appl. Instrum. B, **1991**, vol 18, 449-454.

Hagen A.R. ; The stoichiometric solubility of calcium orthophosphates ; Scand. J. Dent. Res., **1975**, vol 83, 333-338.

Haley T.J. ; Pharmacology and toxicology of the rare earth elements ; J. Pharm. Sci., **1965**, vol 5, 663-670.

Hayek E., Newsley H. ; Pentacalcium monohydroxyorthophosphate-hydroxyapatite ; Inorg. Syntheses, **1963**, vol 7, 63-65.

Henglein A. ; Small-particle research : physicochemical properties of extremely small colloidal metal and semiconductor particles ; Chem. Rev., **1989**, vol 89, 1861-1873.

Heughebaert J.C. ; Contribution à l'étude de l'évolution des orthophosphates de calcium précipités amorphes en orthophosphates apatitiques ; Thèse de l'institut national polytechnique de Toulouse, **1977**.

Hilgenbrink A.R., Low P.S. ; Folate receptor-mediated drug targeting : from therapeutics to diagnostics ; J. Pharm. Sci., **2005**, vol 94, 2135-2146.

Hina A. ; Etude de la réactivité, en milieu aqueux, d'apatites phosphocalciques d'intérêt biologique ; Thèse de l'institut national polytechnique de Toulouse, **1996**.

Huang H.Z., Yang X.R. ; Synthesis of chitosan-stabilized gold nanoparticles in the absence/presence of tripolyphosphate ; Biomacromolecules, **2004**, vol 5, 2340-2346.

Iijima S. ; Helical microtubules of graphitic carbon, Nature, **1991**, vol 354, 56-58.

Illum L., Davis S.S. ; Targeting of colloidal particles to the bone marrow ; Life Sci., **1987**, vol 40, 1553-1560.

Jani P.U., Florence A.T., McCarthy D.E. ; Further histological evidence of the gastrointestinal absorption of polystyrene nanospheres in the rat ; Int. J. Pharm., **1992**, vol 84, 245-252.

Jenkins P.G., Howard K.A., Blackball N.W., Thomas N.W., Davis S.S., O'Hagan D.T. ; Microparticulate absorption from the rat intestine ; J. Control. Release, **1994**, vol 29, 339-350.

Judd B.R. ; Optical absorption intensities of rare earths ions ; *Phys. Rev.*, **1962**, vol 127, 750-762.

Jung T., Kamm W., Breitenbach A., Kaiserling E., Xiao JX., Kissel T. ; Biodegradable nanoparticles for oral delivery of peptides: is there a role for polymers to affect mucosal uptake? ; *Eur. J Pharm. Biopharm.*, **2000**, vol 50, 147-160.

Kanazawa T. ; Inorganic phosphate materials ; *Materials science monographs*, 52 Kodansha LTD, Tokyo and Elsevier publishers BV, Amsterdam, **1989**.

Kaul G., Amiji M. ; Long-circulating poly(ethylene glycol)-modified gelatine nanoparticles for intracellular delivery ; *Pharm. Res.* ; **2002**, vol 19, 1061-1067.

Kay M. I., Young R. A., Posner A. S. ; Crystal structure of hydroxyapatite ; *Nature*, **1964**, vol 204, 1050-1052.

Kohler N., Fryxell G.E., Zhang A. ; A bifunctional poly(ethylene glycol) silane immobilized on metallic oxide-based nanoparticles for conjugation with cell targeting agents ; *J. Am. Chem. Soc.*, **2004**, vol 126, 7206-7211.

Kohler N., Sun C., Wang J., Zhang M.Q. ; Methotrexate-modified superparamagnetic nanoparticles and their intracellular uptake into human cancer cells ; *Langmuir*, **2005**, vol 21, 8858–8864.

Kresse M., Wagner S., Pfefferer D., Lawaczeck R., Elste V., Semmler W. ; Targeting of ultrasmall superparamagnetic iron oxide (USPIO) particles to tumor cells in vivo by using transferrin receptor pathways ; *Magnetic Resonance in Medicine* ; **1998**, vol 40, 236–242.

Lakshminarasimhan N., Varadaraju U. V. ; Synthesis and Eu^{3+} luminescence in new oxysilicates, $\text{ALa}_3\text{Bi}(\text{SiO}_4)_3\text{O}$ and $\text{ALa}_2\text{Bi}_2(\text{SiO}_4)_3\text{O}$ [$A=\text{Ca}$, Sr and Ba] with apatite-related structure ; *J. Solid State Chem.*, **2005**, vol 178, 3284-3292.

Lazoriak B.I., Golubev V.N., Salmon R., Parent C., Hagenmuler P., Distribution of Eu^{3+} ions in whitlockite-type $\text{Ca}_{3-x}\text{Eu}_{2x/3}(\text{PO}_4)_2$ orthophosphates ; *Eur. J. Solid State Inorg. Chem.*, **1986**, 26, 455-463.

Lebugle A., Pellé F., Charvillat C., Rousselot I., Chane-ching J.Y., Colloidal and monocrystalline Ln^{3+} doped apatite calcium phosphate as biocompatible fluorescent probes ; The Royal Society of Chemistry, **2006**, vol 606, 606-608.

Lechevallier S. ; Nanoparticules luminescentes à base de lanthanides : vers de nouveaux biomarqueurs ; Thèse de l'université Paul Sabatier, **2010**.

Lee R.G., Kim S.W. ; Adsorption of protein onto hydrophobic polymer surfaces : Adsorption isotherms and kinetics ; J. Biomed. Mater. Res., **1974**, vol 8, 251-259.

Lee R.G., Wang S., Low P.S. ; Measurement of endosome pH following folate receptor-mediated endocytosis ; Biochim. Biophys. Acta., **1996**, vol 1312, 237-242.

Legros R., Balmin N., Bonel G. ; Structure and composition of the mineral phase of periosteal bone ; J. Chem. Res. (S), **1986**, vol 1, 8-9.

Legros R.Z. ; Calcium phosphates in oral biology and medicine ; Karger, Basel, 1991.

Lemarchand C., Gref R., Passirani C., Garcion E., Petri B., Muller R., Costantini D. Couvreur P. ; Influence of polysaccharide coating on the interactions of nanoparticles with biological systems ; Biomaterials, **2006**, vol 27, 108-118.

Liu C., Huang Y., Shen W., Cui J. ; Kinetics of hydroxyapatite precipitation at pH 10 to 11 ; Biomaterials, **2001**, vol 22, 301-306.

Liu S.H., Han M.Y. ; Synthesis, functionalization, and bioconjugation of monodisperse, silica-coated gold nanoparticles: Robust Bioprobes ; Adv. Funct. Mater., **2005**, vol 15, 961-967.

Long M., Hong F., Li W., Li F., Zhao H., Lv Y., Li H., Hu F., Sun L., Yan C., Wei Z. ; Size-dependent microstructure and europium site preference influence fluorescent properties of Eu^{3+} -doped $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ nanocrystal ; J. Lumin., **2008**, vol 128, 428-436.

Luck M., Paulke B.R., Schroder W., Blunk T., Müller R.H. ; Analysis of plasma protein adsorption on polymeric nanoparticles with different surface characteristics ; *J. Biomed. Mater. Res.*, **1998**, vol 39, 478-485.

Lynch I., Dawson K.A. ; Protein-nanoparticle interactions ; *Nano. Today*, **2008**, vol 3, 40-47.

Maeda H. ; The tumor blood vessel as an ideal target for macromolecular anticancer agents, *J. Control. Release.*, **1992**, vol 19, 315-324.

Maillet M. ; *Biologie cellulaire*, Masson, Paris, Milan, Barcelone, **1995**.

Maitani X., Qi.Y., Nagai T., Wei S. ; Comparative pharmacokinetics and antitumor efficacy of doxorubicin encapsulated in soybean-derived sterols and poly(ethylene glycol) liposomes in mice, *Int. J. Pharm.*, **1997**, vol 146, 31-39.

Martini M., Montagna M., Ou M., Tillement O., Roux S., Perriat P. ; How to measure quantum yields in scattering media: application to the quantum yield measurement of fluorescein molecules encapsulated in sub-100 nm silica particles, 2009, vol 106, article n°094304.

Maruyama K., Ishida O., Takizawa T., Moribe K. ; Possibility of active targeting to tumor tissues with liposomes ; *Adv. Drug Delivery Rev.*, **1999**, vol 40, 89-102.

Mc Dawell H., Gregory T.M., Brown W.E. ; Solubility of $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$ in the system $\text{Ca}(\text{OH})_2\text{-H}_3\text{PO}_4\text{-H}_2\text{O}$ at 5, 15, 25, and 37°C ; *J. Res. Nat. Bur. Stand.*, **1977**, vol 81A, 273-281.

Moghimi S.M., Muir I.S., Illum L., Davis S.S, Kolb-Bachofen V. ; Coating particles with a block co-polymer (poloxamine-908) suppresses opsonisation but permits the activity of dysopsonins in the serum ; *Biochim. Biophys. Acta.*, **1993**, vol 1179, 157-165.

Moghimi S.M., Hunter A.C., Murray J.C. ; Long-circulating and target-specific nanoparticles: Theory to practice ; *Pharmacological Reviews*, **2001**, vol 53, 283–318.

Montel G. ; *Bull. Soc. Chim. Fr.* ; **1953**, 8-9, 2923-2924,.

Montel G., Bonel G., Heughabert J.C., Trombe J.C., Rey C., ; New concepts in the composition, crystallization and growth of the mineral component in calcified tissues ; J. Cryst. Growth, **1981**, 53, 74-99.

Montet X., Montet-Abou K., Reynolds F., Weissleder R., Josephson L. ; Nanoparticle imaging of integrins on tumors cells ; Neoplasia, **2006**, vol 8, 214-222

Montisci M.J., Dembri A., Giovannuci G., Chacun H., Duchene D., Ponchel G. ; Gastrointestinal transit and mucoadhesion of colloidal suspensions of lycopersicon esculentum L. and lotus tetragonolobus lectin-PLA microsphere conjugates in rats ; Pharm. Res., **2001**, 18, 829-837.

Montrejaud M., Rey C., Trombe J.C., Montel G. ; Sur l'aptitude du réseau apatitique à fixer des molécules d'oxygène. C.R., Coll. Int., C.N.R.S. « Physico-chimie et cristallographie des apatites d'intérêt biologique », Paris, **1973**, 10-15 septembre, no. 230, 481-486.

O'Connell M.J., Bachilo S.M., Huffman C.B., Moore V.C., Strano M.S., Haroz E.H., Rialon K.L., Boul P.J., Noon W.H., Kittrell C., Ma J., Hauge R.H., Weisman R.B., Snelly R.E. ; Band gap fluorescence from individual single-walled carbon nanotubes ; Science, **2002**, vol 297, 593-596.

Ofelt G.S. ; Intensities of crystal spectra of rare earths ions ; J. Chem. Phys., **1962**, vol 37, 511-520.

O'Mullane J.E., Artursson P., Tomlinson E. ; Biopharmaceutics of microparticulate drug carries ; Ann. NY. Acad. Sci., **1987**, vol 507, 120-140.

Otsubo T., Maruyama K., Maesaki S., Miyasaki Y., Tanaka E., Takizawa T., Moribe K., Tomono K., Tashiro T., Kohono S. ; Long-circulating immunoliposomal amphotericin B against invasive pulmonary aspergillosis in mice ; American Society for microbiology, **1998**, vol 42, 40-44.

Oude Wolbers M. P., Van Veggel Frank C. J. M., Snellink-Ruël B. H. M., Hofstraat Johannes W., Geurts Frank A. J., Reinhoudt David N. ; Photophysical studies of *m*-terphenyl-sensitized visible and near-infrared emission from organic 1 :1 lanthanide ion complexes in methanol solution ; J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2 , **1998**, vol 10, 2141-2150.

Owens D.E., Pappas N.A. ; Opsonisation, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles ; *Int. J. Pharm.*, **2006**, vol 307, 93-102.

Park K., Robinson J.R. ; Bioadhesive polymers as platforms for oral-controlled drug delivery : method to study bioadhesion ; *Int. J. Pharm.*, **1984**, 19,107-127.

Pastor J., Pauli A.M., *Techniques de l'ingénieur - Analyse et Caractérisation*, **1995**, P2, 1525.

Phakey P.P., Leonard J.R. ; Dislocations and fault surfaces in natural apatite ; *J. Appl. Cryst.*, **1970**, vol 3, 38-44.

Philips M.C. ; Interactions of apolipoproteins at interfaces. In: Resseneu M., (Ed), *Structure and function of apolipoproteins*. CRC Press, Boca Raton., **1992**, 217-250.

Ponchel G., Montisci M.J., Dembri A., Durrer C., Duchêne D. ; Mucoadhesion of colloidal particulate systems in the gastro-intestinal tract ; *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **1997**, vol 44, 25-31.

Ponchel G., Irache J.M. ; Specific and non-specific bioadhesive particulate systems for oral delivery to the gastro-intestinal tract ; *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **1998**, vol 44, 25-31.

Prugnotte H., Thoreau F. ; *Histologie (PCEM) ; ESTEM*, Paris, **1996**.

Rey C., Trombe J.C., Montel G. ; Sur la fixation de la glycine dans le réseau des phosphates à structure apatitique ; *J. Chem. Res.*, **1978**, 2401-2416.

Rey C. ; Etude des relations entre apatites et composés moléculaires ; Thèse d'état de l'institut national polytechnique de Toulouse, **1984**.

Rey C. ; Du minéral osseux aux biomatériaux, un biominéral particulier : l'apatite. ; *L'actualité chimique*, **1995**, vol 12, 41-45.

Roser M., Fischer D., Kissel T. ; Surface-modified biodegradable albumine nano- and microspheres. II: Effect of surface charges on in vitro phagocytosis and biodistribution in rats ; *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **1998**, vol 46, 255-263.

Russell-Jones G.J., Arthur L., Walker H. ; Vitamin B12-mediated transport of nanoparticles across Caco-2 cells ; *Int. J. Pharm.*, **1999**, vol 179, 247-255.

Sallis J.D. ; in *Calcium phosphates in biological and industrial systems*, (Ed. Z. Amjad) ; Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, **1998**, 174-191.

Salvador-Morales C., Flahaut E., Sim E., Sloan J., Green M.L., Sim R.B. ; Complement activation and protein adsorption by carbon nanotubes ; *Mol. Immunol.*, **2006**, vol 43, 193-201.

Schellenberger E.A., Sosnovik D., Weissleder R., Josephson L. ; Magneto/optical annexin V, a multimodal protein ; *Bioconjugate Chemistry*, **2004**, vol 15, 1062–1067.

Scherrer P. ; *Gött. Narch.* ; **1918**, vol 2, 98.

Shannon R.D., Prewitt C.T. ; Effective ionic radii in oxides and fluorides ; *Acta Cryst.*, **1969**, vol B25, 925-946.

Shieh D.F., Feijen J., Lyman D.J. ; Osmotic flow effects on the dialysis escape curves of solutes ; *Anal. Chem.*, **1975**, vol 47, 1186-1188.

Shwa C.F. ; Gold-based therapeutic agents ; *Chem. Rev.*, **1999**, vol 99, 2589-2600.

Song L., Hennink E.J., Young I.T., Tanke H.J. ; Photobleaching Kinetics of Fluorescein in Quantitative Fluorescence Microscopy ; *Biophys. J.*, **1995**, vol 68, 2588-2600.

Steitz B., Hofmann H., Kamau S.W., Hassa P.O., Hottiger M.O., Rechenberg B., Hofmann-Antenbrink M., Petri-Fink A. ; Characterization of PEI-coated superparamagnetic iron oxide nanoparticles for transfection : Size distribution, colloidal properties and DNA interaction ; *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, **2007**, vol 311, 300-305.

Stöber W., Fink A. ; Controlled growth of monodisperse silica spheres in the micron size range ; *J. of colloid and interface science*, **1968**, vol 26, 62-69.

Sun C., Sze R., Zhang M.Q. ; Folic acid-PEG conjugated superparamagnetic nanoparticles for targeted cellular uptake and detection by MRI ; *J. of Biomedical Materials Research Part A*, **2006**, vol 78A, 550–557.

Supkowski R. M., Horrocks W. DeW. ; On the determination of the number of water molecules, q , coordinated to europium(III) ions in solution from luminescence decay lifetimes ; *Inorganica chimica acta*, **2002**, vol 340, 44-48.

Taylor A.E., Granger D.N. ; Equivalent pore modelling: vesicles and channels ; *Fed. Proc.*, **1983**, vol 42, 2440-2445.

Templeton D.H., Dauben C. H. ; Lattice Parameters of Some Rare Earth Compounds and a Set of Crystal Radii ; **1954**, vol 76, 5237-5239.

Thode K., Luck M., Semmler W., Müller R.H., Kress M. ; Determination of plasma protein adsorption on magnetic iron oxides: sample preparation ; *Pharm. Res.*, **1997**, vol 14, 905-910.

Trombe J.C. ; Contribution à l'étude de la décomposition et de la réactivité de certaines apatites hydroxylées carbonatées ou fluorées alcalino-terreuses. Thèse de l'Université Paul Sabatier de Toulouse, **1972**.

Weiseh O., Sun C., Gunn J., Kohler N., Gabikian P., Lee D., Bhattarai N., Ellenbogen R., Sze R., Hallahan A., Olson J., Zhang M.Q. ; Optical and MRI multifunctional nanoprobe for targeting gliomas ; *Nano. Letters*, **2005**, vol 5, 1003–1008.

Vroman L., Adams A.L., Fischer G.C., Munoz P.C. ; Interaction of high molecular weight kininogen, factor XII, and fibrinogen in plasma at interfaces ; *Blood*, **1980**, vol 55, 156-159.

Walley R., *Ann. Chim.*, 12ième série, 7, 808-848, **1952**.

Wang A.Z., Bagalkot V., Vasilliou C.C., Gu F., Alexis F., Zhang L., Shaikh M., Yuet K., Cima M.J., Langer R., Kantoff P.W., Bander N.H., Jon S.Y., Farokhzad O.C. ; Superparamagnetic iron oxide nanoparticle-aptamer bioconjugates for combined prostate cancer imaging and therapy ; *Chem. Med. Chem.*, **2008**, vol 3, 1311–1315.

Wartlick H., Spankuch-Schmitt B., Strebhardt K., Kreuter J., Langer K. ; Tumor cell delivery of antisense oligonucleotides by human serum albumin nanoparticles ; *J. Control. Release*, **2004**, vol 3, 483-495.

Weissleder R., Stark D.D., Engelstad B.L., Bacon B.R., Compton C.C., White D.LL, Jacobs P., Lewis J. ; Superparamagnetic iron-oxide- pharmacokinetics and toxicity, American Journal of Roentgenology, **1989**, vol 152, 167-173.

Weston S.A., Parish C.R ; New fluorescent dyes for lymphocyte migration studies. Analysis by flow cytometry and fluorescence microscopy ; J. Immunol. Methods, **1990**, vol 133 87-97.

Woodel M.C., Lasic D.D. ; Sterically Stabilised liposomes ; Biochim. Biophys. Acta., **1992**, vol 1113, 171-199.

Yang H.S., Holloway P.H., Santra S. ; Water-soluble silica-overcoated CdS : Mn/Zns semiconductor quantum dots ; J. Chem. Phys., **2004**, vol 121, 7421-7426.

Yin Y., Chen D., Qiao M., Wei X., Hu H. ; Lectin-conjugated PLGA nanoparticles loaded with thymopentin: Ex vivo bioadhesion and *in vivo* biodistribution ; J. Control. Release ; **2007**, vol 123, 27-38.

Young R.A. ; Some aspects of crystal structural modeling of biological apatites ; Colloques internationaux C.N.R.S., Physico-chimie et cristallographie des apatites d'intérêt biologique, **1973**, 21-40.

Zahidi E. ; Etude du système phosphate de calcium-Amino, 2 éthylphosphate de calcium, en milieu eau/éthanol, Thèse de l'institut national polytechnique de Toulouse, **1984**.

ANNEXES

ANNEXES

I) Analyses chimiques

I-1) Dosage du calcium et de l'euporium dans les solides

Les teneurs en calcium et en europium dans les poudres des suspensions colloïdales dialysées et lyophilisées ont été déterminées par ICP-AES (Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectroscopy) au Service Central d'Analyse du CNRS (Vernaison, France). L'erreur relative est de 3%.

I-2) Dosage des ions orthophosphates

Les ions orthophosphates (PO_4^{3-} et HPO_4^{2-} en l'occurrence) ont été dosés par colorimétrie [Gee (1953)]. Le principe de cette méthode consiste à mesurer la densité optique (absorbance) de la coloration jaune du complexe phosphovanadomolybdique $\text{VO}_3[\text{P}(\text{Mo}_3\text{O}_{10})_4]$, en milieu acide, à $\lambda = 460$ nm. Le réactif colorimétrique est préparé en mélangeant dans la proportion 50/50 % en volume, une solution de molybdate d'ammonium (80 g.l^{-1}) et une solution de monovanadate d'ammonium (4 g.l^{-1}).

Les absorbances des différentes solutions ont été mesurées, dans des cuves en quartz, à l'aide d'un spectrophotomètre UV-visible Hitachi Scientific Instrument U-1100 à simple faisceau. L'erreur relative du dosage du phosphore dans ces conditions est de l'ordre de 0,5%.

I-3) Dosages du 2-aminoéthylphosphate (AEP) et de l'acide folique (FA)

La quantité d'AEP ainsi que de FA associée aux nanoparticules a été déterminée par microanalyse élémentaire carbone, hydrogène, azote (C, H, N) au service d'analyses chimiques du LCC (Laboratoire de chimie de coordination) à Toulouse. L'erreur relative est de 0,4 %.

II) Diffraction des rayons X

Les diagrammes ont été obtenus à l'aide d'un diffractomètre à compteur courbe CPS 120 INEL utilisant le rayonnement $K_{\alpha 1}$ émis par une anticathode au cobalt ($\lambda_{\text{Co}} = 1,78892 \text{ \AA}$).

III) Spectroscopie FTIR et Raman

L'analyse par spectroscopie FTIR a été réalisée en transmission dans l'intervalle de nombres d'onde 400 - 4000 cm^{-1} , avec une résolution de 4 cm^{-1} , grâce à un spectromètre Nicolet 5700 sur des pastilles composées d'environ 1 mg de produit dispersé dans 300 mg de KBr. Les spectres infrarouges reportés dans ce travail sont représentés en absorbance.

Les spectres Raman ont été enregistrés sur un spectromètre JOBIN-YVON HR800, en utilisant un laser à 632,8 nm.

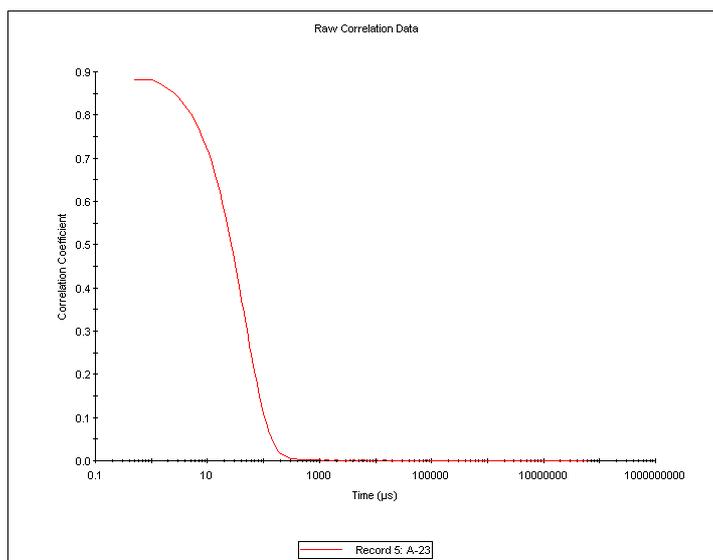
IV) Microscopie électronique en transmission

Les observations de microscopie électronique en transmission (MET) ont été réalisées à l'aide d'un microscope JEOL JEM-1011 (tension accélératrice : 100 kV) dans le service de Microscopie Electronique TEMSCAN de l'Université Paul Sabatier de Toulouse.

Toutes les observations ont été réalisées sur des suspensions colloïdales purifiées par procédé de dialyse. La préparation des échantillons a consisté à diluer 1 ml de suspension purifiée dans 1 ml d'eau désionisée. Cette suspension diluée a ensuite été placée en bain à ultrasons pendant 1 min. Aussitôt après, l'échantillon a été déposé sur une grille support (grille de cuivre sur laquelle est préalablement déposé un film de carbone afin de soutenir les échantillons de petite taille, fragiles ou dispersés). Enfin avant d'être observé au MET, l'échantillon déposé sur la grille support a ensuite été laissé sécher pendant 16 h dans un dessiccateur.

V) Mesures granulométriques (DLS) et mesures de potentiel Zêta

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 ($\lambda = 630 \text{ nm}$), en considérant que les caractéristiques du milieu (viscosité, indice de réfraction) sont celles de l'eau pure (les particules ayant été préparées en milieu aqueux). Un exemple de corrélogramme est donné ci-dessous.



Exemple de corrélogramme (mesures DLS)

Le même appareillage a par ailleurs été utilisé pour la détermination du potentiel Zêta de certains échantillons, à l'aide d'une cellule adaptée (électrophorèse).

VI) Mesures de luminescence

Les propriétés de luminescence ont été étudiées à l'aide d'un spectrofluorimètre Horiba Jobin Yvon Fluorolog 3-11 équipé d'une lampe Xenon de 450 W. Les spectres d'excitation et d'émission ont été mesurés à température ambiante, directement sur les suspensions colloïdales. Les spectres d'excitation ont été enregistrés entre 350 et 600 nm, en monitorant l'émission $^5D_0 \rightarrow ^7F_2$ de l'ion Eu^{3+} à $\lambda_{\text{em}} = 612$ nm (spectral bandwidth : 2 nm). Les spectres d'émission ont été quant à eux enregistrés dans la gamme 500-700 nm (spectral bandwidth : 1 nm), sous excitation dans la transition $^7F_0 \rightarrow ^5L_6$ de Eu^{3+} à $\lambda_{\text{ex}} = 392.8$ nm ou dans la transition $^7F_0 \rightarrow ^5D_2$ à $\lambda_{\text{ex}} = 464.2$ nm.

La durée de vie de luminescence a été évaluée avec un phosphorimètre FL-1040 équipé d'une lampe UV au Xenon pulsé. Les caractéristiques du niveau émetteur 5D_0 de Eu^{3+} ont été suivies. Les déclins d'émission ont été analysés sur un intervalle de temps de 3,5 ms. La résolution temporelle de l'appareil dans les conditions expérimentales était de 30 μs.

Résumé

Ce travail porte sur l'élaboration et la caractérisation physico-chimique de nanoparticules hybrides à base d'apatites phosphocalciques biomimétiques proches du minéral osseux, en vue d'applications dans le domaine du diagnostic de cancers voire de thérapeutique. Dans cette étude, une formulation colloïdale a été développée en milieu aqueux à partir de sels aisément manipulables et en présence d'un dérivé phospholipidique (2-aminoéthylphosphate, AEP) jouant le rôle d'agent dispersant et permettant de contrôler la taille moyenne des nanoparticules (dans la gamme 30-100 nm). L'effet de paramètres expérimentaux majeurs (pH, concentrations, température) a été déterminé. La complémentarité des données analytiques (analyses chimiques, spectroscopie FTIR, diffraction des rayons X, diffusion de la lumière, MET, mesures de potentiel zêta) nous a permis de proposer un modèle descriptif des nanoparticules colloïdales mettant en jeu la présence de complexes entre Ca^{2+} et AEP^- en surface de nanocristaux d'apatite. La possibilité de conférer des propriétés de luminescence a été démontrée, par substitution d'ions Ca^{2+} par des ions europium Eu^{3+} , et une durée de vie de luminescence de l'ordre de la milliseconde permet d'envisager l'étude de matériel biologique. Plus ponctuellement, l'adsorption additionnelle d'acide folique a été étudiée, avec pour objectif final le ciblage de cellules cancéreuses.

Divers aspects liés à une potentielle utilisation dans le domaine biomédical ont également été abordés, tels que la purification de telles suspensions par dialyse, la possibilité d'une remise en suspension après lyophilisation, l'évaluation de leur cytotoxicité, l'étude de leur potentiel pro-inflammatoire par interaction avec des macrophages humains, et une étude préliminaire de l'internalisation de ces nanoparticules par des cellules cancéreuses.

Ce travail a permis de développer une « preuve de concept » permettant d'envisager l'utilisation future de tels nano-systèmes colloïdaux dans le domaine biomédical, et en particulier en oncologie.

Summary

This work deals with the synthesis and physico-chemical characterization of hybrid nanoparticles based on biomimetic calcium phosphate apatites close to bone mineral, in view of applications in the field of cancer diagnosis, or therapeutics. In this study, a colloidal formulation has been developed in aqueous medium, from easily-handled salts and in the presence of a phospholipid moiety (2-aminoethylphosphate, AEP) acting as dispersing agent and allowing the control of the mean nanoparticle size (in the range 30-100 nm). The effect of major experimental parameters (pH, concentrations, temperature) has been determined. Complementary analytical data (chemical analyses, FTIR spectroscopy, XRD, dynamic light scattering, TEM, zeta potential measurements) enabled us to propose a descriptive model for the colloidal nanoparticles, involving the presence of complexes between Ca^{2+} and AEP^- on the surface of apatite nanocrystals. The possibility to confer luminescence properties was demonstrated by way of ionic substitutions of some Ca^{2+} ions by europium Eu^{3+} ions, allowed us to envision the study of biological material. The additional adsorption of folic acid was also addressed, with the final aim to target cancer cell.

Other aspects linked to a potential future use of these nano-systems in the biomedical field were also examined, such as the purification of these suspensions by dialysis, the possibility to re-suspend the nanoparticles after freeze-drying, the evaluation of their cytotoxicity, the study of the pro-inflammatory potential by following interactions with human macrophages, and a preliminary study of their internalization by cancer cells.

This work enabled us to develop a « proof of concept » allowing one to envision the future use of such colloidal nano-systems in the biomedical field, and in particular in oncology.