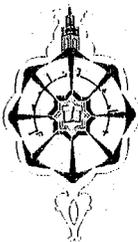
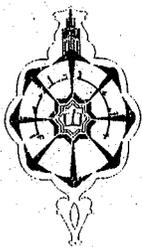




D06/342-03/03



REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR
ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE ABOU-BAKR BELKAID - TLEMCEM

THESE

présentée pour obtenir le grade de

DOCTEUR D'ETAT ES - SCIENCES

(Option : Chimie)

Par

Sidi Mohammed CHABANE SARI

ELABORATION DE MATERIAUX POUR DES APPLICATIONS BIO-MEDICALES . DES MEMBRANES AUX NANO-OBJETS HYBRIDES

Soutenue à Tlemcen le 12 décembre 2004 devant la commission d'examen

S.M. TALEB BENDIAD

M. BENMOUNA

R. LAMARTINE

A. BENGHALEM

M. BENYOUCEF

D. BENACHOUR

Professeur à l'Université Abou Bakr Belkaid de Tlemcen

Professeur à l'Université Abou Bakr Belkaid de Tlemcen

Professeur à l'Université Claude Bernard
Lyon 1, France

Professeur à l'Université Djilali Liabes de Sidi Bel Abbas

Professeur à l'Université Abou Bakr Belkaid de Tlemcen

Professeur à l'Université Ferhat Abbas de Sétif

Président

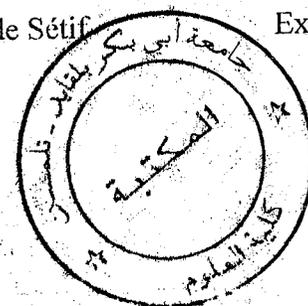
Directeur de thèse

Co-directeur de thèse

Examinateur

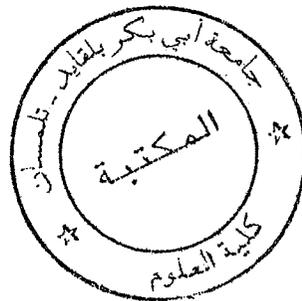
Examinateur

Examinateur



336
15/05/08

Document Sous le N°
Date le: 07 MARS 2011
Code: 4641



À la mémoire de mon père,

A ma mère,

A mes frères et sœurs, ma femme, mes enfants, ma famille

A mes amis.

Je remercie...

REMERCIEMENTS

Ce travail a été réalisé au Laboratoire de Chimie de l'Université Abou Bekr Bekaid de Tlemcen et au Laboratoire d'Application de la Chimie à l'Environnement LACE de l'Université Claude Bernard Lyon-1. Que l'ensemble des personnes ayant contribué à sa réalisation trouvent ici l'expression de ma profonde gratitude.

Je tiens à exprimer mes vifs remerciements à Monsieur **M. BENMOUNA**, Professeur de Chimie à l'Université **Abou Bakr Belkaid** de Tlemcen, pour avoir accepté de diriger ce travail. Il m'a fait bénéficier tout au long de sa réalisation de ses précieux conseils et de la grande pertinence de son orientation qui ont été d'une précieuse aide pour son aboutissement. Qu'il trouve ici le témoignage de ma profonde reconnaissance.

Que Monsieur **S.M. TALEB BENDIAD**, Professeur à l'Université **Abou Bakr Belkaid** de Tlemcen, reçoive le témoignage de ma gratitude pour avoir accepté de présider mon jury de thèse.

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude à Monsieur **R. LAMARTINE**, Professeur à l'Université Claude Bernard Lyon-1, Responsable du Laboratoire " Matériaux Fonctionnalisés et Adsorption " pour m'avoir accueilli et intégré au sein d'une équipe de recherche de son laboratoire, pour avoir mis à ma disposition des moyens nécessaires aux travaux de recherche entrepris, de m'avoir fait bénéficier de son expérience avérée et de ses précieux conseils. De plus, il a bien voulu accepter la charge de faire partie de mon jury, qu'il trouve ici l'expression des mes remerciements respectueux.

Que Messieurs, **A. BENGHALEM**, Professeur à l'Université de Sidi Bel Abbes, et **D. BENACHOUR** Professeur à l'Université de Sétif, trouvent ici l'expression de mes sincères remerciements pour avoir accepté d'examiner ce travail.

J'adresse mes remerciements les plus sincères au Professeur **M. BENYOUCEF** qui m'a fait l'honneur d'accepter de faire partie de ce Jury. Je le remercie également pour la disponibilité dont il a fait preuve à chaque fois que je l'ai sollicité pour des échanges scientifiques.

J'adresse mes remerciements à Monsieur Francis **VOCANSON**, Maître de conférences et chercheur au LACE pour l'aide, la considération et la confiance qu'il a manifestées à mon égard tout au long de mes séjours.

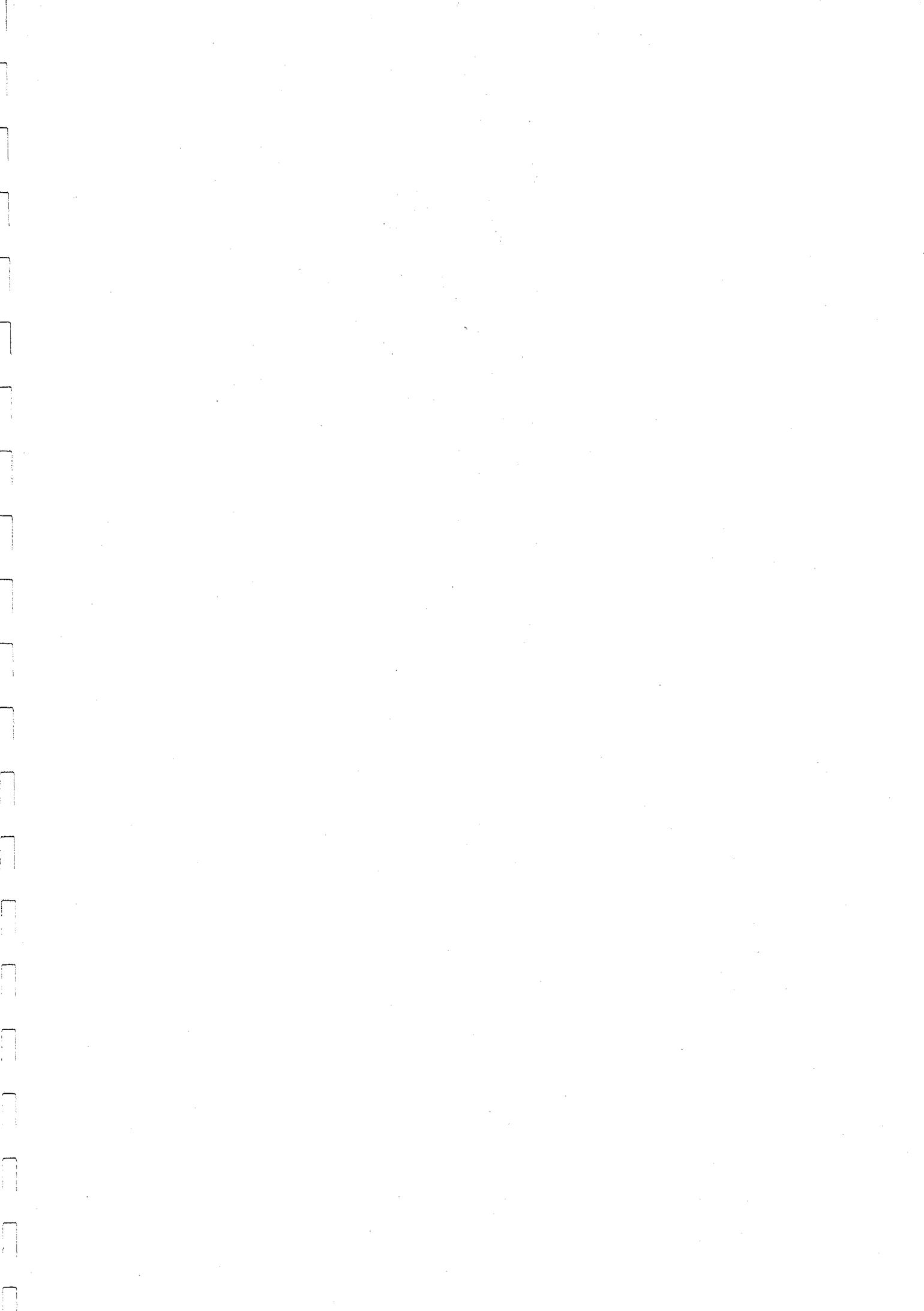
Je remercie également le Professeur **O. TILLEMENT**, Directeur du laboratoire de Physico-Chimie des Matériaux Luminescents à l'Université Claude Bernard Lyon-1, ainsi que le Professeur **P. PERRIAT** du GEMPPM, INSA LYON-1 pour la cordialité des rapports entretenus, la fructuosité des échanges établis et la pertinence des conseils prodigués.

Je remercie Messieurs **C. DUJARDIN**, **G. LEDOUX**, pour m'avoir permis de réaliser les analyses en luminescence au sein de leur laboratoire.

Je remercie Messieurs **S. ROUX**, **P.J. DEBOUTTIERE**, **P. SEIGLE-FERRAND**, **B. BOUALI**, **H. HATEM**, **A. SOFIANE**, **D. CHRISTIAN**, **B. ROSELINE**, **D. CHRISTINE** l'aimable secrétaire du laboratoire, et enfin **S. PERROCHE** pour sa gentillesse et sa sympathie.

Je ne manquerai pas d'exprimer mes remerciements à Monsieur **M. MAHLOUS** Responsable du Laboratoire des Techniques de l'Irradiation du HCR, pour m'avoir permis d'effectuer les irradiations γ .

Mes remerciements vont également à tous mes amis de l'Université de Tlemcen, et en particulier à Messieurs **F. LAHFA** et **D. CHABANE SARI**, pour leur aide précieuse et leur soutien.



Sommaire

Introduction générale

4

Partie A : Elaboration de biopolymères à base d'hydroxyéthylméthacrylate (HEMA) par radiopolymérisation à basse température

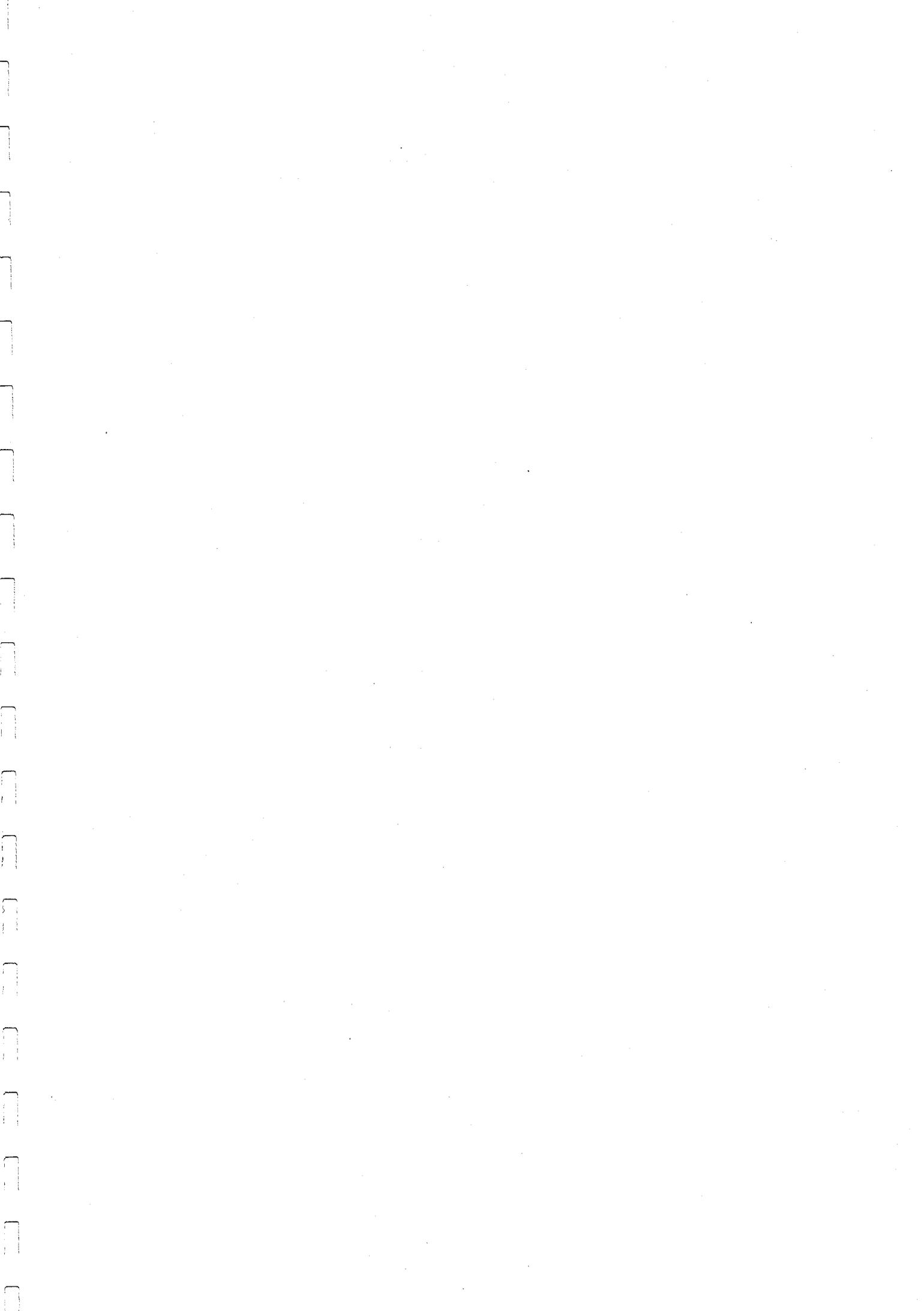
Introduction	8
CHAPITRE A.I :	10
I.1. Nouveaux systèmes de libération de médicaments	10
I.1.1. Régulation chimique des systèmes de relachement de médicaments	10
I.1.2. Dispositifs modulés de libération de médicaments	10
I.1.3. Systèmes pour l'administration de l'insuline	11
I.1.4. Différentes approches pour l'administration de l'insuline	11
I.1.4.1. Pompes d'insuline	11
I.1.4.2. Transplantation de pancréas et d'îlot de cellules	12
I.1.4.3. Systèmes à stimulation externe	13
I.1.4.4. Systèmes autorégulateurs de libération de l'insuline	13
I.1.4.5. Livraison orale de l'insuline	13
I.1.4.6. Livraison nasale de l'insuline	14
I.1.4.7. Systèmes polymériques gluco-sensitifs	14
I.2. Les hydrogels ; préparations, propriétés et applications	15
Introduction	15
I.2.1. Préparation des hydrogels sensibles au pH	15
I.2.2. Propriétés physiques et chimiques des hydrogels	16
II.2.2.1 Gonflement	17
II.2.2.2. Facteurs qui influent sur le gonflement	17
a) Effet de la charge monomérique	18
b) Effet de la force ionique	18
c) Effet de la composition du tampon	18
d) Effet des ions	19
e) Effet de la densité de réticulation	19
f) L'effet d'hydrophilicité / hydrophobicité	20
I.2.3. Dynamique de gonflement	20
I.2.4. Perméabilité	21
I.2.5. Bioadhésion	22
I.2.6. Diffusion	22
I.2.7. Biocompatibilité	22
I.3. Application des hydrogels comme biomatériaux	23
I.3.1. Rein artificiel	23
I.3.2. Poumon artificiel	23
I.3.3. Cornée artificielle	24
I.3.4. Peau artificielle	24
I.3.5. Pancréas artificiel	25
I.3.6. En analytique et diagnostique	25
I.3.7. Application industrielle	25
I.4. Revue bibliographique	25
I.5. Polymérisation des hydrogels par les radiations ionisantes gamma du ⁶⁰ Co à basse température	27
Introduction	27
Mécanisme	28

a) Réaction avec l'oxygène	30
b) Effet de la température d'irradiation sur la réaction de polymérisation	31
Conclusion	33
CHAPITRE A.II : Partie expérimentale	34
II.1 Produits	34
a) Monomères	34
b) Enzyme	34
c) Substrat	34
d) Solvants	35
II.2. Méthodes	35
II.2.1. Préparation des polymères	35
II.2.2. Détermination du taux de gonflement des polymères	36
II.2.3. Microscopie électronique	36
CHAPITRE A.III : Résultats et discussion	37
Introduction	37
III.1. Effet de la dose d'irradiation sur le taux de conversion de l'HEMA en PHEMA	37
III.2. Membranes de PHEMA sensibles au glucose	41
Conclusion	50
Références bibliographique (partie A)	51

Partie B : Greffage de la lissamine rhodamine B sur des nanoparticules colloïdales stables: une procédure originale pour estimer le nombre de molécules de colorant liées aux nanoparticules

CHAPITRE B.I :	57
I.1 Nanomatériaux	57
I.1.1. Définitions et distinction entre nanotechnologies et nanosciences	57
I.1.2. Matériaux hybrides	59
I.1.2.1 Les capteurs chimiques	60
I.1.2.2. Les matériaux poreux	60
I.1.3. Nanoparticules hybrides	60
I.1.4. Nanohybride d'or	63
I.1.5. Les objectifs espérés	64
I.1.6. Revue bibliographique	64
a) Nanoparticules métalliques pour le ciblage des tumeurs	64
I.2. Le chlorure de lissamine rhodamine B sulfonyle (sulforhodamine)	66
Introduction	66
I.2.1. Rôle de la molécule fluorescente	67
I.2.2. Utilisation dans la vectorisation	67
I.2.3. greffage de la rhodamine	67
I.3. Synthèse et caractérisation de nanoparticules d'or	69
I.3.1 Les méthodes physiques de synthèse de nanoparticules d'or	70
I.3.1.1. Vaporisation du métal	70
I.3.1.2. L'irradiation laser	70
I.3.1.3. Les ultrasons, la radiolyse et les réductions photochimiques	70
a) Les ultrasons	71
b) La radiolyse	71
c) La réduction photochimique	72
I.3.2. Les méthodes chimiques de synthèse de nanoparticule	72
I.3.2.1. Réduction utilisant le borohydrure de triéthyllithium	72

I.3.2.2. Réduction utilisant le chlorure de tétrakis (hydroxyl) phosphonium	73
I.3.2.3. Réduction utilisant l'hydroxylamine ou l'acide ascorbique	73
I.3.2.4. Réduction utilisant le borohydrure de sodium NaBH ₄	73
a) Milieu biphasique	74
b) Milieu monophasique	75
I.3.2.5. Réduction utilisant le citrate de sodium	77
Revue bibliographique	78
I.4. Stabilisation	80
I.5. Caractérisation	82
I.5.1. Contrôle de la taille	82
I.5.2. Contrôle de l'agrégation	83
I.5.3. Analyse spectroscopique	84
I.5.3.1 Emission sous excitation UV	85
I.5.3.2 Excitation	86
I.5.3.4. Contrôle et quantification du greffage de molécules organiques à la surface des nanoparticules d'or	87
Conclusion	87
CHAPITRE B.II : Partie expérimentale	89
II.1. Matériel	89
II.1.1 Produits chimiques	89
II.1.2. Analyses	89
II.2. Synthèse de nanoparticules d'or	90
II.2.1 Réduction à l'aide de NaBH ₄	90
a) Mode opératoire	90
b) Purification et séchage	91
c) Redispersion	91
II.2.2. Réduction à l'aide de citrate de sodium	91
a) Préparation de nanoparticules de taille importante	91
b) Préparation de nanoparticules en présence d'acide tannique	92
II.3. Couplage du chlorure de lissamine rhodamine B sulfonyl et l'aminthiophénol	92
Mode opératoire	92
CHAPITRE B.III : Résultats et discussions	95
Résumé	95
III.1. Synthèse	97
III.2. Elaboration de nanoparticules en présence d'acide tannique	98
III.3. Le greffage des thiols sur les nanoparticules	98
III.4. La précipitation des nanoparticules	98
III.5. Résultats et discussion	99
III.5.1. Fonctionnalisation des nanoparticules d'or	99
III.5.2. Greffage de la lissamine rhodamine B sur des nanoparticules colloïdales stables	102
III.5.3. Une procédure spécifique pour doser les colorants fixés sur les particules	108
Conclusion	115
III.5.4. Fonctionnalisation des nanoparticules par la rhodamine thiolée	115
a) Analyses UV/Visible et luminescence	115
Références bibliographiques (partie B)	120
Conclusion Générale	125
Annexes	127



Introduction générale

Le traitement anticancéreux a pour objectif d'éliminer spécifiquement la prolifération du tissu pathologique sans pour autant détruire le tissu sain. Les traitements classiques font recourt à la chirurgie, à la radiothérapie et à la chimiothérapie. Cependant, ces méthodes se heurtent de plus en plus souvent à des limites. Actuellement, il est impossible de traiter définitivement un cancer, malgré l'efficacité des armes thérapeutiques utilisées car le dépistage et l'élimination des métastases reste le problème majeur.

Dans le domaine thérapeutique, si les principes actifs pouvaient franchir sélectivement les membranes des cellules cibles, cela augmenterait considérablement leur efficacité, notamment en cas de multirésistance qui est une des causes d'échec du traitement du Cancer et du Sida. En effet, aucun médicament ne peut exercer une activité thérapeutique si la molécule biologiquement active qu'il renferme n'est pas capable de franchir les barrières biologiques qui séparent le site d'administration du site d'action (intérieur de la cellule). Les barrières à traverser sont des systèmes très complexes faisant intervenir plusieurs éléments comme la membrane plasmique cellulaire par exemple et plusieurs composantes comme les barrières mécaniques, physico-chimiques et les barrières enzymatiques.

La plupart des formes galéniques sont administrées par voie orale ou intraveineuse à des intervalles de temps bien déterminés. Ceci peut avoir, comme conséquence, des fluctuations de la concentration de la molécule active dans le plasma. Il faut savoir, que chaque molécule possède une gamme thérapeutique de tolérance en dehors de laquelle elle est, soit toxique soit inefficace. Ces fluctuations sont cruciales par rapport à l'efficacité et aux effets secondaires qui pourraient en résulter. Elles sont d'autant plus importantes que la gamme thérapeutique est étroite. Un autre souci important relatif à la conformité du patient à la routine prescrite pour l'administration du médicament, puisque les formes galéniques conventionnelles sont parfois incommodes par rapport aux fréquences et aux modes de dosage.

Pour surmonter de telles imperfections des thérapies conventionnelles, lors de ces dernières décennies, les chercheurs ont tenté de créer de nouveaux systèmes de traitement. Ces systèmes améliorés incluent la modification chimique des médicaments pour changer sélectivement leurs propriétés telles que la bio-distribution, la pharmacocinétique, ou la solubilité. Les badges cutanés sont des exemples des entités modifiées. L'occlusion des molécules actives dans des bio-polymères est un autre exemple de nouveaux systèmes d'administration de médicament. Ces biopolymères sont des microparticules ou des porteurs

colloïdaux qui peuvent être utilisés pour un traitement ciblé (1). Les systèmes de relâchement contrôlé constituent la majeure partie des nouveaux systèmes recherchés où la molécule active est libérée à un taux prédéterminé pour une période de temps définie.

Dans la première partie de ce travail, nous nous sommes intéressés à l'étude d'un polymère à base d'hydroxyéthylmétacrylate et son élaboration par radiopolymérisation à basse température. Ce polymère est biocompatible et présente plusieurs avantages pour les applications à visée thérapeutique. Nous avons également étudié la pH-sensitivité de ce polymère.

Dans la deuxième partie, nous nous sommes intéressés à l'élaboration de nanoparticules hybrides organiques/inorganiques, à leur caractérisation et à leur fonctionnalisation. Car depuis une dizaine d'années, des percées majeures dans le domaine médical sont attendues à l'aide des nanotechnologies. Les chercheurs tentent de développer de nouveaux systèmes thérapeutiques (hybrides) pouvant franchir les barrières biologiques et possédant non seulement un site de reconnaissance spécifique des cellules malignes mais permettant aussi la destruction sélective des métastases formées. Ceci constitue une voie de développement intéressante de nouveaux agents anti-cancéreux. Les chercheurs s'appliquent à mettre au point des systèmes de vectorisation type particuliers (nanoparticule) pour le transport de principes actifs. Après administration intra-vasculaire, les vecteurs particuliers sont opsonisés, c'est-à-dire recouverts et reconnus par les macrophages du foie et de la rate. Ceci permet d'envisager le ciblage et le traitement expérimental des métastases hépatiques en réduisant en même temps la toxicité de certains médicaments administrés par les autres voies. Pour le ciblage des autres organes, les systèmes particuliers sont modifiés « furtifiés » chimiquement, et peuvent alors séjourner plus longtemps dans la circulation générale en évitant la reconnaissance par le foie et la rate. La présence d'un chromophore sur la nanoparticule permettra de suivre son parcours et celle d'un agent présentant une affinité biologique permettra le ciblage spécifique des cellules cancéreuses, comme les cellules épithéliales mammaires, ovariennes, et colorectales.

Cette stratégie thérapeutique permettrait de : (i) maintenir la concentration du médicament dans la gamme thérapeutique exigée, (ii) se prémunir des effets secondaires indésirables sur les autres organes, (iii) réduire au minimum la dégradation du médicament par le corps, et augmenter le confort du patient. (iv) augmenter l'efficacité thérapeutique.

Pour pouvoir mener à bien ce projet pluridisciplinaire, il est nécessaire de rassembler une vaste palette de compétences qui vont de la chimie et la physique à la biologie et

l'ingénierie de système. Chacun apporte une compétence spécifique et un domaine d'expertise propre.

L'étude lancée dans le cadre de ce projet, constitue la première étape. Elle traite la chimie de synthèse d'assemblages moléculaires organiques/inorganiques devant satisfaire à des conditions assez strictes de biocompatibilité, de dispersabilité dans le sang, de taille et être facilement repérables.

Le choix de l'unité inorganique n'est pas simple car les particules doivent être de taille nanométrique et elles doivent permettre de détruire les cellules par un traitement ultérieur. En raison de sa grande stabilité, de sa faible toxicité et de son excellente compatibilité physiologique, l'or a été choisi comme étant l'unité inorganique la plus appropriée. La présence de molécules organiques, que nous appellerons « espaceurs », est nécessaire. Ces molécules constituées par des dérivés thiolés présentent une forte affinité du soufre pour l'or (c'est un acide mou qui se lie par covalence à l'atome de soufre, base molle, d'après la théorie de Pearson) et permettent le greffage ultérieur, d'autres molécules par le biais de liaisons amides. Ces molécules permettront également de stabiliser les nanoparticules d'or en empêchant leur agrégation. Ils favoriseront également leur redispersion en milieu aqueux. Ainsi nous comptons élaborer un vecteur repérable, d'un principe actif.

La synthèse des nanoparticules d'or hybrides organique/inorganique est cependant assujettie à de nombreux critères imposés par l'application envisagée. Ainsi, le choix de la méthode de synthèse des nanoparticules d'or sera dicté par :

- la biocompatibilité des nanoparticules élaborées. En effet, toutes les substances toxiques pour l'organisme doivent être soigneusement évitées tout au long des différentes étapes de synthèse et de greffage,
- le besoin de disposer de méthodes de synthèse et de greffage fiables et reproductibles,
- la nécessité de disposer de nanoparticules, après modification de leur surface, de taille homogène et convenable comprise entre 5 et 15 nm,
- la stabilité et la dispersion des nanoparticules en solution,

L'élaboration de telles nanoparticules comporte deux étapes essentielles et sont, la synthèse, et la fonctionnalisation par des espaceurs, des stabilisants ...

Afin de recenser les différentes techniques de synthèse de nanoparticules d'or l'analyse de la littérature, est le point de départ de ce travail.

Dans la partie expérimentale seront présentés succinctement les différents modes de synthèse ainsi que les techniques de caractérisations utilisées.

La synthèse et la caractérisation de nanoparticules d'or fonctionnalisées par différentes molécules et les différentes stratégies de greffage d'un chromophore le chlorure de lissamine rhodamine B sulfonyle sur les nanoparticules seront présentées.

PARTIE A

Elaboration de biopolymères à base d'hydroxyéthylméthacrylate
(HEMA) par radiopolymérisation à basse température

Introduction

Les polymères ont joué un rôle essentiel et important dans le développement de nouveaux dispositifs de relâchement contrôlé de molécules biologiquement actives. Par exemple, l'utilisation de comprimés entériques dragéifiés par des polymères spéciaux comme le phtalate d'acétate de cellulose qui se dissout en milieu alcalin, permet d'éviter la dégradation de la molécule active dans l'environnement acide de l'estomac et l'irritation de ce dernier. Le dégagement du médicament s'effectuera dans l'intestin là où son absorption sera optimale. Les hydrogels ont été également explorés et intensivement étudiés en tant que dispositifs potentiels de relâchement de molécules actives (1). Les hydrogels biodégradables pourraient avoir de grandes variétés d'applications dans les systèmes de relâchement contrôlé de médicaments (2). Les micelles polymériques et les liposomes ont été également présentés comme vecteurs potentiels (3).

L'approche de base pour les dispositifs de relâchement contrôlé est basée sur la libération des médicaments à des taux constants. Cependant, il existe quelques situations où une telle approche n'est pas appropriée car le relâchement de médicaments doit répondre à des conditions métaboliques de fluctuation. Ainsi, la libération du médicament doit répondre aux besoins liés au changement des processus physiologiques. Cette condition a mené à l'étude et au développement de nouveaux systèmes commandés par une information rétroactive (systèmes autorégulés) ou par des stimuli externes tel que l'effet électrostatique, l'effet hydrophobe, l'effet de la température, l'effet magnétique, les ultrasons, l'effet de la lumière et de l'électricité (4).

L'effet électrostatique dû à l'attraction ou la répulsion de charge peut induire le rétrécissement ou le gonflement de la structure de l'hydrogel, ce qui peut avoir des conséquences sur la libération des médicaments (5,6).

Les variations du pH peuvent également induire par les phénomènes d'attraction ou de répulsion de charges, des changements mécaniques de l'intégrité de l'hydrogel permettant ainsi le contrôle du relâchement des molécules contenues à l'intérieur de sa structure (7-12).

Nous nous sommes intéressés dans la partie A de ce travail aux deux derniers effets que sont l'effet électrostatique et l'effet du pH sur la perméabilité des hydrogels biocompatibles, biodégradables obtenus par radiopolymérisation.

Afin de mieux comprendre la contribution des hydrogels dans le domaine thérapeutique c'est-à-dire la vectorisation ou la libération contrôlée de médicaments, nous allons présenter; dans le chapitre I les nouveaux systèmes de libération de médicaments. Le cas de l'insuline y est considéré. Dans le chapitre II sera présenté la préparation des hydrogels et leurs propriétés physico-chimiques. Dans le chapitre III nous présenterons les différentes applications des hydrogels, comme biomatériaux. Dans le chapitre IV nous aborderons la partie expérimentale . Enfin, dans le chapitre V seront présentés les résultats obtenus, leurs interprétations suivis d'une conclusion.

CHAPITRE A.I.

I.1. Nouveaux systèmes de libération de médicaments

I.1.1. Régulation chimique des systèmes de relâchement de médicaments

Le système modulé de relâchement de médicaments peut être défini comme un système qui, en fonction d'une information reçue, est capable d'ajuster le dégagement ou le relâchement du médicament (13).

Le développement de tels dispositifs représente un domaine de recherche important pour le traitement du diabète car il est maintenant bien connu que le remplacement de l'insuline par des injections périodiques ne peut pas empêcher les complications sérieuses de cette maladie. Si l'insuline exogène pourrait être libérée selon les conditions métaboliques de fluctuation du corps, le développement d'implant capable de livrer l'insuline en réponse aux changements du taux de glucose dans le sang est évidemment un domaine de recherche très important.

I.1.2. Dispositifs modulés de libération de médicaments

Les dispositifs modulés de libération de médicaments impliquent deux mécanismes différents dans leur conception. Le premier est basé sur la désorption concurrentielle comme étape de contrôle du taux de relâchement, tandis que le deuxième utilise la réaction enzyme/substrat comme mécanisme de régulation.

La méthodologie de base pour le mécanisme de désorption concurrentielle a été démontré la première fois par Brownlee et Cerami en 1979 (14). Leur système comporte la préparation de l'insuline glycosylée; les molécules de sucre attachées à l'insuline sont complémentaires aux fonctions carbohydate des protéines tels que la concavalin A, habituellement abrégées Con A. Ces molécules d'insuline glycosylées peuvent alors être liées à la Con A et réversiblement déplacées des accepteurs de Con A proportionnellement au glucose libre externe.

Une approche semblable a été développée par Kim et coll (15-18) avec l'utilisation de dérivés glycosylés d'insuline ayant des constantes de liaisons à la Con A, variables afin d'éviter le danger de l'hypoglycémie.

I.1.3. Systèmes pour l'administration de l'insuline

L'insuline est une hormone très importante qui aide les cellules du corps à consommer les carburants biologiques, principalement le glucose. Le diabète est une maladie où le pancréas perd sa capacité de produire l'insuline suite aux dommages des β -cellules ou à l'incapacité de certaines cellules à utiliser le glucose. Cette réaction anormale mène à l'accumulation de taux élevés de glucose dans le sang. Le fonctionnement excessif des reins pour filtrer le glucose dans l'urine mène à la déshydratation du corps. Ceci mènera à des défaillances fonctionnelles graves. L'acidose et la déshydratation peuvent induire le coma et la mort.

La méthode conventionnelle pour administrer l'insuline reste l'injection par les patients diabétiques deux à quatre fois par jour et jusqu'à sept fois pour les patients fortement motivés (par exemple, la femme diabétique enceinte). Les contrôles fréquents du taux de glucose dans le sang sont instables. Des fluctuations rapides pourraient mener à l'hypoglycémie. L'injection de l'insuline exogène ne peut pas imiter le modèle normal du dégagement d'insuline par le pancréas. Par conséquent, les complications à long terme du diabète constituent toujours les principaux problèmes. Il s'agit des maladies vasculaires et cardiaques dues à l'endommagement des vaisseaux sanguins, la cécité visuelle, dues aux dommages de la rétine et du nerf (19).

I.1.4. Différentes approches pour l'administration de l'insuline

L'insuffisance de l'utilisation des injections quotidiennes d'insuline, pour un bon entretien de la glycémie et pour empêcher les complications à long terme du diabète, a créé un besoin de rechercher de nouveaux systèmes de livraison de l'insuline. Les approches envisagées sont basées sur la mise au point de systèmes qui peuvent livrer l'insuline selon un mode qui peut étroitement ressembler ou imiter le mode de fonctionnement normal du pancréas. Différentes approches ont été utilisées et elles seront résumées dans les catégories suivantes :

I.4.1.1. Pompes d'insuline

Les pompes d'insuline utilisées dans le traitement du diabète sont classées en deux catégories, les systèmes à circuit fermé et les systèmes à circuit ouvert. Le système à circuit fermé se compose d'un dispositif de rétroaction et d'un réservoir qui infuse l'insuline selon le taux de glucose dans le sang. Albisser et coll. (20) ont développé des unités à circuit fermé qui ont été utilisées médicalement en 1974. Le système de la livraison d'insuline à circuit

fermé est plutôt encombrant et coûteux car il se compose de sonde de glucose, un amplificateur et un microprocesseur, une alimentation d'énergie, une pompe, et un réservoir d'insuline qui peut être rempli. Par conséquent, de tels systèmes doivent surmonter le manque de sonde fiable de glucose, les risques d'infections, et le problème de coagulation du sang. Les systèmes à circuit ouverts ont été étudiés en raison des insuffisances des systèmes à circuit fermé. Slama (21) a démontré l'applicabilité d'un système externe qui libère l'insuline par intraveineuse en utilisant une pompe externe portable. Des pompes implantables programmables ont été également mises au point (22). Seulement une quantité prédéterminée d'insuline peut être libérée en employant le système à circuit ouvert car le taux de glucose dans le sang n'est pas contrôlé de manière continue comme dans le cas du système à circuit fermé. Le traitement par ce type de système est efficace lorsqu'il combiné avec des programmes spécifiques et soigneux de régime et d'exercice physique. Le progrès des pompes implantables d'insuline a été entravé par l'instabilité des préparations d'insuline qui ont tendance à agréger et précipiter dans les pompes et les sondes. Ce problème a été résolu par le groupe de H. Thurow (23). La voie intra péritonéale pour la livraison d'insuline a été étudiée et comparée aux voies sous-cutanées et intraveineuses (24). Elle est plus physiologique. Ceci a mené au développement des pompes intra péritonéales. Les incidents de panne de pompe et d'obstruction de la sonde sont toujours fréquents, en plus des coûts élevés (25). Par conséquent, à long terme, l'optimisation de taille et la sécurité de tels systèmes doivent être améliorées.

I.1.4.2. Transplantation de pancréas et d'îlot de cellules

Des greffes de pancréas ont été exécutées dans le monde entier. Le procédé le plus commun est la transplantation simultanée du pancréas et du rein. Des études cliniques ont montré que 90% des patients présentent une survie seulement d'une année qui diminue ensuite en raison des complications relatives au rejet rénal (25). Le manque ou les sources limitées des organes ainsi que les problèmes des réactions immunologiques font que ce procédé est difficile et n'est pas une thérapie idéale pour le diabète.

Une autre approche est de transplanter des îlots de cellules. Dans un essai clinique récent, une transplantation simultanée d'un îlot de cellules et d'un rein a été exécutée (26). Cette approche semble être prometteuse. Elle a fourni une amélioration significative par rapport à la transplantation du pancréas en ce qui concerne les difficultés immunogéniques mais les problèmes liés à leur viabilité à long terme doivent être résolus.

I.1.4.3. Systèmes à stimulation externe

Plusieurs systèmes ont été conçus pour libérer l'insuline en réponse aux stimuli externes. Cependant, ces systèmes peuvent avoir des problèmes de biocompatibilité et de manque d'efficacité du mécanisme de sensibilité au glucose. Le rétrécissement ou gonflement du gel peut être commandé par l'intensité du champ électrique appliqué (27). Sefton (28) a développé une mini pompe modifiée, commandée par stimulation électrique. Le serrage par magnétisme induit est produit dans les systèmes stimulés par un champ magnétique (29) tandis que l'érosion est induite dans les systèmes stimulés par des ultrasons ayant pour résultat le dégagement de l'insuline. (30).

I.1.4.4. Systèmes autorégulateurs de libération de l'insuline

Brownlee et Cerami ont été les premiers à présenter un système modulé de libération d'insuline (14, 35). Récemment, des copolymères sensibles au glucose contenant l'acide phényl boronique ont été développés par Kitano (36). L'insuline modifiée chimiquement contient des fonctions diols, forme des complexes avec le polymère et l'échange compétitif avec les molécules de glucose libre aura comme conséquence le dégagement de l'insuline. En se basant sur ce mécanisme plusieurs systèmes de polymère insolubles, et solubles, sont étudiés pour commander le dégagement de l'insuline.

I.1.4.5. Livraison orale de l'insuline

L'administration de l'insuline par voie orale est étudiée en se basant sur l'utilisation des inhibiteurs de protéase (37). Des recherches ont montré qu'une simple dose, provoque une diminution du taux de glucose dans le plasma des chiens diabétiques et non diabétiques (38). L'insuline mélangée à l'acide cholique (Cholate) et à l'inhibiteur de tripsine des grains de soja sous forme de comprimés entériques enrobés présente un effet biologique bénéfique dans le traitement du diabète. Le maximum de l'absorption orale d'insuline en prolongeant le temps de contact à l'emplacement de l'absorption a été essayé (39). Le temps de contact a été prolongé en employant les additifs de contrôle de viscosité. L'effet de la cellulose hydroxypropylique pour différentes viscosités sur la biodisponibilité de l'insuline orale a été étudié. Un autre système pour la livraison orale de l'insuline comporte une microémulsion eau-huile dans laquelle la phase aqueuse contient l'insuline et l'huile contient la lécithine, les acides gras non estérifiés, et le cholestérol dans les proportions critiques (40).

I.1.4.6. Livraison nasale de l'insuline

L'administration par voie nasale de l'insuline a été étudiée. Elle dépend des vecteurs utilisés pour le transport de l'insuline. Schipper (41-42) a utilisé le diméthyl- β -cyclodextrine comme vecteur de la molécule d'insuline administrée par voie nasale chez les rats. Cette macromolécule présente une absorption efficace de l'insuline. Pillon (43) a étudié plusieurs formulations de l'insuline avec des alkylglycosides. Ces formulations ont été administrées aux rats sous forme de gouttes. Les résultats ont montré que l'addition d'une concentration extrêmement faible d'un agent tel que le tétradécylmaltoside peut efficacement abaisser le taux de glucose dans sang. Cependant, cette approche doit être améliorée en raison de l'irritation produite et les effets nuisibles sur la muqueuse nasale.

I.1.4.7. Systèmes polymériques gluco-sensitifs

Heller (31) a développé une membrane biodégradable de polyorthoester contenant la glucose-oxydase. La production de l'acide gluconique due à la réaction du glucose et de l'enzyme augmente la surface de l'érosion de la membrane ayant comme conséquence, un dégagement important d'insuline. Bien que l'efficacité du dégagement d'insuline des membranes de polymère sensibles au glucose ait été démontrée, la sensibilité du système est relativement faible, et fonctionne seulement pour des concentrations de glucose élevées et aux forces ioniques faibles (32). Seigel (33) a développé une pompe d'insuline en utilisant les hydrogels avec la glucose-oxydase immobilisée. La pompe fonctionne par la conversion directe de l'énergie chimique produite par la réaction enzymatique en force mécanique hydraulique. La pompe a un potentiel pour le dégagement rapide d'insuline en réponse aux changements des taux de glucose dans le sang mais elle ne répond seulement qu'au gradient de concentration et non pas à la concentration absolue en glucose.

En se basant sur la même réaction enzymatique, Kim et coll. (34) ont développé des liposomes sensibles au pH. La glucose-oxydase et l'insuline sont co-encapsulés dans le liposome. La déstabilisation de la membrane liposomique est déclenchée par l'acide gluconique résultant de la conversion du glucose par la glucose-oxydase. En conséquence, l'insuline est libérée des liposomes.

De cette revue des différents systèmes de libération d'insuline, on peut conclure que la plupart des approches proposées ont quelques imperfections et aucun système idéal n'a été établi. Cependant, la méthode conventionnelle par les injections sous-cutanées de l'insuline et l'utilisation des pompes externes dans certains cas, est toujours la seule méthode disponible

pour le traitement du diabète. Néanmoins, les recherches sont menées en vue d'améliorer les différentes méthodes présentées.

I.2. Les hydrogels ; préparations, propriétés et applications

Introduction

Les polymères ont été utilisés pour la première fois, dans le domaine biomédical en 1960, par des chercheurs de l'Institut National de Recherche des Maladies du Cœur et du Poumon I.N.R (U.S.A). Ils s'intéressaient à des matériaux polymériques biocompatibles, pouvant être utilisés dans la conception d'organes artificiels tel que le cœur et le poumon (44). Les plastiques ont été utilisés dans ce domaine, et il est naturel que la possibilité de son utilisation en contact permanent avec les tissus vivants pose un problème de biocompatibilité. D'autres polymères sont étudiés, la majorité sont imperméables au métabolites, dures, et peuvent causer des irritations mécaniques. De plus, ils doivent avoir une structure tridimensionnelle suffisamment réticulée pour limiter l'absorption (45). Les polymères réticulés les plus connus sont ; le caoutchouc de silicone, le polyuréthane, la cellulose, et les hydrogels (46,47). Ces derniers sont des composites polymériques avec une structure tridimensionnelle, pouvant gonfler dans l'eau et dans d'autres solvants convenables, ils retiennent une quantité d'eau, plus de 20% en poids (44,48). Cette propriété remarquable appelée "WATER CONTENT" leur confère un excellent comportement de biocompatibilité (46). Les hydrogels de synthèse les plus connus sont: les polyacrylamides, les Polyméthacrylamides, les Poly(vinyl-alcool), les Poly(éthylène-co-venylacetate), les Poly(N-vinyl pyrrolidone), et les Poly(hydroxyalkyl méthacrylate). A l'équilibre d'hydratation la fraction d'eau retenue peut dépasser les 90% en poids (46,48).

I.2.1. Préparation des hydrogels sensibles au pH

Dans le tableau A.1 sont présentés quelques monomères utilisés dans la préparation des hydrogels sensibles au pH. Les propriétés physico-chimiques dépendent de la composition et la nature des monomères (47).

Tableau A.1 : Quelques monomères utilisés dans la préparation des hydrogels
Sensibles au pH.

Type	monomère	groupes sensibles au pH
acides	-Acide acrylique -acide methacrilique -sulfoxyethyl methacrylate -styrène sulfonate de sodium	-COOH -SO ₃ H -SO ₃ -Na ⁺
Basiques	-amino éthyl méthacrylate -N,N-diméthyl amino éthyl méthacrylate -N,N-diéthyl amino éthyl méthacrylate -vinyl benzyl triméthyl ammonium chloride -vinyl pyridine	-NH ₂ -N(CH ₃) ₂ -N(CH ₂ CH ₃) ₂ -N(CH ₃) ₃ ⁺ , Cl ⁻ -C ₆ H ₄ N

C'est en 1969 que WICHTERLE et LIM (55), ont montré pour la première fois, l'intérêt des hydrogels pour des applications biomédicales. Ces polymères sont préparés en solution aqueuse, en présence d'un agent de réticulation (49,50). Une description de la synthèse et des propriétés des hydrogels polyhydroxyéthyl méthacrylate PHEMA a été donnée par REFOJO (51). Les agents de réticulation les plus utilisés sont ; l'ester diméthacrylate, l'éthylène glycol diméthacrylate (EGDMA), le di-éthylèneglycol diméthacrylate (DEGDMA), et le tétraéthylène glycol diméthacrylate (TEGDMA). Ce dernier est le plus utilisé comme agent de réticulation puisqu'il est le plus hydrophile. Dans la polymérisation, les radicaux libres sont souvent générés par des sources de radiations ionisantes, ou les radiations U.V. Il existe d'autres initiateurs tel que l'azobisisobutyronitrile (AIBN), le persulfate d'ammonium (50), le peroxyde de benzoyle (51), et le percarbonate isopropyl (52).

1.2.2. Propriétés physiques et chimiques des hydrogels

Le poly(hydroxyéthyl méthacrylate) (PHEMA) est biocompatible. Il présente un haut degré de stabilité chimique et d'intégrité mécanique. Ces propriétés sont particulièrement avantageuses pour les applications biomédicales. Les gels de PHEMA montrent une résistance très importante à l'hydrolyse acide, alcaline et aux réactions avec les amines. Les propriétés mécaniques du PHEMA ont suscité un intérêt particulier. Une synthèse des travaux concernant le comportement viscoélastique du PHEMA a été effectuée par JANACEK qui résume le comportement de l'équilibre de déformation et les propriétés finales du réseau polymérique. Les propriétés physiques et chimiques des hydrogels sont facilement modifiées en incorporant différents monomères dans le système (56). Un changement dans le tronc polymérique peut altérer sa résistance mécanique ; par exemple le remplacement du groupement acrylate par le groupement méthacrylate (57).

II.2.2.1 Gonflement

Tous les hydrogels gonflent suivant une sensibilité au pH. Les hydrogels ionisés présentent souvent un degré de gonflement important. Dans le Tableau A.2 sont présentés les degrés de gonflement à l'équilibre de quelques polymères purs (54). La dissociation des groupes acides ou basiques dans le gel et la diffusion des ions de signes opposés du milieu augmentent la concentration des ions à l'intérieur du gel (53,58). Cette augmentation de la concentration ionique donne naissance à un flux d'eau dans le gel par phénomène d'osmose. L'hydrogel gonfle jusqu'au point d'équilibre décrit par Donnan (53).

Tableau A.2 : Degrés de gonflement à l'équilibre de quelques polymères purs

monomères	Le degré de gonflement (%)
Methyl méthacrylate(MMA)	2,1
Hexanediol méthacrylate (HDMM)	13,5
2-Hydroxyéthyl méthacrylate (HEMA)	40,0
2-Hydroxyéthyl acrylate(HEA)	45,9
Acrylamide (AAM)	84,8
N-Vinyl-2-pyrrolidone(NVP)	93,7
Polyéthylèneglycol-diméthacrylate (nG)	2,5 (n=2)
	4,5 (n=3)
	10,0 (n=4)
	33,0 (n=9)
	45,0 (n=14)

II.2.2.2. Facteurs qui influent sur le gonflement

Les principaux facteurs qui influent sur le gonflement du gel polyélectrolytes sont: la charge de monomère ionisable, le pKa du monomère ionique, le degré d'ionisation, la concentration de monomère ionisable, la densité de réticulation, l'hydrophilicité et l'hydrophobicité du tronc du polymère, le pH, la force ionique, la présence d'un Co-ion, l'ion de charge opposée, et l'équilibre de l'ion opposé

Les différents effets sont les suivants :

- dans un milieu acide: un pH élevé donne une ionisation élevée
- dans un milieu basique, un pH élevé donne une ionisation faible.
- une ionisation élevée donne un gonflement élevé.
- une concentration élevée donne un gonflement dans l'état ionisé élevé.
- une densité de réticulation élevée donne un gonflement faible
- un caractère hydrophile élevé donne un gonflement élevé.

a) Effet de la charge monomérique

Les hydrogels sensibles au pH contiennent des groupes acides ou basiques comme les acides carboxyliques, les amines primaires, l'acide sulfoniques et les sels d'ammonium quaternaires qui changent d'état d'ionisation avec le pH. Ainsi, les propriétés du gel en sont dépendantes. L'ionisation est réalisée quand le pH extérieur devient supérieur au pKa du fragment ionisable (53,58). La concentration de monomère ionisable dans l'hydrogel est importante pour le gonflement et donc pour la sensibilité au pH. Il a été montré que, lorsque la quantité de l'acide méthacrylique dans l'hydrogel Poly(acide-co-2-hydroxy éthyl méthacrylate) augmente, la dépendance de la résistance spécifique au pH augmente (53).

b) Effet de la force ionique

Une force ionique élevée de la solution limite le gonflement (59,60) en raison de la concentration élevée de l'ion opposé (53). Quand la concentration des ions à l'extérieur du gel augmente, la concentration des ions à l'intérieur augmente aussi jusqu'à l'équilibre, la pression osmotique à l'intérieur du gel diminue (60). A un pH inférieur au pKa du monomère ionisable, le gel est souvent dans un état non-ionisé. Par contre, à un pH supérieur au pKa, la force ionique augmente et le degré d'absorption d'eau dynamique est faible car le gradient de concentration des ions mobiles entre le gel et la solution sera réduit et le gonflement du gel diminue (53).

c) Effet de la composition du tampon

Dans une solution tampon, les ions opposés multivalents capables de neutraliser plusieurs charges à l'intérieur du gel diminuent le gonflement. Donc, la concentration de l'ion opposé multivalent à l'intérieur du gel sera inférieure à celle des ions monovalents. La pression osmotique et le degré de gonflement du gel diminuent (53). Il a été montré que l'absorption d'eau est élevée dans un tampon acétate contenant un acide monobasique que dans le tampon glutarate contenant un acide dibasique (58). L'ion acétate transporte une seule charge négative, par contre l'ion glutarate transporte deux charges. La concentration de l'ion acétate dans le gel est plus grande que celle de l'ion glutarate pour la même concentration de l'ion opposé. Ainsi l'ion acétate crée une pression osmotique donnant un gonflement élevé. Le type de tampon n'est pas important pour une force ionique élevée qui est le paramètre déterminant du gonflement (53).

d) Effet des ions

La nature de l'ion opposé est très importante pour l'équilibre de gonflement même s'ils ont la même valence. Certains ions déstabilisent la structure de l'eau donc augmente le gonflement. Par contre, d'autres la stabilisent (58, 60, 61). Il a été montré que le gonflement de poly (méthyl méthacrylate-co-N,N diméthylaminoéthyl méthacrylate) est plus élevé en présence de Cl^- que SCN^- (62). Aussi le gonflement de poly(2-hydroxyéthyl méthacrylate) augmente en présence d'urée (62) car elle brise la structure moléculaire de l'eau en diminuant les interactions hydrophobiques (62). Récemment, Ratner et Miller ont prouvé que l'effet de l'urée sur le degré de gonflement est dû à l'interaction de l'urée avec des régions dans le gel qui contient des liaisons hydrogènes (53). L'urée peut briser le pont d'hydrogène dans la couche d'eau limite en diminuant la cohésion de l'hydrogel et en augmentant la dilatation de réseau (63). Cependant Refojo (51) a établi que le gonflement de poly(2-hydroxyéthyl méthacrylate) neutre diminue en présence de quelques électrolytes tel que les ions chlorures et augmente en présence d'autres ions comme le thiocyanate. La diminution du gonflement est expliquée par l'effet de relargage d'ions provenant de ces électrolytes en diminuant la solubilité des segments de polymères. Dans le cas du thiocyanate, l'effet est contraire au phénomène précédent. La solubilité du segment de polymère augmente et le gonflement augmente. Il a été montré aussi que la perméabilité pour MgSO_4 est plus faible que celle pour NaCl dans la membrane ampholitique à cause du gêne stérique.

e) Effet de la densité de réticulation

Le degré de gonflement ou taux d'hydratation des gels homogènes de PHEMA dans l'eau varie en fonction de degré de réticulation, alors qu'il est stable dans une solution d'urée. Ceci peut s'expliquer par l'existence d'une structure secondaire d'un réseau non covalent. Il a été montré que cette structure, superposée sur le réseau covalent, est constituée de ponts hydrogènes entre les groupes hydroxyles et carboxyles dans l'environnement hydrophobique (63). L'augmentation du degré de réticulation réduit le gonflement (64). L'effet de densité de réticulation est plus important à un pH élevé qu'à un pH bas dans le poly (méthacrylique-co-2-hydroxyéthyl méthacrylate). ANDERSON et Coll. (64) ont étudié le PHEMA réticulé avec des concentrations différentes de dichromate d'ammonium photosensible. Ces polymères sont trempés dans une solution de succinate de sodium d'hydrocortisone sur des plaques en verre. Le gonflement de ces films coupés en disques, est étudié in vivo en fonction du degré de réticulation. En 24 heures, le PHEMA sans agent de réticulation, libère 75% de sa charge

initiale, les disques réticulés à 5% libèrent 30% des stéroïdes, et les disques réticulés à 10% libèrent 15% des stéroïdes. Le PHEMA sans réticulation libèrent 90% en 48 heures (65).

f) L'effet d'hydrophilicité / hydrophobicité

Un hydrogel hydrophile présente un degré de gonflement élevé. Siegel (33) a montré que le n-alkyl méthacrylate étant le plus hydrophobe, diminue la sensibilité de poly (n-alkyl méthacrylate-co-N-N-diméthylaminoéthyl méthacrylate) au pH. Les réseaux polymériques deviennent plus hydrophiles quand le degré d'ionisation augmente. Un changement peut altérer l'effet hydrophile ou hydrophobe du polymère, par exemple la substitution du 2-hydroxyéthyl-méthacrylate (HEMA) par l'acide méthacrylique (46,54).

I.2.3. Dynamique de gonflement

La cinétique du gonflement d'un réseau ionique est décrite par l'équilibre de DONNAN pour les échanges d'ion et les interactions ioniques. Ces facteurs sont très importants dans le développement de systèmes de libération contrôlée de médicament qui seront en contact avec les fluides biologiques ayant différentes espèces ioniques (58). Le gonflement du réseau de l'hydrogel dépend de la nature du fluide biologique, le coefficient de diffusion de soluté incorporé à l'intérieur de réseau est déterminé (68,69). Le gonflement des hydrogels ioniques peut être décrit en terme de pression osmotique d'ion. Pour un réseau de polymère faiblement chargé dans une solution électrolytique diluée, la pression est donnée par :

$$\Pi_{\text{ion}} = RT \sum (C_i - C_i^*) \quad (1)$$

où Π_{ion} : est la pression de gonflement osmotique,

et C_i et C_i^* : la concentration de l'ion opposé à l'intérieur et à l'extérieur de gel, respectivement, R la constante des gaz et T la température absolue

La cinétique de gonflement pour les hydrogels cationiques, en fonction du pH, de la force ionique et de la composition d'électrolyte a fait l'objet d'une étude (58). Les hydrogels cationiques peuvent être utilisés dans le développement de systèmes de libération contrôlée de médicament et dans la préparation de membranes pour les processus de séparation. L'application des membranes polymériques pour un rein artificiel est parmi les plus importantes. Par la diffusion sélective, la membrane polymérique peut chasser l'urée du sang dans le cas où le rein est endommagé. La diffusion des espèces à travers une membrane polymérique suit la diffusion libre selon la loi de FICK (66):

$$J = -D \frac{dC}{dL} = -D \frac{C_1 - C_2}{L} \quad (2)$$

J=flux de diffusion,

D: coefficient de diffusion,

C1 et C2 sont respectivement les concentrations des molécules dissoutes à l'intérieur et à l'extérieur du polymère,

L: l'épaisseur de la membrane.

L'équation de diffusion de FICK peut être modifiée (67) en tenant compte de l'hydratation à l'équilibre. L'équation suivante est obtenue expérimentalement (54,58,59):

$$\frac{M_t}{M_\infty} = K t^n \quad (3)$$

Où M_t : est la masse d'eau absorbée à chaque instant
et M_∞ la quantité d'eau absorbée à l'équilibre.

K, n sont des constantes. La valeur de n est calculée à partir d'une statistique non linéaire. Elle varie de 0,5 à 1

I.2.4. Perméabilité

Les molécules à poids moléculaires faibles, diffusent à travers les pores de l'hydrogel par deux processus appelés "mécanisme-pore" et de "partage". La diffusion dépend de la nature du polymère (hydrophile ou hydrophobe) et de la dimension et de la nature du soluté. Une molécule ayant une charge opposée à celle de l'hydrogel agit comme un ion opposé. La libération du médicament se fait par échanges des ions. Une molécule possédant la même charge que l'hydrogel présente une perméabilité faible due aux répulsions de charges. Dans le cas d'une membrane neutre, la perméabilité dépend essentiellement de la densité de réticulation. Lorsque cette dernière est importante, les dimensions des pores sont faibles et par suite le gonflement sera faible, et inversement. Par contre, dans les membranes ionisées, les interactions de charges jouent un rôle plus important que celui de la densité de réticulation. La perméabilité d'une membrane ampholitique augmente avec la densité de charge. La perméabilité aux solutés, à poids moléculaires élevés, dépend des dimensions des pores et du pH de la solution. Par contre la perméabilité aux solutés, à poids moléculaires faibles, dépend uniquement des dimensions des pores (67).

I.2.5. Bioadhésion

Les hydrogels possèdent une aptitude d'adhésion sur les membranes biologiques. Les polymères anioniques possèdent les meilleures propriétés de bioadhésion.

I.2.6. Diffusion

Dans un hydrogel à l'équilibre de gonflement, l'eau se trouve sous trois états différents: (i) Les fractions d'eau limites sont fortement associées aux segments de l'hydrogel par hydratation des groupes hydrophiliques. (ii) L'eau interfaciale est probablement associée avec l'interaction hydrophobique. (iii) L'eau globale permet aux solutés hydrophiliques de diffuser dans l'hydrogel par le mécanisme de pore. Si les pores ont un diamètre faible, les solutés diffusent par le mécanisme de partage à travers les fractions d'eau limite et interfaciale (68).

I.2.7. Biocompatibilité

Très souvent le terme technique biocompatibilité est utilisé en synonyme de "non toxicité" (69). L'hydrogel peut se dégrader dans le corps et s'éliminer par la suite (53). Il s'agit donc de polymère biocompatible. S'il résiste à l'attaque par le système de défense du corps et il est antithrombogénique (44,72). Lorsque le sang est en contact avec la surface étrangère, la coagulation se produit, suivie par la formation de thrombus (71). Les matériaux antithrombogéniques qui ne génèrent pas les grumeaux de sang, intéressent beaucoup les chercheurs. Le polyuréthane segmenté (élastomère alternatif) et quelques hydrogels sont utilisés en pratique médicale (72). La coagulation et les thromboses sont induites par les facteurs coagulants intrinsèques dans le sang après l'adhésion des plaques sur la surface étrangère. Cette réaction est affectée non seulement par les propriétés de surface mais aussi par des protéines de sérum adsorbées sur cette surface (44). L'effet respectif des protéines principales de sérum comme l'albumine, la globuline, et le fibrinogène ont été clarifiés. Cependant, des controverses se posent au sujet du comportement de la protéine individuelle du sérum, quand elle est en contact avec la surface étrangère (71). C'est à cause de la nature extrêmement différente dans la taille et le nombre de composants du sang global suivi par des interactions multiples, HOFFMAN et coll. ont polymérisé des monomères sur des films, des tubes et des noyaux de polyéthylène (PE) et/ou de caoutchouc de silicone par l'irradiation gamma. Les copolymères greffés d'HEMA avec plusieurs monomère hydrophobiques, l'éthyle méthacrylate (EMA), sont préparés pour classer les effets de l'équilibre entre l'hydrophilicité et l'hydrophobicité (73). In vivo l'antithrombogénicité est évaluée par un test

de (Vena Cava) montrant que le PHEMA hydrophilique a la capacité de supprimer la coagulation (grumeau) du sang, quand il est comparé avec le PHEMA hydrophobique. Le copolymère l'HEMA-EMA présente une thrombogénicité supérieure à celle du PHEMA. L'équilibre entre l'hydrophilicité et l'hydrophobicité de polymère joue un rôle important dans l'antithrombogenicité. La surface d'un hydrogel fortement hydraté n'est pas thromborésistante mais elle est thrombogénique et non thromboadhérente (72).

I.3. Application des hydrogels comme biomatériaux

Les hydrogels sont utilisés dans la conception d'organes, de parties d'organes ou de tissus artificiels tels que le rein, le poumon, la cornée, la peau, et le pancréas.

I.3.1. Rein artificiel

La partie principale du rein artificiel utilisée actuellement est la membrane polymérique semi-perméable utilisée en hémodialyse. La membrane d'hémodialyse élimine une grande partie de β -microglobuline pathogène. Cette protéine a un poids moléculaire de 11.800 Daltons. Cette membrane possède des pores ayant des diamètres importants. Elle est appelée membrane à rendement élevé. Parmi les problèmes de l'hémodialyse, l'incompatibilité des membranes celluloseuses utilisées et leur caractère activateur du système d'autodéfense de l'organisme contre l'attaque des corps étrangers. La leucopénie momentanée apparaît remarquablement après une demi-heure de traitement d'hémodialyse. Pour pallier à cet inconvénient, une modification a été apportée à la surface de la cellulose en couplant des polymères, sans altérer les propriétés de perméabilité de la membrane. Le polymère utilisé pour cette modification est le Poly(EthylèneGlycol) PEG associé à un groupe carboxylique terminal passant d'une estérification entre le groupe carboxyle et le groupe hydroxyle sur la surface de la membrane de cellulose. La chaîne de PEG est greffée sur la surface de la membrane pour éviter l'interaction directe des protéines de complément avec la membrane. Quand la longueur et la densité de la chaîne de PEG sont élevées, l'interaction entre la cellulose et les protéines du plasma est réduite. La réduction remarquable dans l'adsorption des protéines sur la membrane, durant l'hémodialyse, implique que la formation de thrombus sur la surface de membrane est aussi supprimée par rapport à la surface de cellulose non modifiée.

I.3.2. Poumon artificiel

Le poumon artificiel est un appareil médical utilisé pour l'élimination du CO_2 et l'enrichissement du sang en O_2 . Cette opération est dite Oxygénation de Membrane

ExtraCorporelle (ECMO). Deux types de membranes sont couramment utilisés; les membranes poreuses et non poreuses. Le premier type, sont des membranes de polypropylène ayant un temps de vie très court à cause de la fuite du sérum à travers les pores après l'adsorption de protéine. Le deuxième type, est constitué de silicone, mais sa surface est peu compatible avec le sang. Pour éviter la coagulation du sang, l'héparine est utilisée durant le traitement. Pour améliorer la compatibilité avec le sang, la surface de fibre de silicone creuse est modifiée. La membrane de silicone n'a pas de groupes fonctionnels pour un éventuel couplage de polymère. La technique utilisée consiste à exposer le support de polymère à un milieu d'oxydation pour générer le peroxyde sur la surface (initiateur de polymérisation). Le greffage de l'acrylamide a réduit l'adsorption de protéines et l'adhésion des plaques.

I.3.3. Cornée artificielle

Quand le tissu cornélien de l'œil est partiellement ou totalement endommagé, la transplantation est indiquée. Cependant, les donneurs des yeux sont très rares. De nombreuses études ont été réalisées pour développer les cornées artificielles. Le poly(méthyl-méthacrylate) et le polysulfone ont été essayé mais ils ne donnent pas de bons résultats avec le temps. Deux types de cornées préparées à base de Poly(Vinyl Acrylate) PVA à travers laquelle l'eau, l'oxygène et les autres nutriments pour la cellule cornéenne peuvent pénétrer. Une autre exigence importante est la bioadhésion aux tissus cornéliens. Le PVA ayant un degré d'hydratation élevé, présente une faible bioadhésion. Elle est améliorée par le greffage de molécules de collagène.

I.3.4. Peau artificielle

La peau est l'organe vivant le plus large. Quand la peau est endommagée sur une grande surface, la dissipation de l'eau par le corps et l'invasion de bactéries doit être évitée. Pour cela, la couverture de blessures par une peau artificielle est employée cliniquement pour la protéger de l'environnement extérieur en agissant tout simplement comme une barrière mécanique. Les matériaux utilisés pour couvrir les blessures et régénérer les tissus sont la silicone, le polyuréthane, collagène régénéré, peau (porcine) modifiée et la chitine régénérée. La peau artificielle est largement étudiée. Elle est composée de collagène régénéré avec ou sans cellules de peauensemencées. Souvent, une feuille de collagène poreux est utilisée car elle fournit un très bon support pour la croissance des cellules, puisque le collagène a des coordinations pour les récepteurs fibreux. Les feuilles composées de collagène-glycosaminoglycane poreux recouvert d'une membrane de silicone sont très efficaces dans la régénération de la peau profondément endommagée. Cette membrane artificielle sert de

support aux cellules pour reconstruire une nouvelle membrane de tissus vivants. Elle est biodégradable par l'action enzymatique. Le résultat des essais cliniques est encourageant.

I.3.5. Pancréas artificiel

Le pancréas est l'organe métabolique interne qui sécrète l'insuline et le glucagon en réponse à la concentration de glucose dans le sang. Deux types de pancréas artificiels sont étudiés. Le premier est le pancréas mécanique composé d'un récepteur de glucose, d'une pompe d'injection d'insuline et d'une unité de contrôle. L'autre est appelé pancréas artificiel biologique, hybride composé d'îlots de langerhens et d'une membrane artificielle. Il est implanté dans le corps, les îlots de langerhens provenant d'autres espèces seront sévèrement attaqués par le système immunitaire.

I.3.6. En analytique et diagnostique

Parmi les avantages de l'utilisation des biomolécules immobilisées particulièrement les enzymes et les anticorps, pour l'analyse chimique citons leur spécificité au substrat et leur grande stabilité (conservation thermique et opérationnelle) et la réutilisation des espèces immobilisées.

I.3.7. Application industrielle

Les biomolécules et les cellules immobilisées sur et à l'intérieur des hydrogels peuvent être utilisées dans les réactions de synthèse ; en bioénergie (éthanol, hydrogène, et méthane), d'acides organiques, d'acides aminés, et de médicaments (58). Les microsoutports d'hydrogels en suspension ou dans des couches chargées constituent une nouvelle méthode pour la culture des cellules. Ces dernières se relient et croissent comme des monocouches sur la surface des particules ou peuvent être piégées dans un hydrogel global ou dans une membrane d'hydrogel.

I.4. Revue bibliographique

-BUDDY D. RATNER et coll. (1972) ont étudié l'interaction de poly (HEMA) avec une solution d'urée par plusieurs techniques. Les résultats obtenus indiquent que le comportement de gonflement anormal du poly(HEMA) en présence d'une solution d'urée diluée n'est pas dû à la destruction de la structure secondaire de la liaison hydrophobique. La solution d'urée diluée n'a aucun effet sur une telle liaison. Un modèle a été proposé en tenant compte de l'interaction d'urée avec la structure secondaire composée de liaison hydrogènes des groupes hydroxyles, stabilisée par l'élimination des molécules d'eau (63).

-YOSHIHIRO ITO et coll. (1989) ont préparé des membranes de film de cellulose poreux avec une surface greffée de Poly (acide acrylique) sensible au pH. Cette membrane à GOD immobilisée a une réponse spécifique au changement de la concentration de glucose (75).

-W.E ROORDA et coll. (1989) ont étudié l'influence de quelques facteurs (ion, concentration de soluté, concentration de réticulant) sur le gonflement de l'hydrogel PHEMA. Les anions (Cl^- , ClO_4^- , ...) et les solutés non ioniques (urée, ...) augmentent le gonflement. Le phénomène inverse est observé avec l'augmentation de la concentration de réticulant (61).

-S. LORA et coll. (1990) ont greffé le NVP sur des films de poly-bis-trifluoroéthoxy-phosphazène et le poly-bis-phénoxy-phosphazène par irradiation directe à 20°C, en utilisant différents mélanges de monomères et de méthanol. La cinétique de la réaction de greffage a été suivie. La biocompatibilité du polymère obtenu a été testé "in vivo" (76).

-F.M. VERONESE et coll. (1990) ont piégé le narciclasine (un médicament anti-cancer) dans une matrice de PHEMA préparée par polymérisation chimique en utilisant l'AIBN comme initiateur de réaction et par radio-polymérisation en utilisant les rayons GAMMA. L'effet du gonflement sur la cinétique de libération de médicament est étudié (77).

-MARIO CARENZA et coll. (1993) ont étudié la libération contrôlée des peptides et protéines par l'hydrogel PHEMA radiopolymérisé à basse température. La libération des protéines augmente lorsque le poids moléculaire est élevé (78).

-MARIAN. F et coll.(1993) ont étudié le gonflement d'une membrane polymérique préparée à partir d'un copolymère de PAAm et DMAEMA légèrement réticulé avec le N,N' bis-acrylamide utilisée comme support pour l'immobilisation de la GOD et comme biorécepteur de glucose. Le gonflement varie inversement avec le pH (79).

-C. P. QUINN et coll. (mars 1995), ont étudié la biocompatibilité des biorécepteurs aux copolymères de PHEMA, PEG, tétra-acrylate, éthylène diméthacrylate et 2,2 diméthoxy-2 phényl. Ces films sont implantés dans les tissus sous cutanés. Ces copolymères présentent une bonne biocompatibilité (80).

-LANRENCE. KESSLER et coll. (1995) ont encapsulé les îlots pancréatiques dans des membranes AN69 (69% acrylonitrile et 31% de sodium méthallyle sulfonate) et ils ont étudié la biocompatibilité de ces membrane et la diffusion de l'insuline. Ces membranes traitées et enveloppées de protéine ont une diffusion convenable et une bonne biocompatibilité après une implantation péritonéale (81).

-JIRI. HORIGER et coll. (1995) ont étudié le gonflement et la biocompatibilité de membranes à fibre creux obtenues par inversion de phase d'une solution de copolymère AN69 (Polyacrylonitrile-sodium méthallyl sulfonate), diméthylsulfoxyde et une solution physiologique salée. Les hépatocytes de rats sont encapsulés dans ces membranes. Ces membranes présentent un degré de gonflement élevé et une bonne biocompatibilité après transplantation dans le péritoine (65).

- ATUL. R. KHARE et coll. (1995) ont étudié la dynamique de gonflement à l'équilibre d'un réseau polymérique; le poly(2-hydroxy-éthyle-méthacrylate-co-acide méthacrylique) et le poly(2-hydroxy-éthyle-méthacrylate-co-acide acrylique); sec et vitreux, en fonction du pH, de la force ionique, de la nature d'ion opposé, et la composition de tampon. Le mécanisme de diffusion d'eau dans le gel est perturbé quand le pH de milieu augmente et quand la force ionique diminue à un pH constant, supérieur ou égal au pKa du gel (58).

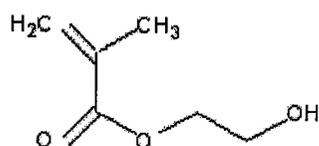
-KRISTI. S. ANSETH et coll. (1996) ont montré que les propriétés mécaniques sont très dépendants de la structure du polymère, particulièrement de la densité de réticulation et du degré de gonflement. Les propriétés mécaniques des hydrogels dépendent des conditions de polymérisation (temps de réaction, température, type et quantité de solvant) (57).

I.5. Polymérisation des hydrogels par les radiations ionisantes gamma du ^{60}Co à basse température

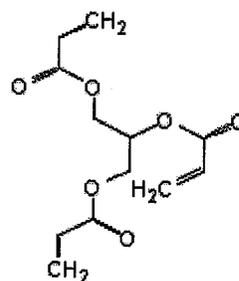
Plusieurs monomères vinyliques sont utilisés dans la synthèse des hydrogels. La composition varie en fonction des propriétés physico-chimiques (82). Le choix d'un initiateur convenable dépend du monomère et du solvant utilisés. La radiopolymérisation ne nécessite pas de catalyseurs chimiques et peut être utilisée pour tous les monomères. Les sources généralement utilisées sont le Cobalt 60 et le Césium 137, et l'accélérateur d'électrons (83). La polymérisation suit un mécanisme radicalaire. Il s'agit d'une réaction en chaîne qui comprend trois étapes bien caractérisées. Un schéma du mécanisme réactionnel de la polymérisation de l'hydroxyéthyl méthacrylate HEMA en présence d'un agent réticulant, le triméthylolpropane triméthacrylate TMPTMA, a été proposé par Peppas (84).

-M1 est la molécule de monomère (HEMA).

-R est la molécule de l'agent réticulant (TMPTMA).



et



M1

R

-P_{p,q,r} représente la chaîne de polymère avec les regroupements terminaux monométhacryliques.

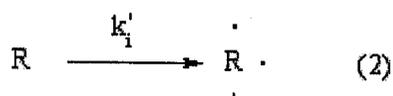
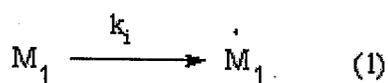
-M_{p,q,r} est la chaîne de polymère qui a disparu.

-Les indices p,q,r utilisés pour décrire la chaîne primaire, représentent respectivement le nombre de groupements monométhacryliques, de groupements méthacryliques et le nombre de réticulations par chaîne.

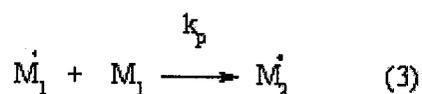
-k_i, k_p et k_t sont les constantes de vitesse respectivement d'initiation, de propagation et de terminaison.

Le mécanisme s'effectue en trois étapes :

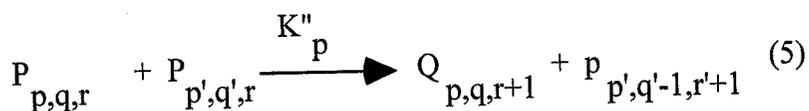
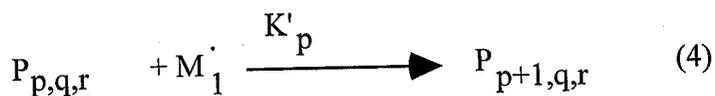
La première étape est celle de l'initiation:



La molécule du monomère M et de l'agent réticulant R sont transformées par le rayonnement ionisant en radicaux libres. Le radical M réagit avec une molécule de monomère en ouvrant la double liaison.

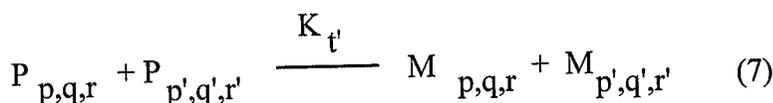
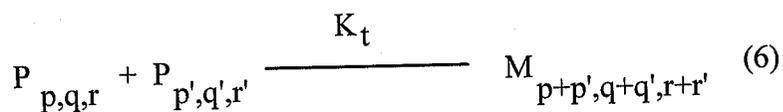


La deuxième étape celle de la propagation et de la réticulation:

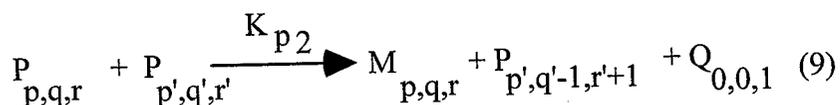
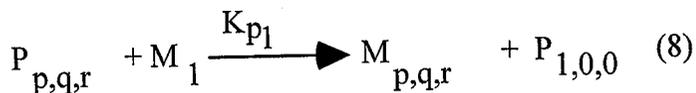


Le produit d'addition M_2 de la réaction constitue un nouveau radical libre qui se lie à une autre molécule de monomère et ainsi de suite. Il peut s'associer à une autre chaîne radicalaire par une liaison tête-à-queue, la longueur de la chaîne M_n augmente (ou n est le nombre de molécules mères), ou trois chaînes radicalaires peuvent se lier à une molécule d'agent réticulant pour donner une forme réticulée.

La troisième étape est celle des réactions de terminaison des chaînes cinétiques, par recombinaison des radicaux:



Il existe une autre réaction des radicaux $P_{p,q,r}$ dite de transfert de chaîne qui entre en compétition avec les réactions de propagation et de terminaison:



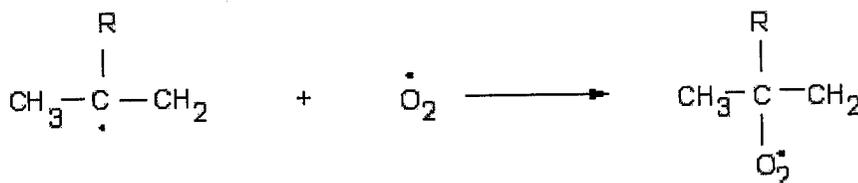
En effet le radical $P_{p,q,r}$ est capable de réagir avec une molécule stable en lui arrachant un atome de manière à donner une molécule de polymère et un radical $P_{1,0,0}$. Ce radical peut à

son tour additionner une molécule de monomère et amorcer une nouvelle chaîne de polymérisation.

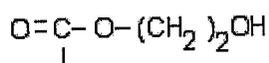
Les réactions de terminaison n'exigent pas d'énergie d'activation et sont donc à priori rapides. La situation change, toutefois, quand le milieu devient visqueux, c'est-à-dire lorsque la vitesse de diffusion du monomère devient le facteur déterminant dans ces réactions. C'est l'effet de gel.

La présence de l'oxygène lors de la radiopolymérisation est un facteur important. Le polymère, au lieu de former une structure réticulée, comme prévue, se dégrade. Cette dégradation peut être expliquée par la formation de liaisons peroxydiques. Ces liaisons sont faibles. Elles se décomposent et impliquent une dégradation des chaînes polymériques selon le mécanisme suivant:

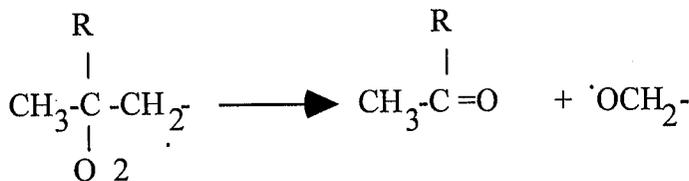
a) Réaction avec l'oxygène



où R est le groupement



Décomposition et réarrangement



b) Effet de la température d'irradiation sur la réaction de polymérisation

L'énergie d'activation globale de la réaction de polymérisation est donnée par l'équation suivante:

$$E_g = \frac{1}{2} E_a + E_p - E_t \quad (1)$$

Où E_a est l'énergie d'activation, E_p est l'énergie de propagation et E_t est l'énergie de terminaison.

Dans le cas de l'amorçage par le rayonnement ionisant, l'énergie d'activation est presque nulle. Pour cette raison la radiopolymérisation des hydrogels peut être effectuée à basse température. Le diagramme de phase du système binaire eau/HEMA a été étudié (Figure.A.1) par Yoshida (1980). Ce diagramme est caractérisé par les différentes phases suivantes:

Phase I : liquide.

Phase II solide A + liquide B où A : eau et B : HEMA

La courbe (1) de ce diagramme représente les températures de début de congélation, la courbe (2) les températures de fin de congélation. La courbe (3) représente les températures de la transition du solide B d'un état semi-visqueux à un état vitreux. C'est la température de la transition vitreuse.

Ce diagramme nous montre que pour les températures comprises entre -24 et -100 °C, l'eau est à l'état solide sous forme de petites particules de glace en suspension dans le monomère HEMA surrefroidi. Ce monomère est à l'état semi-visqueux. L'irradiation de ce système, dans ces conditions, donne une polymérisation en masse (Figure A.2). L'hydrogel peut être obtenu sous différentes formes, films, membranes, baguettes, particules, ou en émulsion (85).

Température °C

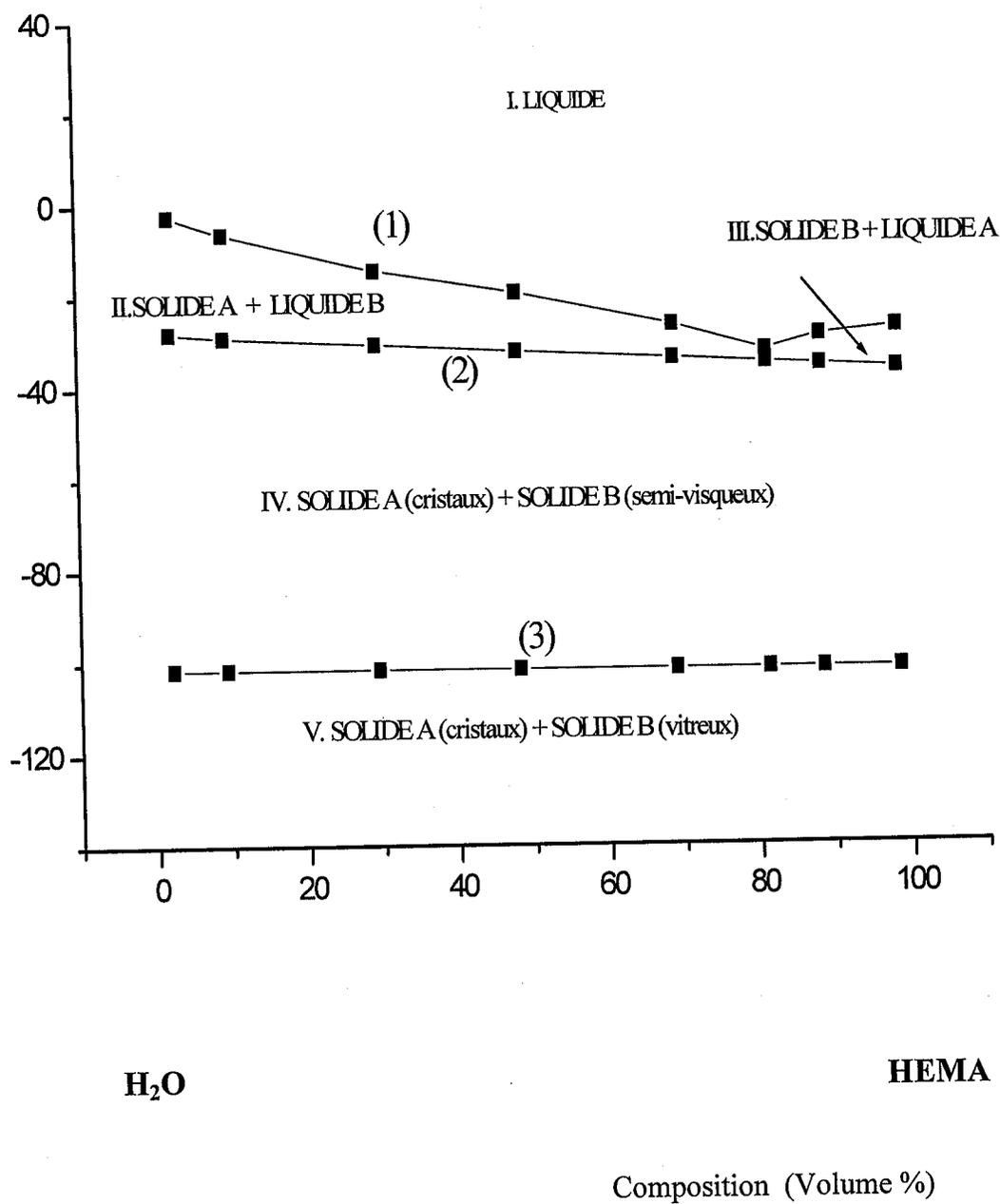


Figure A.1 : Diagramme de phase du système binaire HEMA (B)/ H₂O (A)

M. Yoshida., J.A.E.R.M, 8766 (1980) 110.

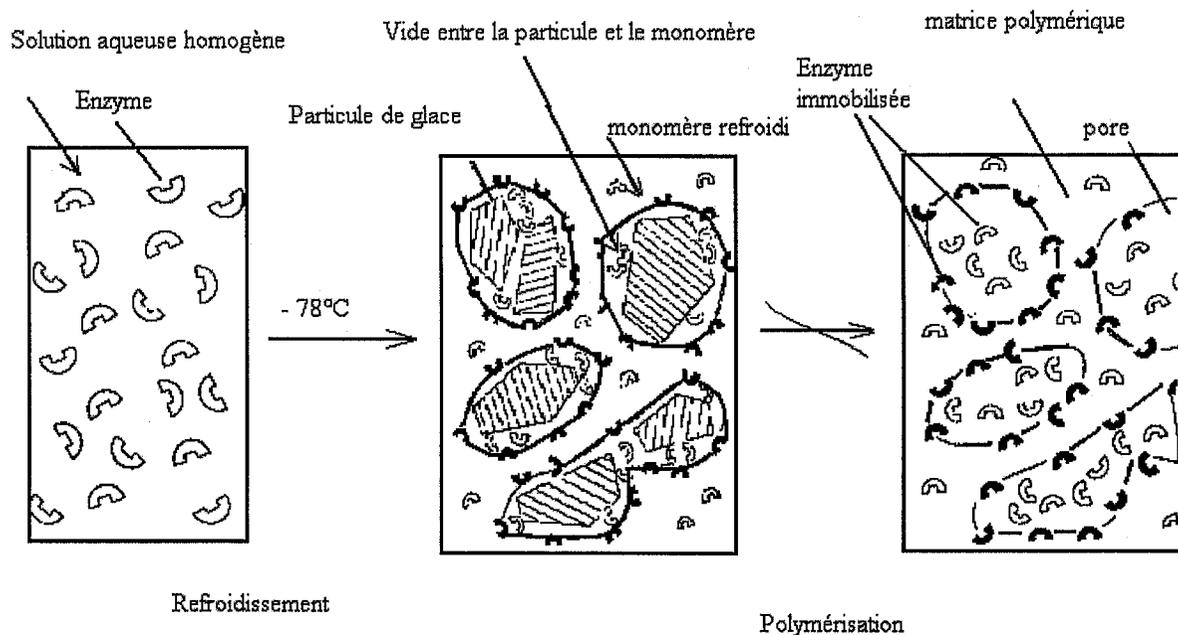


Figure A.2 : Schéma du mécanisme de la radiopolymérisation du mélange monomère/eau à basse température -78°C

Conclusion

Dans le présent travail, nous nous sommes intéressés à la polymérisation de l'hydroxyéthyl méthacrylate HEMA par les rayonnements ionisants gamma du Cobalt 60 à basse température. Cette technique présente les avantages suivants, (i) la pureté très élevée du produit obtenu, (ii) facilité de contrôle de la réaction de polymérisation, (iii) possibilité de minimiser l'inactivation de la molécule biologiquement active par l'utilisation des basses températures, (iv) possibilité d'obtenir plusieurs formes du polymère (film, membrane, bâtonnet, billes, particules, ...).

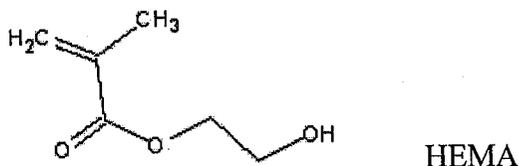
L'effet d'un agent de réticulation et de la concentration de stabilisant sera étudié.

CHAPITRE A.II. : Partie expérimentale

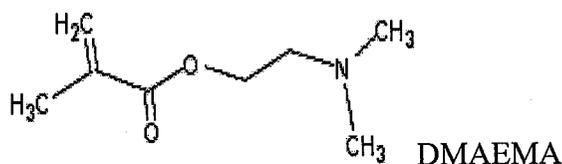
II.1 Produits

a) Monomères

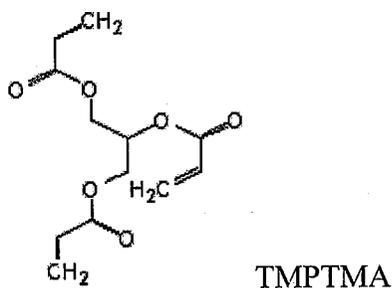
- 2-Hydroxyethylméthacrylate (HEMA) degré de pureté 97% provient de ALDRICH-CHIMIE, $\text{CH}_2\text{C}(\text{CH}_3)\text{-COO}-(\text{CH}_2)_2\text{-OH}$.



Diméthylaminoéthylméthacrylate (DMAEMA) provient de ALDRICH-CHIMIE $\text{CH}_2=\text{C}(\text{CH}_3)\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$.



- Triméthylolpropane triméthacrylate (TMPTMA) provient de ALDRICH-CHIMIE



Tous ces monomères ont été purifiés par distillation à 67°C sous une pression de 5 mm Hg et conservés à + 4°C.

b) Enzyme

Glucose-oxydase *Aspergillus NIGER* (δ -D-glucose : oxygène 1-oxidoréductase EC 1.1.3.4) type II provient de Sigma, 25000 Unité/mg (réaction saturée en oxygène).

c) Substrat

D(+) glucose provient de Fluka.

d) Solvants

Les solutions tampons ont été préparés au laboratoire : tampon acétate (pH=4) et (pH=5,5), tampon acide citrique + phosphate de sodium dibasique (pH=3), tampon sodium monobasique + phosphate de sodium dibasique, 0,12 % NaCl, 0,02 % Sodium azide, (pH=7.4), et tampon glycine NaOH (pH=10)

II.2. Méthodes utilisées

II.2.1. Préparation des polymères

Les mélanges des monomères et d'eau distillée sont introduits dans des tubes de verre (longueur de 9 mm de diamètre, et 7 cm de long). Les tubes sont fermés hermétiquement sous atmosphère de N₂ et refroidis à basse température -78°C (neige carbonique). Ils sont ensuite exposés aux rayons gamma du ⁶⁰Co à un débit de dose de 22 Gy/min (Figure A.3). Après irradiation, les matrices cylindrique de polymère sont récupérées et découpées en disques (2 ou 3 millimètres) et immergées pendant 24 heures à 4°C dans une solution tampon de phosphate afin d'éliminer les traces de monomères résiduels.

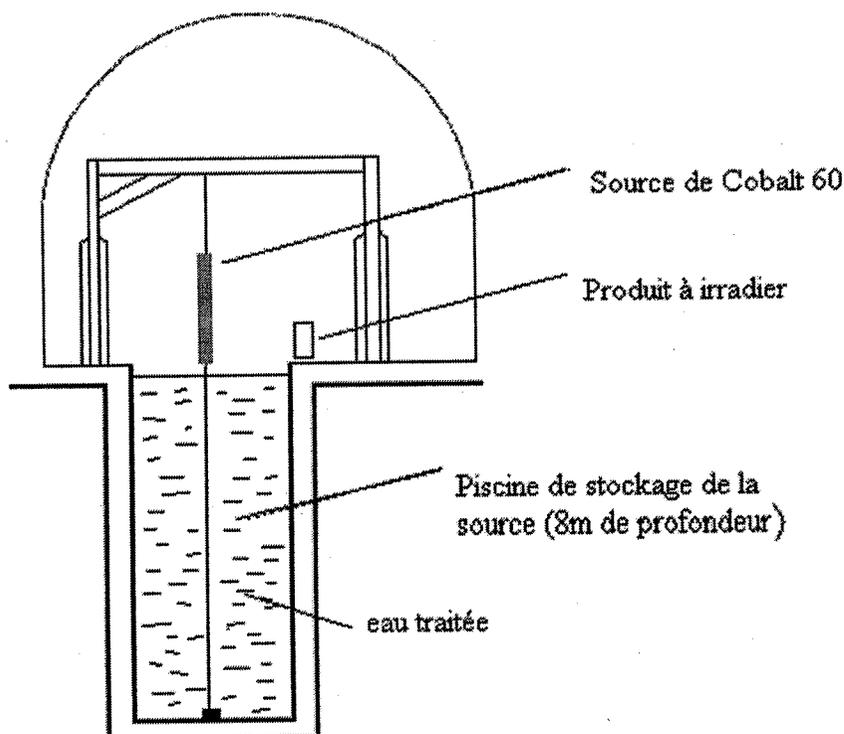


Figure A.3 : Schéma de la coupe verticale de l'irradiateur gamma du laboratoire des techniques de l'irradiation L.T.I. du H.C.R actuellement COMENA

II.2.2. Détermination du taux de gonflement des polymères

La détermination du taux ou du degré de gonflement d'un polymère est une méthode permettant de connaître sa densité de réticulation et de nous renseigner sur sa porosité. Elle est effectuée par gravimétrie. Les matrices polymériques découpées en disques de faibles épaisseurs sont plongées dans la solution d'hydratation. A l'équilibre, le poids de la matrice hydratée déterminé est (m_H), ensuite la matrice est séchée à l'étuve pendant 2 heures à la température de 100 °C et son poids à l'état sec est (m_S). Le degré de gonflement est alors déterminé selon la formule suivante :

$$W(\%) = \frac{m_H - m_S}{m_H} \times 100 \%$$

II.2.3. Microscopie électronique

Un microscope électronique à balayage, modèle Cambridge stéréoscan 250 avec une tension de 20 KV, est utilisé pour l'observation des structures tridimensionnelles des polymères. Les échantillons sont découpés en petites pastilles, congelés à -15°C puis lyophilisés et ramenés à température ambiante. Une pulvérisation d'or sous vide poussé est faite à la surface des échantillons pour les rendre conducteurs avant l'observation.

Solutions tampons: ont une concentration de 0,01 M

Tampon acétate	pH=4
Tampon acétate	pH=5,5
Tampon acide citrique + phosphate de sodium dibasique	pH=3
Tampon sodium monobasique + phosphate de sodium dibasique 0,12 % NaCl, 0,02 % Sodium azide	pH=7.4
Tampon glycine NaOH	pH=10

CHAPITRE A.III. : Résultats et discussion

Introduction

Les polymères sensibles à leur environnement peuvent être utiles en tant que sondes métaboliques. Nous développons dans cette étude, des membranes sensibles au glucose en immobilisant la glucose-oxydase à l'intérieur de la structure réticulée tridimensionnelle d'un co-polymère du 2-hydroxy éthyl méthacrylate (HEMA) et N,N-diméthylaminoéthyl méthacrylate (DMAEMA) contenant des fonctions amines et l'agent de réticulation triméthylolpropane triméthacrylate (TMPTMA) en faible concentration.

La conversion du glucose en acide gluconique dans la membrane provoque la protonation de la membrane se traduisant par un gonflement de la matrice par des phénomènes de répulsion de charges. Dans cette étude, nous décrivons les conditions de préparation et les propriétés de gonflement des membranes sensibles au glucose.

III.1. Effet de la dose d'irradiation sur le taux de conversion de l'HEMA en PHEMA

Afin d'éviter la présence d'impuretés chimiques dans le produit final, les conditions de la radiopolymérisation doivent assurer la conversion totale des monomères en polymères. L'étude de l'effet de la dose d'irradiation sur le taux de conversion de l'HEMA en PHEMA est effectuée sur une série de trois échantillons composés d'un mélange HEMA/H₂O (1:1 v/v) et respectivement 2%, 3% et 4% d'agent réticulant le TMPTMA. Il faut noter que la valeur de 5% de TMPTMA correspond à la valeur maximale de solubilité du TMPTMA dans l'HEMA. Les échantillons sont irradiés sous atmosphère d'azote afin d'éviter l'effet de l'oxygène. La température d'irradiation est de -78 °C. Elle permet d'obtenir un polymère avec une porosité uniforme. Les doses d'irradiation γ du Cobalt 60 utilisées, varient de 1 à 12 kGy avec un débit de dose de 22 Gy/mn.

Après irradiation, les polymères obtenus ont un diamètre de 9 mm. Ils sont découpés en petites pastilles de 1 à 2 mm d'épaisseur, plongés dans de l'eau distillée pendant 72 heures afin d'éliminer toute trace de monomère résiduel.

Elles sont ensuite séchées dans l'étuve pendant 24 heures. Le rendement de polymérisation est déterminé par la méthode gravimétrique. Dans la figure A.4 sont représentés les résultats expérimentaux. On note que la dose d'irradiation de 2,5 Gy permet une polymérisation totale lorsque la concentration d'agent réticulant est de 4%. Les mêmes résultats ont été trouvés par J. Kost (38). Alors qu'elle est quatre fois supérieure (10 kGy) pour une concentration de 2%.

Dans l'élaboration de membranes de PHEMA par radiopolymérisation, plusieurs expériences menées ont montré que la taille et la densité des pores dépendent du rapport des constituants, monomère, eau et agent de réticulation. Selon le rapport de Ronel et autres (85), des membranes poreuses sont obtenues quand le rapport eau / HEMA est égal ou supérieur à 50 %. Lorsque la concentration de TMPTMA est faible de 2 %, nous avons une membrane ayant des pores de grand diamètre comme le montre les photos SEM (Microscopie électronique à balayage) (Figure A.5 : photo A), par contre pour une concentration de 4% les diamètres des pores sont plus faibles (Figure A.5: photo B). Ce résultat intéressant s'explique par la structure trifonctionnelle de l'agent réticulant (trois bouts de chaîne réactifs) qui renforce la structure du polymère qui le rend plus rigide. Ce type de membrane n'est pas approprié pour être utilisé dans des systèmes de diffusion d'insuline ou de lysozyme par exemple.

Par contre pour la concentration de 4% de TMPTMA, l'examen des photos SEM à un agrandissement de 800 et 4000 fois montre que la structure présente une microporosité uniformément répartie avec un diamètre moyen de 2 à 3 μm . Les membranes de PHEMA utilisées dans nos expériences ont été préparées avec 4 % de TMPTMA. La perméabilité des membranes de PHEMA est surtout étudiée pour des applications de libération contrôlée de molécule biologiquement active telle que l'insuline et les lysozymes. Les membranes de PHEMA sont biocompatibles ce qui les rend très appropriées aux applications in vivo et aux dispositifs implantables (86.87). Cependant, ses propriétés mécaniques et physico-chimiques doivent être améliorées puisqu'elles pourraient se rompre une fois utilisées dans des dispositifs implantables. Ce qui constitue un inconvénient majeur (87).

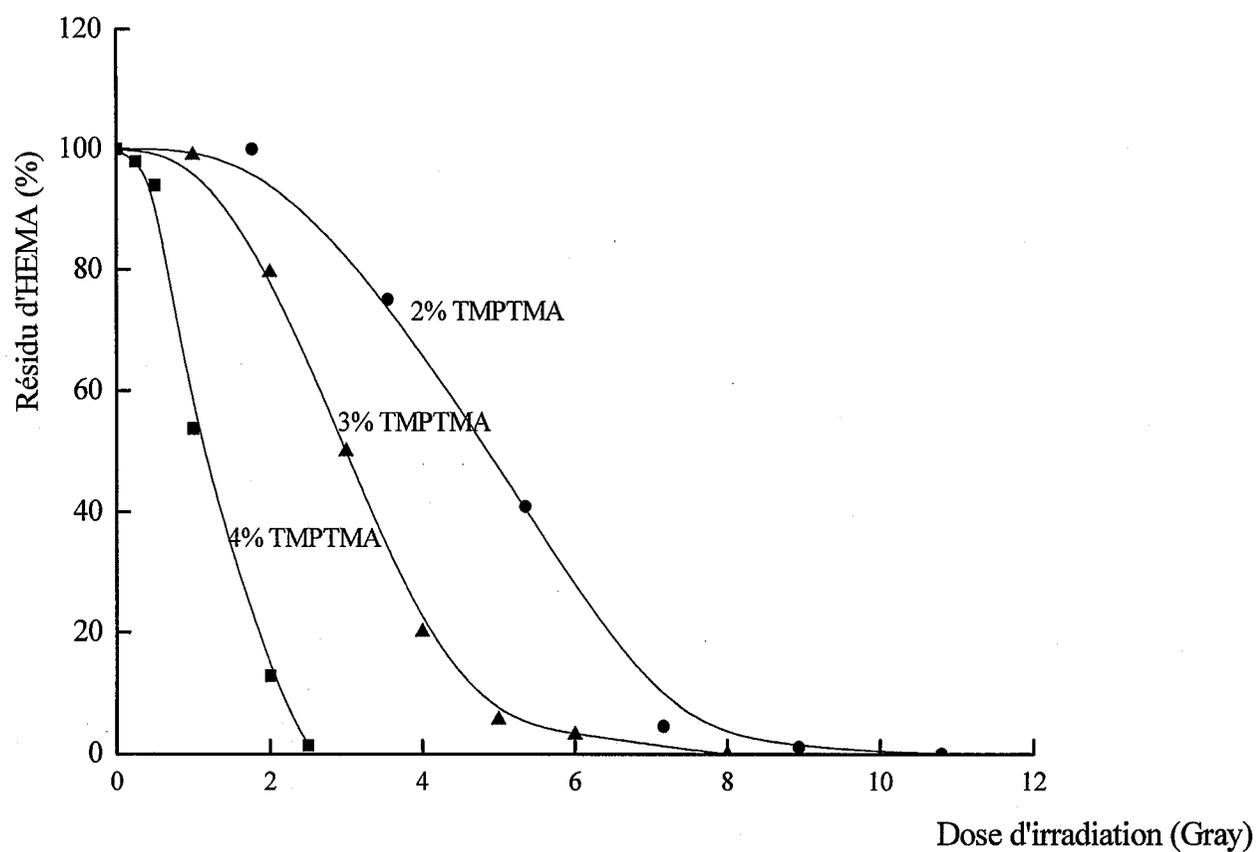


Figure A.4 : Effet du concentration de l'agent réticulant TMPTMA sur le taux de conversion de l'HEMA /H₂O (1 :1 v/v) : radiopolymérisation à -78°C, débit de dose de 22 Gy/mn

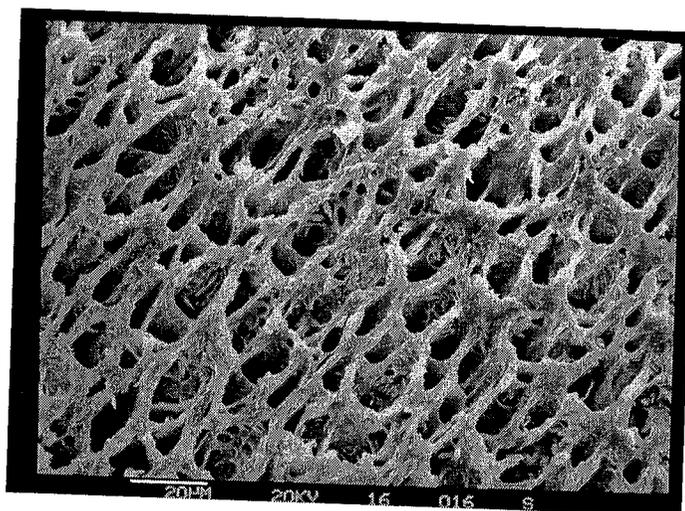
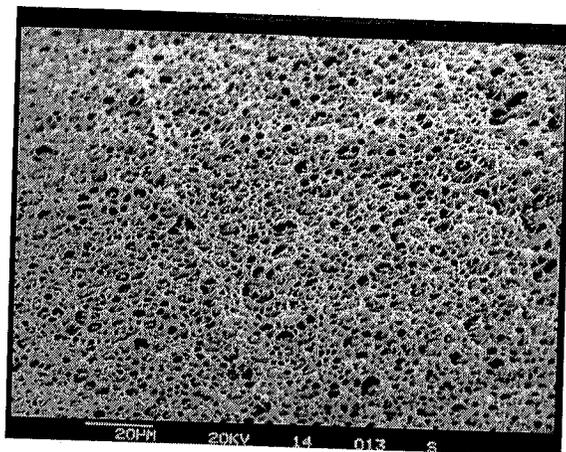
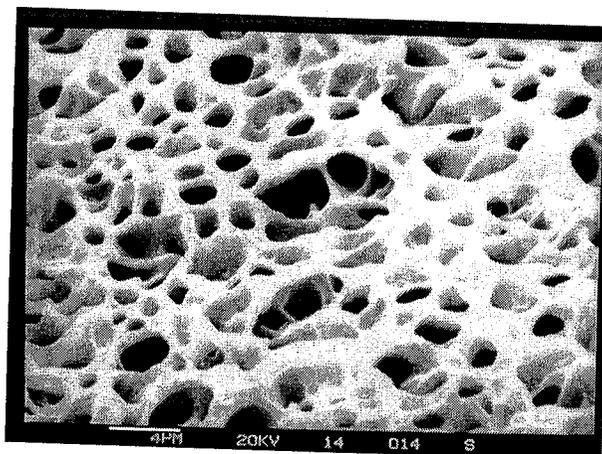


Photo A : SEM membrane PHEMA, 2% TMPTMA



**Photo B : SEM membrane PHEMA, 4%
TMPTMA 800X**



**Photo B : SEM membrane PHEMA, 4%
TMPTMA 4000 X**

Figure A.5 : Photos SEM de membrane PHEMA ayant différentes concentrations d'agent réticulant TMPTMA.

III.2. Membranes de PHEMA sensibles au glucose

Une série de membranes (plus de 25) ayant différentes compositions sont préparées dans les mêmes conditions décrites précédemment. Nous avons choisi de présenter dans cette étude 5 matrices. Leur composition est donnée dans le Tableau A.3. Elles sont préparées à base d'HEMA, de DMAEMA et le TMPTMA. En termes de composition, les pourcentages des monomères comportant les groupements amines correspondent à 8,77 à 17,54 ou à 35,10 % par rapport au volume dans le mélange initial du monomère (membranes E, F et G dans le Tableau A.3). La concentration de l'enzyme la glucose oxydase dans le mélange final est de 49 mg/ml dans des membranes E, F et G, de 4.9 mg/ml dans la membrane H et de 98 mg/ml dans la membrane I.

La cinétique de gonflement est étudiée en utilisant des pastilles circulaires de 9 mm de diamètre et 2 mm d'épaisseur. Les pastilles à glucose oxydase GOD immobilisée sont placées dans une série de bechers contenant des solutions de glucose à différentes concentrations sous atmosphère d'oxygène. Le pH est de 7,4. Une série de mesures est faite à différents intervalles de temps, après la mise des pastilles dans les solutions. Les mesures concernent le pH de la solution tampon dans la boîte de Pétri, du diamètre et de taux de gonflement de la pastille par rapport au temps et à la concentration de glucose. Les résultats sont reportés respectivement dans les figures (figures A.6, A.7), (figures A.8, A.9), et (figures A.10, A.11).

Tableau A.3: Composition des membranes, les valeurs sont données en ml sauf pour la GOD en mg

<u>Membrane</u>	<u>HEMA</u>	<u>DMAEMA</u>	<u>TMPTMA</u>	<u>H₂O</u>	<u>GOD</u>
E	1,0	0,1	0,04	0,1	105
F	0,9	0,2	0,04	0,1	105
G	0,7	0,4	0,04	0,1	105
H	1	0,1	0,04	0,1	10,5
I	1	0,1	0,04	0,1	210

Le pH des solutions de glucose dans lesquelles sont plongés les disques de GOD immobilisées, sont reportés en fonction du temps d'équilibre d'hydratation dans la Figure A.6. On note qu'aucun changement du pH ne s'est produit en l'absence du glucose (courbe en haut), mais le pH diminue rapidement en présence de glucose.

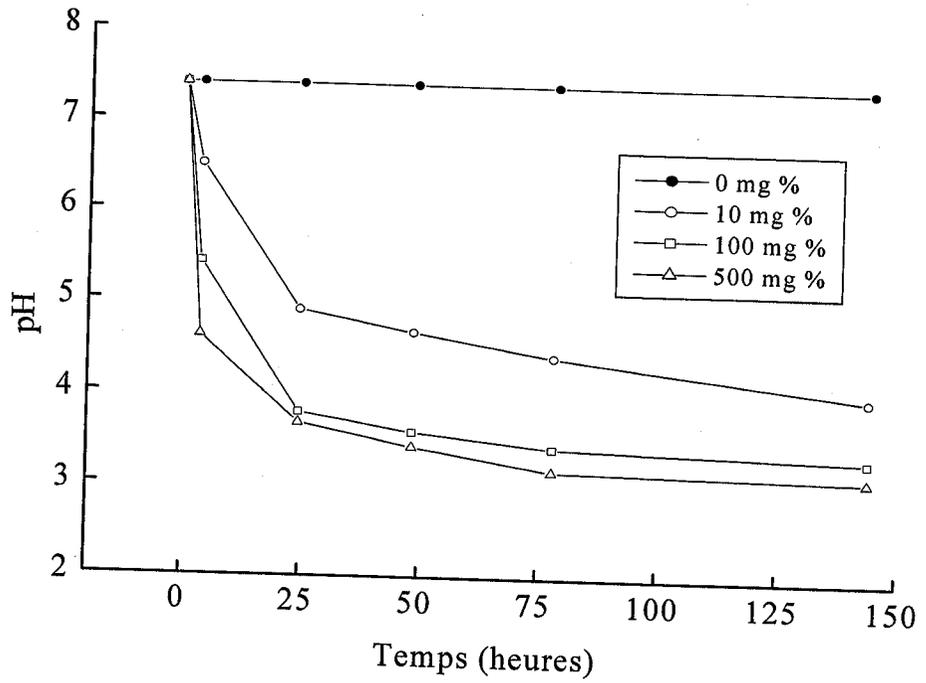


Figure A.6: Cinétique du changement de pH de la solution tampon (pH=7,4), induit par les membranes sensibles de glucose, membrane E exposée à différentes concentrations en glucose (en mg %).

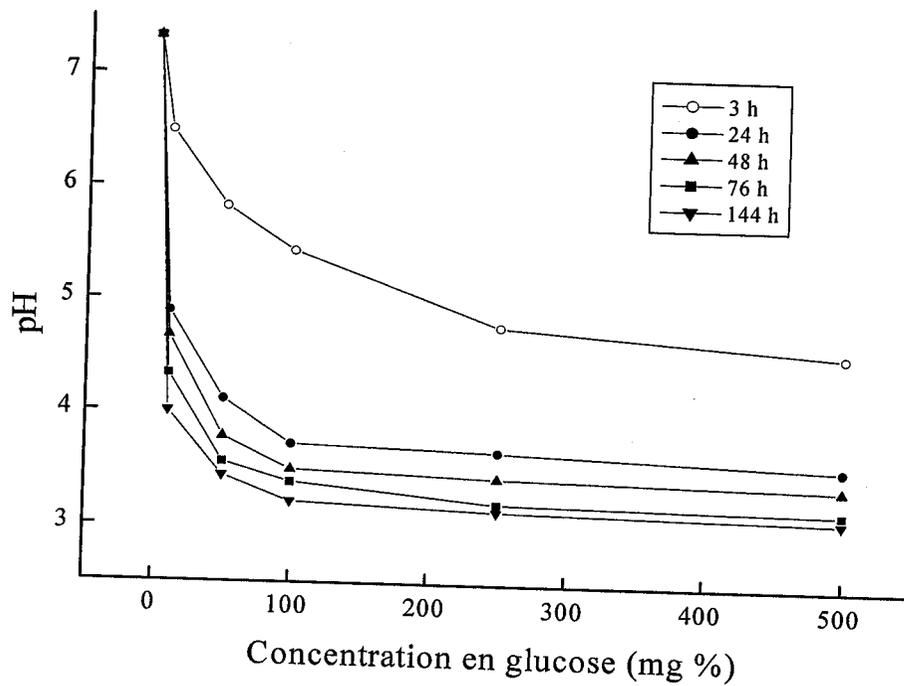


Figure A.7. Effet de concentration en glucose sur le changement de pH pour la membrane E.

Les changements de pH induits par la plus faible concentration de glucose (10 mg %) sont moins importants que ceux provoqués par la concentration de glucose physiologique (100mg%) alors que les concentrations de glucose physiologiquement hyper glycémique (500 mg %) induisent des changements plus important du pH. Le temps nécessaire pour atteindre des valeurs de pH constantes dépend de la concentration en glucose.

Les courbes du pH en fonction de la concentration initiale en glucose représentées dans la figure.A.7 montrent une nette variation pour l'intervalle de temps le plus court, 3 heures. Ceci s'explique par le fait que l'acide gluconique produit pendant ce temps, modifie la concentration de l'acide dans la solution externe, rendant l'effet de génération davantage d'acide moins efficace. A ces concentrations la solution agit comme un tampon. Donc, le système est sensible au glucose dès les premières heures.

Le diamètre des membranes plongées dans des solutions de glucose augmente de 20% approximativement, selon la concentration en glucose (figure A.8). A partir d'une durée d'une à trois heures, le diamètre augmente pour la solution de concentration 10 mg % de glucose. L'augmentation du diamètre pour des concentrations plus élevées en glucose est faible (figure A.9). Après 48 heures, tous les disques sont légèrement plus larges, sauf celui plongé dans la solution ayant la plus faible concentration (10 mg %) en glucose. Une variation plus ou moins importante du diamètre est observée.

L'augmentation de la teneur en eau des membranes plongées dans les solutions de glucose est qualitativement semblable à celle du diamètre (Figure A.10 et A.11).

Pour la matrice E, la teneur en eau demeure constante autour de 60% en l'absence de glucose, mais augmente jusqu' à 75% pour les concentrations élevées en glucose et à des temps plus longs.

Au temps de gonflement de 3 heures, une augmentation entre 16 et 18% de la teneur en eau est observée. A 45 minutes (0,75 h), et 3,5 heures (Figure A.11) montrent également une légère augmentation pour la solution de plus faible concentration en glucose 10 mg %. Au-delà de 3 heures, l'augmentation est très faible en fonction de la concentration en glucose.

Les résultats de gonflement ou de la teneur en eau ont montré plusieurs aspects intéressants des membranes de PHEMA avec la GOD immobilisée. Essentiellement, les membranes gonflent et deviennent davantage hydratées en présence du glucose.

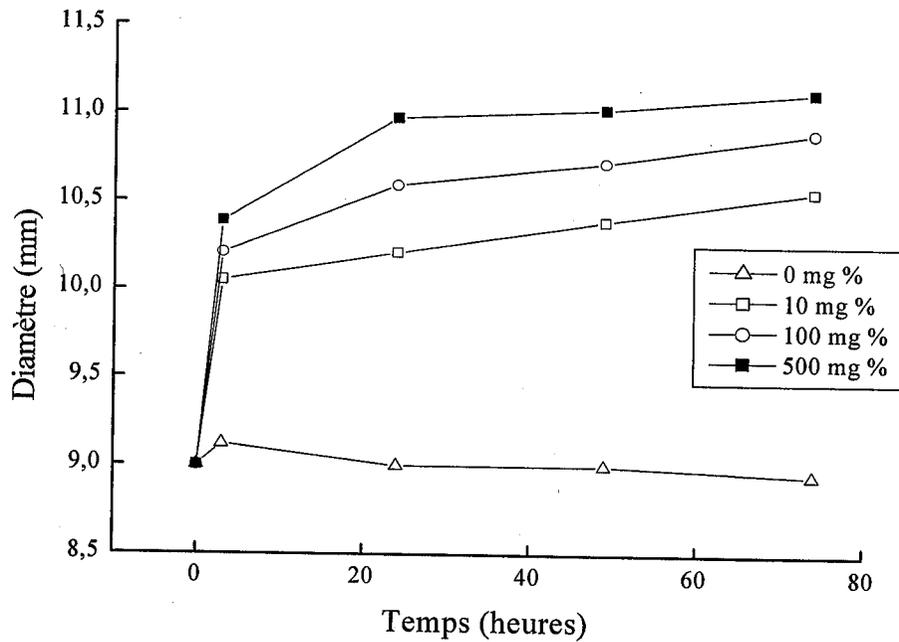


Figure A.8 : Cinétique du gonflement de membrane sensible de glucose. Le diamètre de la membrane E est mesuré à différents intervalles de temps

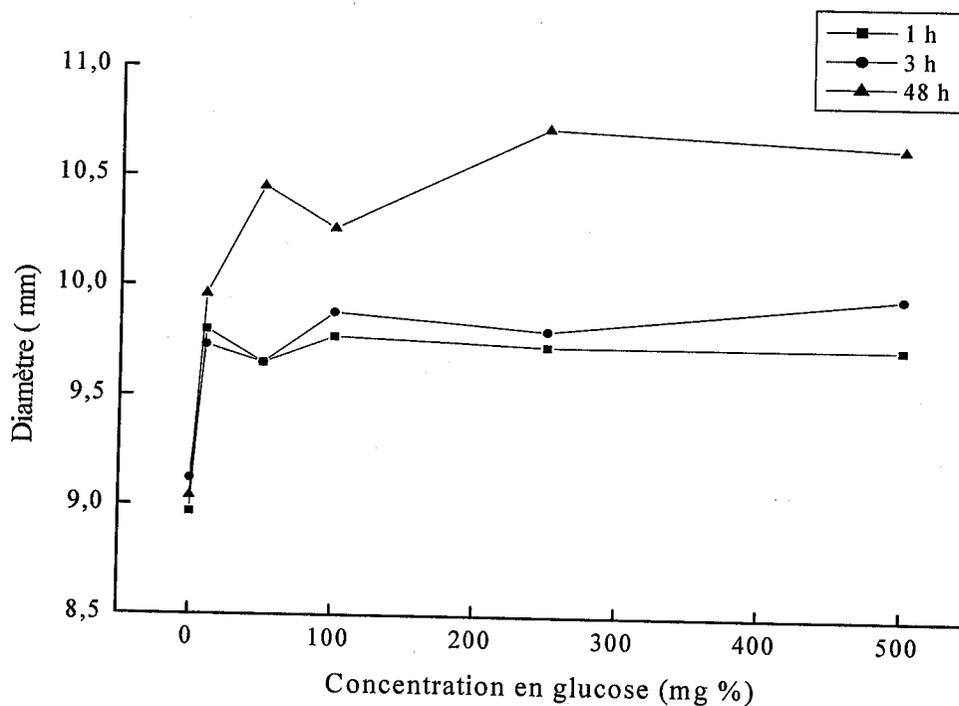


Figure A.9 : Gonflement des membranes sensibles de glucose dans des solutions de glucose. Le diamètre des disques de la membrane E est mesuré à différents intervalles de temps après une exposition à des concentrations indiquées en glucose.

Ces membranes peuvent alors être utilisées comme sondes de glucose, en couplant le changement de gonflement à une sonde de force ou de pression. De l'observation visuelle de la membrane on peut facilement détecter le gonflement. Ce dernier est plus marqué en présence de glucose.

La surface de la pastille augmente proportionnellement au carré du rayon. De sorte que le changement de 20% du diamètre correspond à un changement de 44% en surface. Un système de détection du glucose serait plus sensible, en se basant sur la mesure des changements de surface (ou du volume final) que sur la mesure des changements de diamètre.

L'analyse de l'effet de la concentration en glucose sur le gonflement ou la teneur en eau fourni davantage d'informations sur les propriétés de ces membranes. Les changements de pH induits par la membrane E (Figure A.6) indique qu'au début du gonflement, les valeurs du pH sont largement supérieures aux valeurs finales particulièrement pour la solution de plus faible concentration en glucose 10 mg % où à 3 heures le pH est environ de 6,5, initialement égal à 7,4. Néanmoins, le gonflement de la membrane dans la solution à 10 mg % de glucose pendant 3 heures atteint des valeurs comparables à celles des membranes plongées dans les solutions de concentrations élevées voir figures A.9 et A.11.

Pour plusieurs heures, le gonflement augmente, mais varie faiblement avec les concentrations en glucose. Il s'avère que deux étapes peuvent se produire.

Dans la première étape, le taux de gonflement ou la teneur en eau de la membrane E est le résultat des effets dus au pH interne et celui du microenvironnement. Le pH interne est probablement plus faible, dans cette étape. Le pH du microenvironnement limite le gonflement total de la membrane (Figures A.9 et A.11 courbes en bas).

Dans la deuxième étape, une fois le pH du microenvironnement abaissé, le taux de gonflement atteint sa valeur maximale, caractéristique d'un système dans lequel le pH interne et externe est acide (Figures A.9 et A.11 les courbes en haut).

Cette analyse suggère, que les membranes peuvent assumer des valeurs du pH interne différent de celui du microenvironnement car la membrane E en solution de glucose à 10 mg % à 3 heure, où le pH est 6,5, ne devrait pas avoir un degré de gonflement similaire à celui d'une membrane en solution de glucose à 500 mg % à 3 heure, où le pH est largement inférieur, à savoir 4,5.

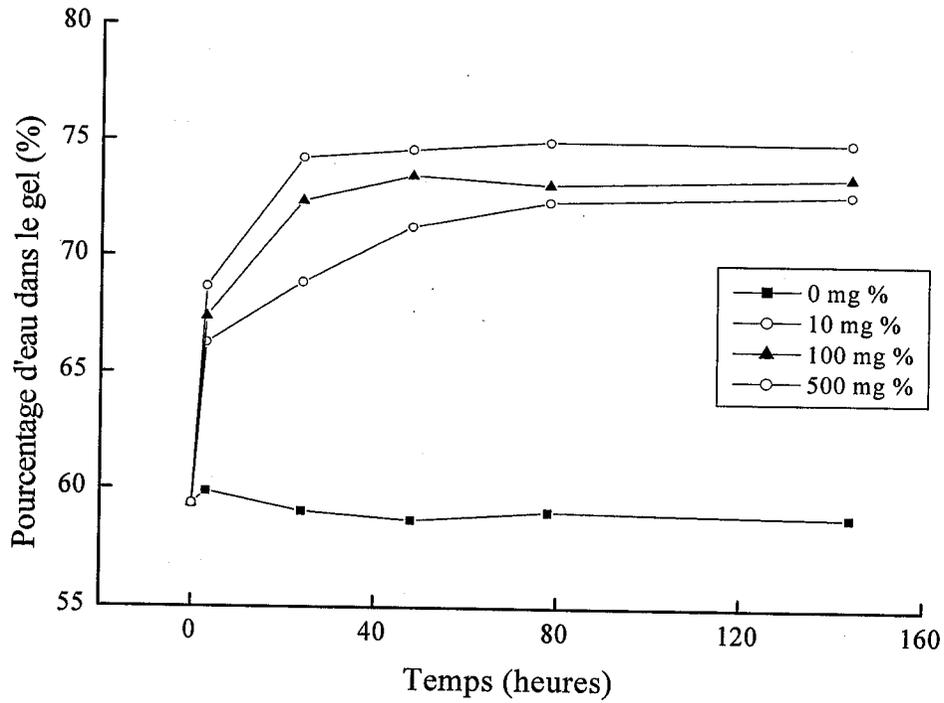


Figure A.10 : Le taux de gonflement des membranes sensibles de glucose est mesuré pour la membrane E plongée dans les solutions à différentes concentrations en glucose (en mg %) :

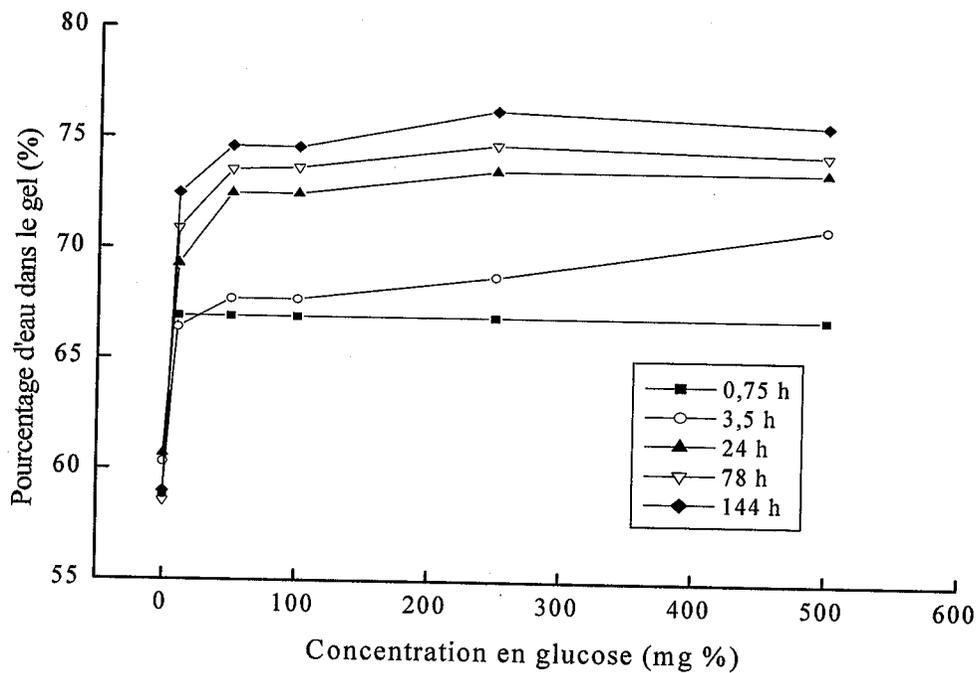


Figure A.11: Le taux de gonflement de membranes sensibles au glucose, mesuré pour la membrane E à différents intervalles de temps après une exposition à différentes concentrations en glucose.

Cette conclusion est importante par rapport à une éventuelle utilisation de ces membranes en présence des fluides physiologiques tels que le plasma sanguin puisqu'elle indique que des changements dans la membrane (par exemple, gonflement ou augmentation de perméabilité) pourrait se produire dans ces conditions.

Le fait que des membranes en solution à 10 mg % de glucose gonflent approximativement au même degré que les membranes en solution à 500 mg % de glucose à 3 heures, nous amène à examiner les propriétés des membranes E, F, et G contenant respectivement les proportions croissantes en groupements amine: 1 fois, 2 fois, et 4 fois (Tableau A.3), car notre objectif est l'élaboration de membranes sensibles au glucose. Les résultats sont représentés sur les Figures A.12 et A.13 L'augmentation de la teneur en eau est induite par les changements du pH qui se produisent pendant la variation de la concentration de membrane E à différents intervalles de temps après une exposition à différentes concentrations en glucose.

Le taux de gonflement initial (à pH 7,4) change avec la concentration de groupement amine. Une augmentation de 16 à 18% est provoquée par la diminution du pH. Elle est pratiquement identique pour toutes les membranes. Le gonflement de la membrane sans GOD en réponse aux solutions tampons à différents pH est similaire au gonflement de membranes avec GOD immobilisée, plongée dans des solutions à différentes concentrations en glucose.

La Figure A.13 montre l'effet de la concentration en glucose sur la teneur en eau de ces mêmes membranes. Les taux normaux de glucose dans le sang sont 100 mg %, alors que pour les diabétiques ils peuvent aller jusqu'à 500 mg %. Le temps de gonflement à l'état d'équilibre, est de 24 heures. Une faible variation de gonflement à différentes concentrations en glucose est constatée pour la membrane E ayant une faible concentration en groupement amine. Les membranes contenant des concentrations en groupements amines plus élevées (F et G) montrent une réponse différentielle aux concentrations en glucose dans la gamme physiologique. Ces résultats suggèrent que des membranes convenablement élaborées par rapport à leurs compositions, offrent des possibilités intéressantes de sensibilité aux concentrations physiologiques en glucose et peuvent être utiles dans la détection de glucose.

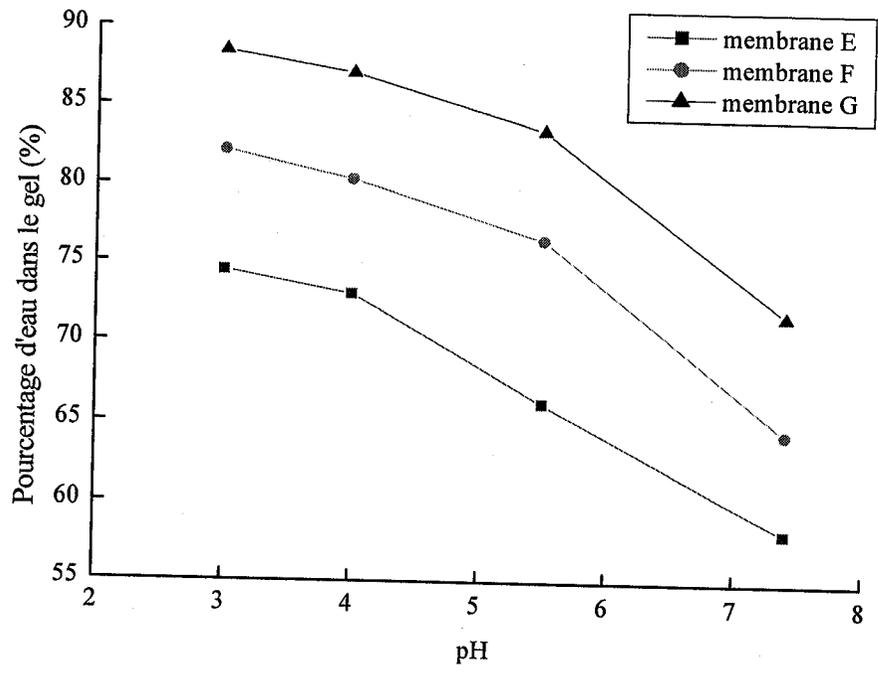


Figure A.12. Effet du pH sur le gonflement des membranes E, F, et G.

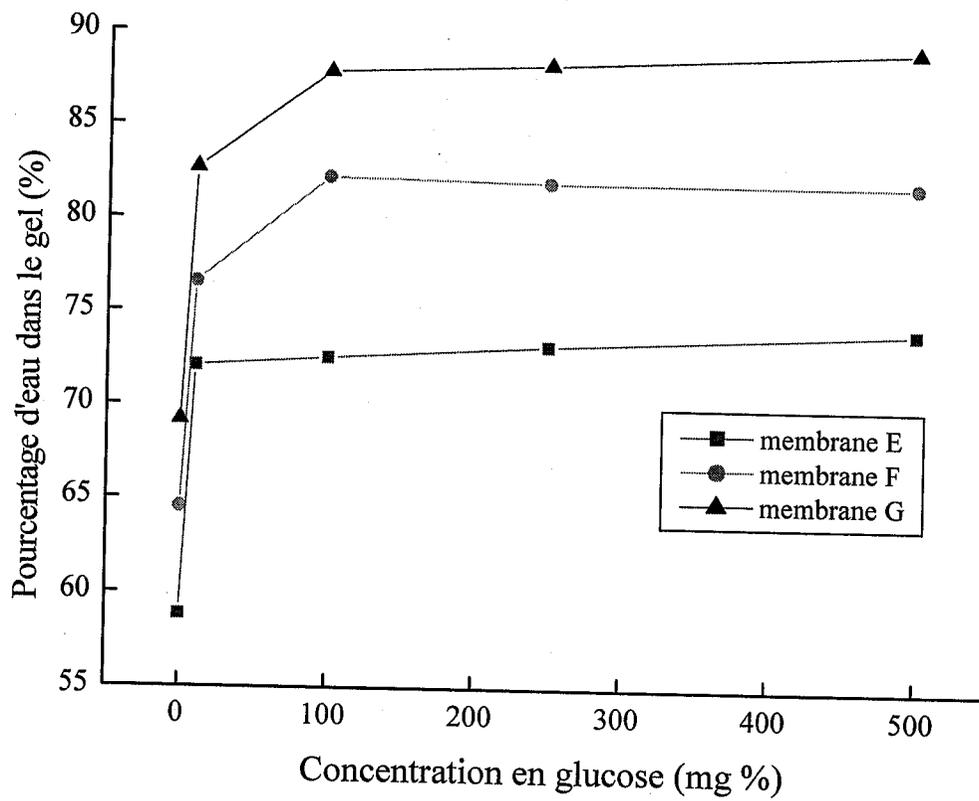


Figure A.13. Effet de concentration en glucose sur le gonflement (temps 24 heures) des membranes E, F, et G

Pour déterminer la sensibilité de telles membranes dans des conditions de l'environnement in vivo, les mesures du gonflement ont été réalisées dans des solutions 0,15 M NaCl. Comme représenté sur la Figure A.14, le changement du degré de gonflement de la membrane E en réponse à la concentration en glucose est seulement de 3% dans la solution saline, contre 16% en solution aqueuse (voir Figure A.13). Cependant, en ajoutant la GOD dans la composition de la membrane (I), le gonflement en réponse au glucose, a été augmentée d'environ 6%.

La diminution du gonflement en présence du sel est certainement dû à l'effet du contre ion qui atténue les phénomènes de répulsion électrostatique. La variation du gonflement en solution saline, induit par l'augmentation de la concentration en GOD, est due au changement des propriétés mécaniques de la membrane.

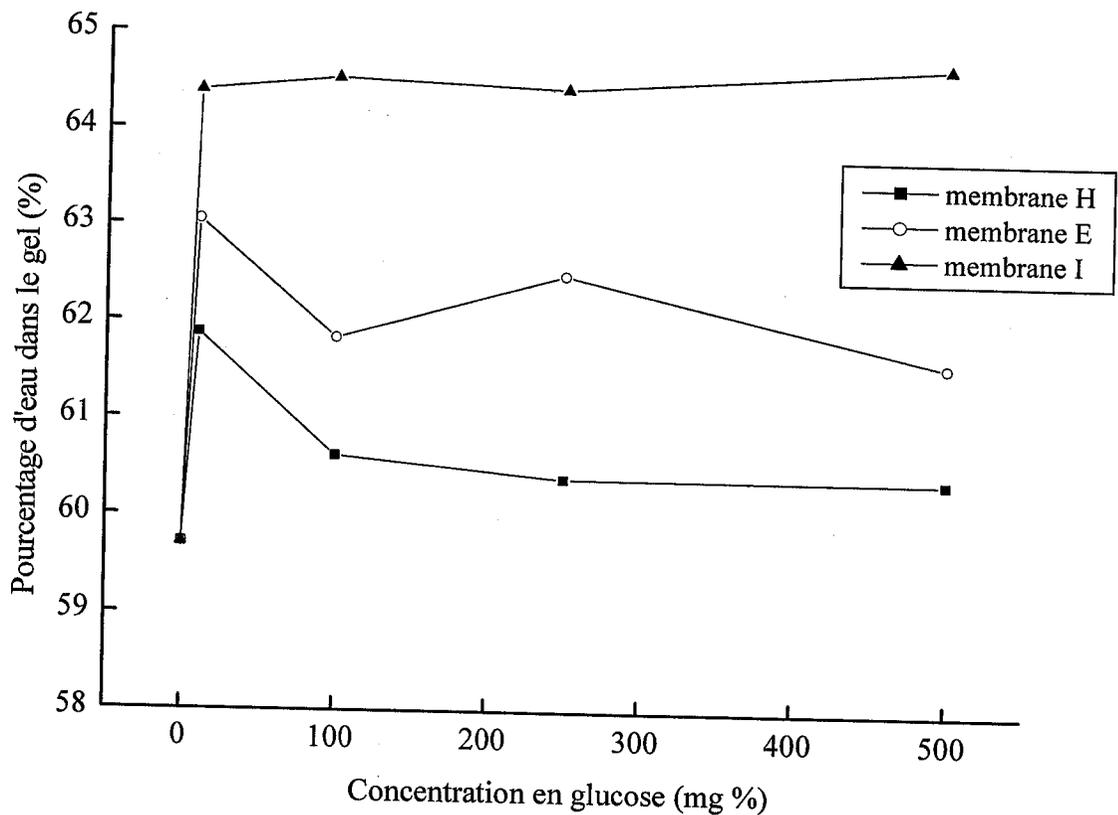


Figure A.14: Effet de concentration en glucose sur le gonflement des membranes H, E, et I dans une solution saline, temps d'équilibre (3jours).

Conclusion

La méthode d'élaboration des polymères par radiations ionisantes: simple, produits purs.
L'utilisation des basses températures: avantages (préserve l'activité, structure poreuse)

Nous avons montré que :

- Les variations du pH sont dues à l'acide gluconique produit par l'activité enzymatique.
- Le système est sensible au glucose.
- L'augmentation du diamètre est importante pour des concentrations en glucose faibles.
- Une augmentation de près de 20 % du pourcentage d'eau dans le gel est provoquée par la variation du pH de 7,4 à 3
- Les membranes contenant des concentrations en groupements amines élevées montrent une réponse différentielle aux concentrations en glucose dans la gamme physiologique.

Donc des membranes convenablement élaborées par rapport à leurs compositions, en HEMA-DMAEMA-TMPTMA-GOD offrent des possibilités intéressantes de sensibilité aux concentrations physiologiques en glucose



Sonde de glucose

Perspectives

- L'utilisation de ces membranes dans le contrôle de libération d'insuline en réponse aux concentrations en glucose reste un objectif à atteindre en utilisant un système expérimental amélioré imitant les conditions véritablement physiologiques.
- une étude précise de diffusion de l'insuline en fonction du taux de glucose devrait être réalisée. L'insuline marquée à l'iode 125 sera détectée par spectrophotométrie et par la mesure de la radioactivité à l'aide d'un compteur à scintillations liquide ou par des techniques ELISA

Références bibliographique

1. R. A. Peppas (Ed), **Hydrogels in medicine and pharmacy**, Vols.I-III.CRC Press. Inc., Boca Raton, FL, (1986).
2. K. Park, W. Shalaby and H. Park (Eds.), **Technomic Publishing Co., Inc.**, Lancaster, Basel, (1993).
3. S. B. La, T. Okano and K. Kataoka, **J. Pharm. Sci.**, 85, 85-90, (1996).
4. V.V. Ranade and M. A. Hollinger (Eds.), **Drug Delivery Systems**, CRC Press Inc., Boca Raton, FL, 1996.
5. K. Sawahata, M. Hara, H. Yasunaga and Y. Osada, **J. Controlled Release**, 14,253-262, (1990).
6. I. C. Kwon, Y. H. Bae, T Okano and S. W. Kim, **J. Controlled Release**, 17,149-156, (1991)
7. L. C. Dong and A. S. Hoffman, **J. Controlled Release**, 15,141-152, (1991).
8. N. Nishiwaki, K. Furata, M. Komatsu and Y. Ohishiro, **Polym. J.** ,23,789-794, (1991)
9. H. Katano, A. Maryuyama, K. Sanui, N. Ogata, T. Okano and Y. Sakurai, **J. Controlled Release**, 16,215-228, (1991).
10. S.M. Chabane Sari, A. Hadjadj, **J. Chim. Phys.** 90, 1055-1065, (1993).
11. D. J. Chung, Y. Ito and Y. Imanishi, **J. Controlled Release**, 18,45-54, (1992).
12. T. Kokubo, K. Sugibayushi and Y. Morimoto, **J. Controlled Release**, 17,69-78, (1991).
13. J. Heller, **J. Controlled Release**, 8,111-125, (1988).
14. M. Brownlee and A. Ceram, **Science**, 206,1190-1191, (1979).
15. S. Y. Jeong, S. W. Kim, M.J.D. Enink and Feijen, **J. Controlled Release**, 1,57- 66, (1984).
16. S. W. Kim, S. Y. Jeong , S. Sat, J. C .Mc Rea and Feijin, **Recent Advances in Drug Delivery Systems**, Plenum Press, New York, NY, ,pp :123-136, (1984).
17. S. Sato, S. Y. Jeong, J. C. Mc Rea and S. W. Kim, **J. Controlled Release**, 1,67- 77, (1984).

18. S. Sato, S. Y. Jeong, J. C. Mc Rea and S. W. Kim, **Pure Appl. Chem.**, 56,1323- 1328, (1984).
19. M. A. Atkinson and N. K. Maclaren, **Scien. American**, ,62-71, (1990).
20. A. M. Albisser, B. S. Leibel, T. G. Ewart, Z. Davidovac, C. K. Botz, W. Zingg, H. Schipper and R. Gander, **Diabetes**, 23, 397-404, (1974).
21. G. Slama, M. Hautecouverture, R. Assan and G. Tchobroutsky, **Diabetes**, 23,732- 738, (1974).
22. M. V. Sefton, **CRC Critical Reviews in Biomedical Engineering**, 14,201-240, (1987).
23. H. Thurow and K. Geisen, **Diabetologia**, 27 212-218, (1984).
24. K. D. Hepp, **Diabetologia**, 37, (Suppl. 2):s108-s111, (1994).
25. Report of the 13th workshop of EASD study group Artificial Insulin Delivery Systems Pancreas and Islet Transplantation (AIDSPIT), **Diabetologia**, 37 (Suppl.):33-37, (1994).
26. P. F. Gores, J. S. Najarian, E. Stephanian, J. J. Llooveras, S. L. Kellay and D.E.R. Sutherland, **Lancet**, 341 :19-21, (1993).
27. K. Sawahata, M. Hara, H. Yasunaga and Y. Osada, **J. Controlled Release**, 14, 253-262, (1990).
28. M. V. Sefton and E. Nishimura, **J. Pharm. Sci.**, 69, 208-209, (1990).
29. D. S. T. Hsieh, R. Langer and J. Folkman, **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 78, 1863-1867, (1981).
30. S. Miyazaki, C. Yokouchi and M. Tanaka, **J. Pharm. Pharmacol.**, 40, 716-717, (1988).
31. J. Heller, **J. Controlled Release**, 2, 167-177, (1985).
32. K. Ishihara, M. Kobayashi and N. Shinohara, **Polym. J.**, 16, 625-631, (1984).
33. R. A. Seigle, M. Falamarzian, B.A. Firestone and B. C. Moxley, **J. Controlled Release**, 8, 179-182, (1988).
34. C. Kim, E. B. Im, S. J. Lim, Y. K. Oh and S. K. Han, **Int. J. Pharm.**, 101, 191-197, (1994).

35. M. Brownlee and A. Cerami, **Diabetes**, 32, 499-504, (1983).
36. S. Kitano, Y. Koyama, K. Kataoka and Y. Sakurai, **J. Controlled Release**, 19, 162-170, (1992).
37. I. Morishata, M. Morishata, K. Takayama, Y. Machida and T. Nagai, **Int. J. Pharm.**, 78, 9-16, (1992).
38. E. Ziv, M. Kidon, I. Raz, M. Krausz and H. Baron, **J. Pharm. Sci.**, 83, 792-794, (1994).
39. M. Meshida and M. Sidhom, **Int. J. Pharm.**, 114, 137-140, (1995).
40. Y. W. Cho and M. Flynn, **Lancet**, 2, 1518-1519, (1989).
41. N. G. Schipper, J. Verhoef, S. G. Romeijn and F. W. Merkus, **J. Controlled Release**, 21, 173-185, (1992).
42. N. G. Schipper, S. G. Romeijn, J. C. Verhoef and F. W. Merkus, **Pharm. Res.**, 10, 682-686, (1993).
43. D. J. Pillon, J. A. Atchinson, C. Gargiulo, R. X. Wang, P. Wang and E. Meezan, **Endocrinology**, 135, 2386-2391, (1994).
44. T. HIROSHI . Biomedical polymers: current status and over view **Boca Raton, CRC Press**, (1993)
45. O. WICHTERLE, and Coll., Hydrophilic gels for biological use **Nature**, Vol 125, (1960).
46. M. NORIHICO, Biocompatible polymers/soft tissue compatible polymers **CRC Press Boca Rat.** Vol. 135, (1993).
47. B. D. RATNER et Coll., Synthetic hydrogel for biomedical applications, Vol.31 **ACS Symposium Serie Andrate J.D.** (1976).
48. M. SINGH and Coll., Hydron-coated terylene sutures. **Biomed. Eng.** 6, 157, (1971).
49. D. GREGONIS and Coll., The chemistry of some selected methacrylate hydrogels, in hydrogelsfor medical and related applications. Vol. 31 **Andrate J.D.** Ed, **ACS Symposium Serie**, 88, (1976).
50. J. WOOD et Coll., The swelling properties of poly(2-hydroxyethyl methacrylate) hydrogels polymerized by gamma irradiation and chemical initiation **Int. J. Pharmacol.**, 7, 189, (1981).

51. M.REFOJO et Coll., Hydrogels from PHEMA and propylene glycol monomethacrylate . **J. Appl. Poly. Sci.**, 9, 2425, (1965).
52. M.REFOJO et Coll., Microscopic determination of the penetration of proteins and polysaccharides into poly(2-hydroxyethyl methacrylate) and similar hydrogels **J. Polym. Sci.** 66, 227, (1979).
53. H. BRONSTED et Coll., pH-sensitive hydrogels. **ACS Symp. Ser.** 480, 285-304,(1992)
54. R. YOSHIDA et Coll., Pulsatile drug delivery systems using hydrogels. **J. Adv. Drugs Del. Rev.**, 11, 90, (1993).
55. O.WISHTERLE et Coll., Polymerization of ethylene glycol monomethacrylate in the presence of solvents, **J. Pol. Sci.**, (1969).
56. J. JANACEK. Mechanical behaviour of hydroxyalkyl methacrylate polymers and copolymers., **J. Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem.**, 19, (1973).
57. K. ANSETH et Coll., Mechanical properties of hydrogels and their experimental determination., **Biomaterials**, Vol. 17, pp1653, (1996).
58. A. R. KHARE et Coll., Swelling/deswelling of anionic copolymer gels., **Biomaterials**, Vol. 16, pp559, (1995).
59. C. J. HAMILTON et Coll., Synthetic hydrogels: 4. The permeability of poly(2-hydroxyethyl methacrylate) to cation-an overview of solute-water interactions and transport processes. **Polymer**, Vol. 29, pp 1979. (1988).
60. M. Y. ARICA et Coll., Permeability of PHEMA membranes prepared by photoionisation. **Polymer**, Vol. 32, pp 2(1995)
61. W. E. ROORDA et Coll., The swelling behaviour of PHEMA hydrogels **Pharmazie**, 44, 546 (1989).
62. S. WISNIEWSKI et Coll., Diffusion processes in synthetic hydrogel membranes PhD **Thesis**. University of Utah Salt lake city, (1979).
63. B. D. RATNER et Coll., Interaction of urea with poly(2-hydroxyethyl methacrylate) hydrogels. **J. of Pol. Sci. Part I** Vol. 10, pp 2426, (1972).
64. J. M. ANDERSON et Coll., The slow release of hydrocortisone sodium succinate from poly(2-hydroxyethyl methacrylate) membranes, in hydrogels for medicColl and related applications. **Andrate J.D. Ed. ACS Symposium Serie 31**, 1976, pp167, (1976).

65. J. HORIGER et Coll., Permeability and biocompatibility of new hydrogel. **Biomaterials** Vol. 16, pp753-759, (1995).
66. Y. HAYASHI. Interactions between polymers and biosystems. **CRC Press Boca Raton.**, 34, (1993).
67. S. WISNIEWSKI et Coll., Permeation of water-soluble solutes through poly(2-hydroxyethyl methacrylate) and poly(2-hydroxyethyl methacrylate) crosslinked with ethylene glycol dimethacrylate. **Membrane Sci.** 6, pp199, (1980).
68. M. S. JHON and Coll., Water and hydrogels. **J. Biomed. Sci. Mater. Res.**, 7, pp509, (1973).
69. K. ISHIHARA. Biocompatible polymers: blood compatible polymers **CRC Press Boca Raton.**, 94, pp100, (1993).
70. I. YOSHITO. Membrane as biomaterials I; **Polymers**, Vol. 23, N°5, pp551, (1990).
71. T. OKANO and Coll., In vivo antithrombogenicity of block copolymers having hydrophilic and hydrophobic microdomains evaluated by atriovenous shunts method. **Artif. Organs**, (1986).
72. A. S. HOFFMAN and Coll., Application of radiation-grafted hydrogels as blood-contacting biomaterials. **Rad. Phy. Chem.**, 22, pp267, (1983).
73. T. OKANO and Coll., effect of hydrophilic and hydrophobic microdomains on mode of interaction between block polymers and blood platelets. **J. Biomed. Mater. Res.**, 15, pp393, (1981).
74. J. KOST and Coll., Glucose sensitive membranes containing glucose oxidase: activity, swelling, and permeability studies. **J. Biomed. Mater. Res.**, Vol. 19, 1117-1133, (1985).
75. YOSHIHIRO, An Insulin releasing system that is responsive to glucose. **J. Controlled Release**, 10, 195-203, (1989).
76. S. LORA and Coll., Radiation Induced graft copolymerisation, **Inter. Jour. Appl. Instru. Part C**. Vol. 35, N°1-3 pp117, (1990).
77. F. M. VERONESE et Coll., Controlled release of narciclasine from poly(HEMA) matrices polymerized by a chemical initiator and by GAMMA irradiation (1990).

78. M. CARENZA and Coll., Hydrogels obtained by radiation-induced polymerisation as delivery systems for peptide and protein drugs. **Rad. Phy. Chem.** Vol. 42, N°4-6, pp897-901, (1993).
79. F. MARIAN and Coll., Swelling of a polymer membrane for use in a glucose biosensor. **ACS Sym. Ser.**, pp487-301, (1993).
80. C.P. QUINN. Photo-crosslinked copolymers of 2-hydroxyethyl methacrylate. **Biomaterials**, pp389-396, (1995).
81. L. KESSLER and Coll., Influence of corona surface treatment on the properties of an artificial Coll membrane used for langerhans islets encapsulation: permeability and biocompatibility studies. **Biomaterial**, Vol. 16, pp198-195, (1995).
82. O. WICHTERLE and Coll., U.S. **patent**, 2, 976, (1961).
83. B. D. RATNER et Coll., Synthetic hydrogel for biomedical applications, Vol.31 ACS Symposium Serie **Andrate J.D.** (1976).
84. N. A. PEPPAS and A. G. MIKOS., **CRC Press Florida.**, Vol 1 27, (1983).
85. S. Ronel, M. J. D'Andrea, H. Hashiguchi, G. F. Klomp and W. H. Dobelle, **J. Biomed. Mater. Res.**, 17, 855-864, (1983).
86. G. F. Klomp, H. Hashiguchi, P.C. Ursell, Y. Takeda, T. Taguchi and W. H. Dobelle, **J. Biomed. Mater. Res.**, 17, 865-871, 1983
87. S.Y. Jeong, S. W. Kim, D. L. Holmberg and J. C. Mc Rea, **J. Controlled Release**, 2, 143-152, 1985

PARTIE B

Greffage de la lissamine rhodamine B sur des nanoparticules colloïdales stables: une procédure originale pour estimer le nombre de molécules de colorant liées aux nanoparticules

CHAPITRE B.I

I.1. Nanomatériaux

I.1.1. Définitions et distinction entre nanotechnologies et nanosciences

Les nanotechnologies constituent un champ de recherches et de développement technologiques impliquant l'élaboration de structures, de dispositifs et de systèmes à partir de procédés permettant de structurer la matière au niveau atomique, moléculaire ou supra moléculaire, à des échelles caractéristiques comprises entre 1 et 100 nanomètres. Les nanotechnologies suscitent et utilisent le développement de champs scientifiques nouveaux qui explorent les phénomènes apparaissant à l'échelle nanométrique. Ce sont les nanosciences. Nanosciences et nanotechnologies s'intéressent donc à la même échelle, et par conséquent, partagent et développent des outils communs. Les nanosciences requièrent la manipulation et le contrôle de la matière éventuellement jusqu'au niveau atomique et élaborent des objets de laboratoire permettant la mise en évidence et l'étude de phénomènes nouveaux. Les nanotechnologies visent à formaliser des concepts et des savoir-faire permettant d'élaborer des matériaux ou des systèmes dont la fonctionnalité répond à un besoin particulier, en vue d'une application identifiée.

La nanotechnologie désigne la science, l'ingénierie de l'infiniment petit et la compréhension de leur comportement physique et chimique ainsi que les phénomènes qui se produisent à cette échelle (1).

« Il y a plein de place en bas de l'échelle ! Considérons la possibilité de faire un objet très petit, à l'image des cellules, aussi petit et aussi fonctionnel que nous puissions commander et qui exerce une fonction à cette échelle...La chimie reviendrait alors à placer les atomes un par un exactement à la position voulue !...Mais actuellement, nous devons toujours accepter les arrangements que la nature nous impose. Je ne doute pas que , lorsque nous aurons quelque contrôle sur l'arrangement des objets à une petite échelle, nous découvririons que la matière possède une gamme de propriétés énormément étendue et qu'avec, nous pourrions réaliser beaucoup de chose ». Ces propos ont été tenus en 1959 par le physicien Allemand Richard FEYNMAN lors de son cours intitulé « il y'a plein d'espace en bas de l'échelle (there is plenty of room at the bottom) » présenté à l'Institut de Technologie de Californie. Aujourd'hui nous commençons à voir se réaliser ce qu'il décrivait il y'a plus de quarante ans, avant même que le terme nanotechnologie n'existe. Il préconise la distinction des nanomatériaux vis-à-vis des structures déjà existantes.

Les nanotechnologies ne sont pas une simple étape vers la miniaturisation; elles visent à prendre avantage du comportement et des phénomènes liés à la taille qui pourraient avoir des effets sur les matériaux et la technologie à l'échelle macroscopique. En effet, lorsqu'on réduit la taille des entités constitutives d'un matériau jusqu'à l'échelle nanométrique, de nouvelles propriétés physiques, chimiques ou biologiques, radicalement différentes de celles relatives à des composés équivalents structurés à une échelle supérieure, peuvent apparaître. De plus, de l'association entre deux entités de natures différentes, l'une organique et l'autre inorganique, résultent des nanomatériaux hybrides bénéficiant de propriétés originales. Cette discontinuité dans les principes de fonctionnement est une conséquence directe de l'échelle nanométrique. Les nouveaux comportements qui interviennent à cette échelle font intervenir des effets quantiques, des effets de confinement, l'importance des surfaces d'échanges, la prédominance de rapports surface/volume ou d'autres effets ou phénomènes mésoscopiques. D'ores et déjà, de nombreux domaines industriels tels la catalyse, l'agroalimentaire ou même le cosmétique utilisent, comme composants principaux de certains produits, des particules ultrafines ou colloïdales de taille comprise entre quelques dizaines de nanomètres et le dixième de micron. Si de nombreuses études (2-6) ont également été menées sur des particules d'un ordre de grandeur très petit (dans la gamme entre 1 et 100 nm), rares sont cependant les applications industrielles qui les exploitent. La raison est que ces matériaux bien que susceptibles de comportements originaux et d'applications à larges débouchés dans le domaine de l'optique, de la catalyse, du magnétisme et du médical (7), se heurtent encore à deux grands problèmes liés à l'ingénierie et à l'association contrôlée de ces particules au sein de systèmes originaux nanostructurés que sont :

- les difficultés de manipulation et de conservation de ces poudres, soit pour éviter une détérioration de la composition chimique et de la structure des particules (oxydation, décomposition) ou pour simplement éviter une agglomération ou croissance progressive des cristallites,

- les difficultés d'assemblage contrôlé de ces particules, que ce soit en réseaux à 2 et 3 dimensions pour avoir un comportement collectif original de particules individuelles aux propriétés déjà spécifiques ou pour les inclure à l'intérieur de matrice ou les diriger et fixer en des points spécifiques d'une microstructure existante

caractéristiques nouvelles. L'association de particules ou de composés de différentes natures peut ainsi être recherchée si l'on souhaite conférer aux nanoparticules des propriétés mixtes, non présentes dans un seul composé.

Les nanosciences connaîtront des applications dans de nombreux domaines à l'avenir, tels que les nanoparticules dans les matériaux composites, le recours aux nanotechnologies dans les édifices « intelligents », l'utilisation des nanostructures dans les dispositifs et traitements médicaux, etc...

D'ailleurs, les biologistes se penchent sur les phénomènes naturels qui se produisent à l'échelle nanométrique tels que la composition et la résistance structurelle. Ceci soulève la possibilité d'adapter de tels systèmes visant à l'élaboration de nanostructures.

Les nanoparticules sont à l'interface entre les molécules et les solides métalliques. Leur taille est comprise quelques nanomètres et quelques centaines de nanomètres, ce qui leur permet d'être originales tant au niveau de leur arrangement atomique que de leur structure électronique et de la disposition de l'interface (7).

La taille des suspensions colloïdales de solide dans un milieu liquide, pouvant être à l'origine de nanoparticules, est contrôlée en faisant varier certains facteurs comme la concentration en électrolytes dans la solution, le pH ou encore la présence de stabilisants. Le contrôle de la taille des nanoparticules est nécessaire pour optimiser la stabilité de la dispersion, la plus homogène possible, des particules solides dans le liquide.

I.1.2. Matériaux hybrides

Les matériaux hybrides résultent de l'association de composés de natures chimiques différentes (8), formant ainsi une entité mixte bénéficiant de propriétés originales.

Classiquement, ces matériaux sont formés par l'incorporation au sein d'une matrice inorganique d'un certain nombre de molécules organiques. Si celles-ci sont uniquement piégées dans la matrice par des interactions faibles (liaisons hydrogène, Van Der Waals...), le composé est dit hybride de classe I. Si au contraire elles sont liées par des liaisons covalentes au réseau inorganique, le composé est alors hybride de classe II.

L'intérêt majeur de ces composés est d'allier les propriétés de la matrice inorganique (mécaniques, magnétiques, électriques, optiques,...) à celles des molécules organiques (réactivité, taille et forme des molécules). Ces dernières ajoutent aux propriétés de la matrice inorganique, des propriétés spécifiques telles que la réactivité chimique, l'amélioration de la

solubilité dans certains solvants et des propriétés physiques par exemple la fluorescence pour la détection. Ce nouveau type d'entités est situé à l'interface entre la chimie organique et la chimie inorganique. La recherche s'est considérablement développée lors de cette dernière décennie. Entre autres applications, nous pouvons citer notamment :

I.1.2.1 Les capteurs chimiques

L'objectif d'un capteur chimique est de donner une réponse rapide, réversible, sensible et sélective à une excitation quelconque. Les matériaux hybrides permettent de répondre parfaitement à ces impératifs et sont donc de plus en plus utilisés : ainsi, par exemple un matériau à base de silice greffée par des éthers en couronnes permet de complexer sélectivement certains cations métalliques (9).

I.1.2.2 Les matériaux poreux

Une grande difficulté en ce qui concerne l'élaboration de matériaux poreux est le contrôle du nombre, de la taille et de la forme des pores. L'utilisation de matériaux hybrides permet de maîtriser ces différents paramètres en ajustant la taille et la forme des molécules organiques insérées à celles souhaitées des pores.

I.1.3. Les nanoparticules hybrides

Ces composés nouveaux sont issus du mariage entre les nanotechnologies et les matériaux hybrides. Ils sont élaborés par l'association et la structuration à une échelle principalement inférieure à 50 nanomètres, de composés minéraux et organiques; c'est justement cette gamme de taille pour laquelle la modification des propriétés liées à la limitation dimensionnelle est la plus spectaculaire. Généralement, les nanoparticules sont constituées d'un cluster central formé par l'agencement de molécules inorganiques. Ensuite le greffage de tels clusters par des molécules organiques permet, par l'ajustement des caractéristiques de la surface, à la fois de conférer aux nanoparticules des propriétés superficielles spécifiques (adsorption, polarisation, biocompatibilité,...) et d'optimiser, dès l'élaboration, les futures étapes d'ingénierie de ces nanoparticules.

Si les molécules organiques sont simplement adsorbées sur le cluster, nous parlerons de composé de **classe I**. Si elles sont réellement liées par liaison forte, nous parlerons alors de composé de **classe II** (figure B.1).

Les nanotechnologies et les matériaux hybrides sont deux domaines de recherche particulièrement prometteurs et en pleine expansion. Les nanoparticules hybrides sont issues

du mariage entre ces deux domaines scientifiques et ouvrent des perspectives très encourageantes.

Le développement des études sur ces composés que forment les nanoparticules hybrides organiques/inorganiques, cherchera à lever ;

- les limitations des combinaisons des propriétés des nanoparticules à un seul composé soit en réalisant des particules qui se présentent directement sous la forme de composites minéraux aux propriétés différentes (par exemple un composé magnétique et un composé luminescent) soit en greffant à la surface des nanoparticules minérales des groupements organiques qui pourront eux-mêmes servir de support à d'autres molécules fonctionnelles (application dans le domaine médical, du mouillage forcé,...),

- les difficultés de manipulation des nanoparticules, des greffages adaptés devraient permettre (i) une meilleure protection contre l'oxydation ou toute autre réactivité chimique vis-à-vis de l'extérieur, (ii) un contrôle de la taille, de la croissance et des modifications de forme en vieillissement, (iii) une meilleure approche du comportement colloïdal des nanoparticules pour une stabilisation, extraction ou mise en forme ultérieure (maîtrise des charges et interactions de surface), enfin (iv) une possibilité de purification et l'accès à des dispersions de taille quasi parfaites,

- les difficultés de former des architectures maîtrisées de matériaux massifs (i) par auto-assemblage selon des réseaux bi et tri-dimensionnels : en utilisant des hybrides, l'existence de deux interactions antagonistes, l'une provenant de la partie minérale et l'autre de la partie organique (contrôle strict des forces entre particules), ou en utilisant les fonctionnalités organiques pour contrôler l'association des particules entre elles, (ii) par fixation préférentielle de nanoparticules sur des sites déterminés.

Les études sur la formation de liaisons stables organiques-inorganiques et sur la caractérisation de telles nanoparticules restent encore très délicates. Ce travail sera centré essentiellement sur la synthèse et la mise en œuvre d'une méthodologie d'étude des objets hybrides. L'objectif est de comprendre et de contrôler le greffage de particules organiques complexes sur des nanoparticules minérales afin d'explorer, en général, de nouveaux développements : optoélectronique, stockage énergétique, catalyse, magnétisme et biomédical. Un des objectifs sera de valider la faisabilité des concepts d'application de cette nouvelle famille de matériaux. Quatre domaines peuvent être particulièrement abordés : le stockage ou dissipation d'énergie par mouillage forcé, le développement de nouveaux composants pour

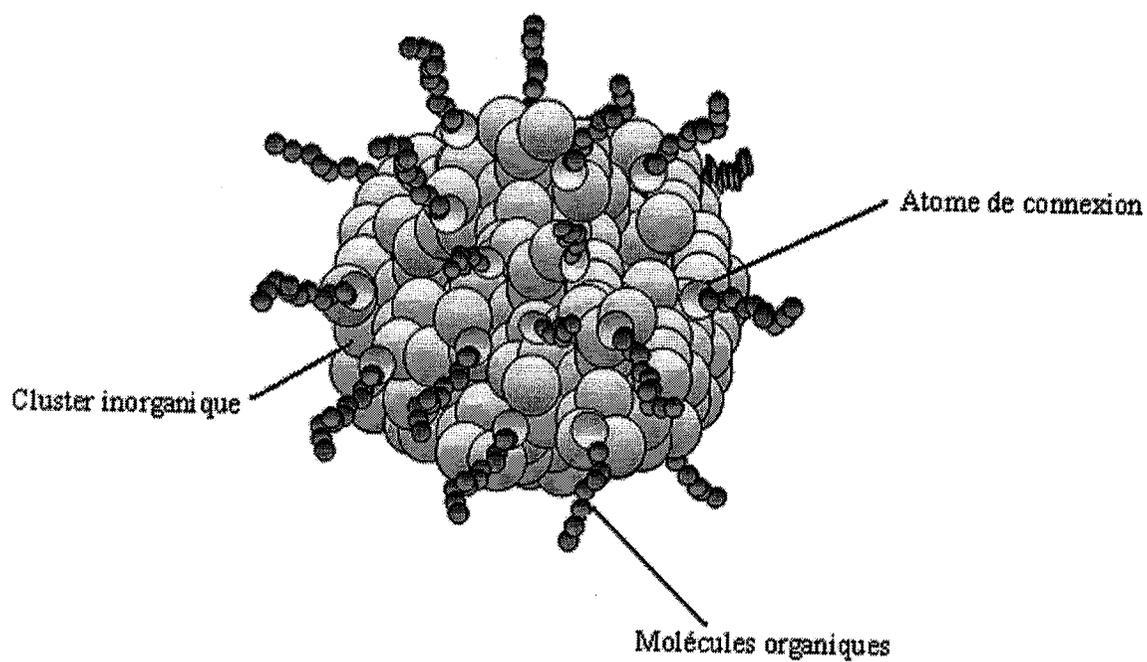


Figure B.1 : nanoparticule hybride de classe I ou II selon la nature de la liaison entre l'atome de connexion et la nanoparticule.

l'optoélectronique, la catalyse et enfin celui qui sera visé dans cette étude, l'utilisation des nanoparticules hybrides organiques/inorganiques comme vecteurs ou sondes pour une application originale biomédicale.

I.1.4. Nanohybride d'or

Nous avons choisi de synthétiser la partie inorganique du nanohybride à base d'or, et ce pour diverses raisons. Essentiellement, l'or est biocompatible et présente un seuil de tolérance élevé même par rapport aux métaux les plus répandus dans l'organisme (comme Na^+ , Fe^{2+} ...). Les particules d'or colloïdales présentent des propriétés intéressantes comme marqueurs (70) et la modification de leur surface et donc de leur propriétés, peut être réalisée par greffage de différents espaceurs organiques thiolés (21). La synthèse de nanoparticules d'or est bien connue et décrite dans la littérature, ce qui constitue un atout non négligeable.

Les « nanoparticules hybrides » ou plus communément appelées « nanohybrides » désignent des nanoparticules inorganiques d'or associées à des composés organiques. Leur utilisation s'est considérablement développée au cours de cette dernière décennie surtout dans le domaine des semi-conducteurs ou des bio-nanoréacteurs (10,11).

Des biomolécules telles que la Streptavidine, des peptides, l'immunoglobuline ou d'autres protéines ont notamment été employées pour des applications pharmaco chimiques.

Le greffage de ces composés à la surface de nanoparticules d'or repose essentiellement sur la liaison Or-Souffre (Au-S). Pour l'immunoglobuline (IgG), qui possède une fonction thiol présente dans le résidu cystéamine, une simple mise en contact avec les nanoparticules d'or permet de préparer les nanohybrides.

Le greffage direct des molécules actives sur des nanoparticules déjà fonctionnalisées par des molécules appelées « espaceurs » peut être réalisé. Ces molécules servent aussi à stabiliser les nanoparticules d'or en empêchant toute agrégation. La fonctionnalisation ultérieure s'effectuera par une réaction de substitution à la surface de la particule.

La nature exacte de la liaison entre les molécules organiques et la nanoparticule n'est cependant pas bien connue. De nombreux problèmes tels que des réactions d'échanges espaceurs-composés à la surface des colloïdes ou des phénomènes d'agréations incontrôlables limitent actuellement le développement des nanohybrides dans le domaine biomédical.

De plus la bifonctionnalisation de particules inorganiques conduit souvent à la dégradation et/ou à l'inactivation de la biomolécule sans que ce phénomène puisse être expliqué. La synthèse de nanohybride d'or de stochiométrie contrôlée constitue donc un challenge pour l'ingénierie moléculaire (12).

I.1.5. Les objectifs espérés

Dans cette étude, nous souhaitons par la synthèse, la fonctionnalisation et la caractérisation des nanoparticules d'or, contribuer à leur mise à profit dans diverses situations notamment dans les applications à visée thérapeutique.

I.1.6. Revue bibliographique

a) Nanoparticules métalliques pour le ciblage des tumeurs

Au cours de la dernière décennie, **Patrick COUVREUR** pharmacien et professeur à l'université Paris Sud Orsay fut le premier à introduire le concept de vecteur nanoparticulaire biodégradable pour l'administration de molécules biologiquement actives. C'est le domaine des nanotechnologies qui permet de vectoriser, de distribuer un médicament ou un principe actif dans l'organisme en maîtrisant non seulement son devenir tissulaire mais également cellulaire et subcellulaire. A l'heure actuelle, la synthèse de nouvelles molécules se fait de manière à ce qu'elles puissent avoir une action sur un récepteur à l'échelle moléculaire. Ces molécules ont une structure chimique bien particulière et leurs caractéristiques physico-chimiques par exemple le pKa, la lipophilie, sa capacité à se fixer à des lipoprotéines vont déterminer son devenir biologique et sa distribution dans l'organisme. En laboratoire, on peut avoir une molécule active, particulièrement efficace sur des cellules cérébrales par exemple, mais in vivo, cette molécule peut être complètement inactive en raison de ses caractéristiques physico-chimiques. Elle ne va pas diffuser à travers la barrière hémato-encéphalique et donc atteindre les récepteurs encéphaliques. Depuis un certain nombre d'années, pour résoudre le problème de distribution de médicament dans l'organisme, la notion de vectorisation est développée. L'idée est d'associer la molécule biologiquement active, à une espèce de transporteur extrêmement petit, ayant des caractéristiques de taille, d'hydrophylité ou de lipophilité, des caractéristiques de charges et de stabilité. Ce système permettra de distribuer le médicament non pas en fonction des caractéristiques physico-chimiques du médicament mais en fonction de celle du vecteur. La maîtrise des caractéristiques notamment de surface de ces vecteurs permet de s'affranchir des problèmes de distribution naturelle

d'une molécule et au contraire de cibler cette molécule vis-à-vis d'un organe, d'un tissu ou d'une cellule, grâce au transporteur ou vecteur utilisé.

Ces transporteurs ou vecteurs de médicaments sont issus des nanotechnologies, ce sont des systèmes submicroscopiques, ultra dispersés et ne sont visibles qu'en microscopie électronique.

Après administration intraveineuse des nanoparticules chez l'animal, deux organes vont les capter, essentiellement les macrophages du système réticulo-endothélial du foie et de la rate. **P. Couvreur** a conclu qu'il avait des navettes extraordinaires pour amener le médicament sélectivement au niveau du foie et traiter un certain nombre de pathologies hépatiques, qui sont extrêmement graves tels que les métastases hépatiques. Ainsi, un médicament actif sur des cellules métastatiques, associé à des nanoparticules pour être dirigé, concentré au niveau du foie et être finalement plus efficace sur ces métastases. Les résultats obtenus sur un modèle pré clinique d'animaux de laboratoire sont très intéressants. Le professeur **P. Couvreur** a bien montré l'efficacité de la doxorubicine lorsqu'elle est greffée sur un vecteur nanoparticulaire. Dans ce cas, pour une dose aussi faible que 2,5 mg/kg, une inhibition très importante du nombre de métastases hépatiques est observée, et à 5 mg/kg pratiquement la totalité des métastases hépatiques sont traitées, et entre 7 à 10 mg/kg on supprime complètement la métastase hépatique. En plus, la mortalité d'animaux par toxicité cardiaque de la doxorubicine est évitée car elle est concentrée dans le tissu hépatique. Ceci permet d'une part d'être moins toxique et donc de pouvoir administrer des doses plus importantes et d'autre part d'être beaucoup plus efficace.

Ces vecteurs vont dans le foie mais pour cibler d'autres tumeurs que celles localisées dans la sphère hépatique, il est indispensable d'empêcher la capture de ces nanoparticules par le foie. Il a été montré que le concept physico-chimique de répulsion stérique, en d'autres termes en décorant la surface des nanoparticules par des polymères hydrophiles et flexibles (le polyéthylèneglycol PEG), la surface de la nanoparticule devient parfaitement lisse et les protéines plasmatiques ne s'adsorbent pas. La répulsion stérique empêche les phénomènes d'opsonisation. Les nanoparticules sans PEG en surface disparaissent très rapidement de la circulation générale parce qu'elles sont prises par le foie mais une fois décorées par le PEG ou pégylées elles vont résider beaucoup plus longtemps dans la circulation générale et ne sont pas reconnues par les macrophages du foie et vont être capables d'extravaser, de diffuser de manière absolument sélective au niveau de la tumeur à travers l'endothélium vasculaire tumoral hyper-perméable.

Un autre exemple est celui du ciblage des cellules qui hyperexpriment de l'acide folique qui est une vitamine B9. Par exemple dans le cancer de l'ovaire, on sait que ces cellules hyper-expriment ce récepteur et une fois reconnu par son espaceur c'est-à-dire par l'acide folique, le complexe récepteur espaceur est internalisé par la cellule. Ceci va permettre de faire rentrer dans la cellule des particules décorées par exemples par des espaceurs l'acide folique et donc c'est l'approche qu'il envisage pour développer des nanotechnologies qualifiées de troisième génération et qui ont à leur surface un adressage moléculaire via ce fameux acide folique.

Les particules seront administrées par voie intraveineuse, et de ce fait doivent être tolérées par l'organisme, suivies par des moyens de détection, cibler sélectivement un organe, un tissu ou une cellule et avoir un effet thérapeutique.

Les nanoparticules administrées auront une extravasation favorisée par leur petite taille et se répandent donc facilement dans l'organisme. Elles vont se fixer préférentiellement sur les récepteurs spécifiques des cellules visées avant d'y être incorporées par endocytose. Une accumulation des nanoparticules dans ces cellules sera détectée par émission lumineuse. Puis les cellules tumorales sont détruites par échauffement local provoqué par un traitement physique par exemple.

I.2. Le chlorure de lissamine rhodamine B sulfonyle (sulforhodamine)

En biologie, la détection in situ et la recherche de nouveaux dispositifs électroniques où celui des protéines fluorescentes utilisées comme marqueurs de nucléotide font généralement appel aux molécules fluorescentes (13). Par exemple, en immunofluorescence, les antigènes sont détectés en utilisant des anticorps marqués avec des fluorochromes. Lorsque ces derniers sont illuminés par un rayonnement de courte longueur d'onde, ils émettent un rayonnement lumineux de longueur d'onde plus grande et visible avec un microscope approprié. Les structures cellulaires ayant fixé ces anticorps fluorescents sont ainsi détectables et ont l'aspect de taches brillantes, colorées, le fond de la préparation étant noir. L'utilisation d'un fluorochrome permet d'avoir une double coloration sur une même préparation cellulaire, mais aussi sur une même cellule.

L'immunofluorescence est une technique très sensible. De toutes les méthodes immunocytologiques, elle est la plus utilisée. Elle a contribué à nos connaissances actuelles

dans divers domaines de la biologie. Comparée aux autres méthodes, elle est certainement la plus simple et la plus rapide.

I.2.1. Rôle de la molécule fluorescente

Le chlorure de lissamine rhodamine B sulfonyle est un des fluorochromes les plus utilisés en raison de ;

- son quantum d'efficacité élevé ($\eta=0,99$),
- son absorption et émission dans le domaine du visible (500-600 nm),
- de sa structure chimique qui permet sa fonctionnalisation simple
- et de la stabilité de ses propriétés optiques après greffage (14).

I.2.2. Utilisation dans la vectorisation

La sulforhodamine B intensément colorée et hydrosoluble est particulièrement utile pour le criblage in vitro de médicaments anticancéreux dans les cellules. La mesure de l'absorbance de la sulforhodamine B constitue une méthode analytique exacte et reproductible. Elle est utilisée par exemple, dans la quantification des protéines dans les cellules de culture. Le colorant se lie aux bases des acides aminés des protéines cellulaires. Ainsi, la mesure colorimétrique fournit une évaluation de la masse totale de protéines liées par rapport au nombre de cellules. La méthode est simple et reproductible.

I.2.3. greffage de la rhodamine

Le défi actuel est l'augmentation de l'efficacité de la détection. Parmi les différentes approches essayées, la spectroscopie Raman exaltée de surface est certainement celle qui suscite l'attention la plus considérable.

Cependant une approche alternative peut être, aussi intéressante et qui consiste à greffer plusieurs molécules fluorescentes sur le même édifice nanoparticulaire, ce qui permettrait d'augmenter le seuil de détection par le nombre de fluorophores greffés ou adsorbés efficacement sur la nanoparticule. L'élaboration des nanoparticules d'or avec des fluorophores greffés ou adsorbés sur la surface par l'intermédiaire de thiols appropriés permet de prouver que (i) il est possible de greffer ou d'adsorber des quantités significatives de lissamine rhodamine B sur la surface des nanoparticules d'or colloïdales et (ii) cette opération est corrélée avec la possibilité d'optimiser la détection du nucléotide éventuellement attaché sur la nanoparticule.

Cette tentative est rendue plus réaliste puisqu'on a récemment montré que la chimisorption des colorants fluorescents sur des nanoparticules d'or n'était possible que lorsque les nanoparticules s'agrègent ou sont immobilisées sur un substrat de verre. Des tentatives de greffage direct de colorants fluorescents sur des nanoparticules d'or en solution ont été rapportées dans la littérature. Cependant, ces études concernent des particules d'or trop petites pour adsorber plusieurs colorants, ou des molécules fluorescentes qui perdent leurs propriétés de luminescence au contact avec les nanoparticules. L'étude que nous allons présenter dans ce qui suit, est alors la première à considérer la possibilité de fixation de colorant sur des nanoparticules d'or pour l'augmentation de l'efficacité de détection.

La sulforhodamine est dotée d'une fonction chlorosulfonyl fortement réactive avec une fonction alcool (7). Elle n'est pas photodégradable et n'est pas affectée par des changements de pH entre 4 et 10. Ceci constitue un avantage important par rapport aux applications biologiques. D'après sa formule, elle apporterait en plus, une aide à la stabilisation des nanoparticules par gêne stérique et par répulsion électrostatique du fait de sa fonction sulfonate SO_3^- , bien qu'il y ait des noyaux aromatiques hydrophobes (Figure B.2).

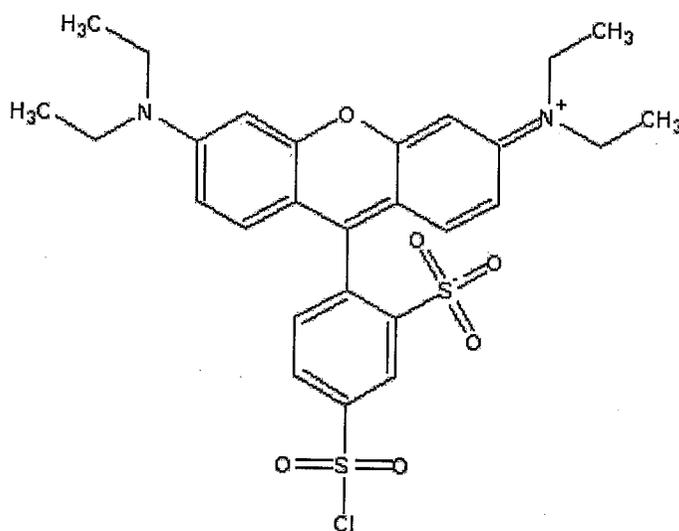


Figure B.2 : Le chlorure de lissamine rhodamine B sulfonyle

Formule brute : $\text{C}_{27}\text{H}_{29}\text{ClN}_2\text{O}_6\text{S}_2$

Nom selon la nomenclature : Ethanaminium, N-(9-(4-(chlorosulfonyl)-2-sulfofenyl)-6-(diéthylamino) -3H-xanthen-3-ylidène)-N-éthyl, hydroxide

Absorbance $\approx 568 \text{ nm}$

Emission \approx 583 nm

Solvant : Méthanol

Masse moléculaire : 577.11 g/mole

I.3. Synthèse et caractérisation de nanoparticules d'or

La synthèse et la caractérisation de nanoparticules d'or monodisperses fonctionnalisées de manière contrôlée et homogène sont justifiées par leurs nombreuses applications dans le domaine de l'imagerie, du diagnostic, en électronique, en optique, en catalyse ou en bio-ingénierie (15-18).

Deux types de techniques de synthèse de nanoparticules d'or ont été mis au point. Le premier utilise des procédés de synthèse basés sur les propriétés physiques de l'or et l'autre fait appel à un réducteur chimique. Dans les deux cas, les nanoparticules obtenues ne sont pas stables dans le temps et leur préparation nécessite l'emploi de stabilisants qui empêchent leur agrégation. Ces stabilisants sont généralement des dérivés contenant un atome de soufre en bout de chaîne comme les thiols (19), les disulfures (20-22), les sulfures (23), les thiosulfates (24) ou les xanthates (25). Les carbonates, les phosphates, les amines, les phosphines ou encore les silanes sont moins utilisés (26-28).

Notre objectif est l'élaboration de nanoparticules constituées d'un cluster inorganique, composé de plusieurs centaines d'atomes d'or (Au_0) organisées en réseau cristallin en empilement cubique faces centrées CFC (29), de taille homogène et stables dans le temps.

Nous avons donc axé les rappels bibliographiques sur la préparation de particules d'or stabilisées par de petites molécules organiques pouvant avoir des fonctionnalités différentes et complémentaires et comportant un groupement thiol. Ce sont les dérivés soufrés ou thiolés. Ces espaceurs sont en effet les plus utilisés avec l'or en raison de la forte affinité de ce métal pour le soufre. La liaison Or-Soufre ($Au-S$) est qualifiée des fois de « covalente » en raison de sa grande stabilité mais en réalité elle ne l'est pas. La nature de cette liaison n'est pas bien connue. De nombreuses équipes tentent encore actuellement de définir le type d'interaction entre ces deux éléments c'est-à-dire l'or et le soufre (30).

Dans cette étude, le cluster métallique formé par les molécules d'or est assimilé à une sphère. Une distinction sera faite entre le nombre total d'atomes contenus dans une particule et le nombre d'atomes de surface. Ces derniers étant les seuls à pouvoir donner une liaison

avec un espaceur soufré. Il convient aussi de préciser que les atomes d'or de surface ne sont pas tous accessibles. D'après une étude menée par Schaaf (31) seulement 33 % des atomes de surface sont réellement accessibles. Selon Paik (32) cette valeur est comprise entre 25 et 33%.

Nous avons retenu, dans le cadre de cette étude la valeur de 33 % des sites de surface accessibles.

I.3.1. Les méthodes physiques de synthèse de nanoparticules d'or

I.3.1.1. Vaporisation du métal

C'est une méthode largement utilisée pour la préparation de film d'or et rarement pour celle des nanoparticules d'or. Cette méthode repose sur un procédé de vaporisation de l'or métallique puis sa recondensation au contact d'un courant d'hélium à température ambiante. Les clusters sont alors formés avant d'être recristallisés, en phase gazeuse. Ils sont ensuite mis en contact avec des thiols puis collectés sous forme d'une solution colloïdale. Les flux gazeux d'or et d'hélium permettent le contrôle de la taille des clusters. Des nanoparticules d'or de diamètre compris entre 1 et 20 nm peuvent être préparées par cette technique avec une déviation standard de 0,5 nm, soit 10 %.

I.3.1.2. L'irradiation laser

L'irradiation laser d'un métal immergé dans un milieu aqueux ou organique, constitue une méthode permettant de préparer des nanoparticules en solution. Par exemple, un laser de longueur d'onde $\lambda=1064$ nm permet la préparation de nanoparticules de taille de quelques dizaines de nanomètre (33).

Il a également été montré que des particules qui possèdent une bande d'absorption correspondant à l'énergie du laser, peuvent voir leur taille diminuer sous l'effet de ce même rayonnement. Ainsi, des nanoparticules d'or, ayant une bande d'absorption à 520 nm et une taille initiale de 40 nm, sont soumises au rayonnement d'un laser Nd:Yag dont la longueur d'onde est $\lambda=532$ nm verront leur taille réduite à 10 nm. Par cette technique, des particules d'or de 8 nm ont été préparées, en solution aqueuse contenant le dodécylsulfate de sodium SDS comme agent stabilisant (34). La concentration de la solution d'or est cependant très importante lorsqu'elle dépasse une certaine valeur. Une agglomération irréversible des nanoparticules se produit. Cette technique est peu utilisée pour la préparation de nanoparticules de taille inférieure à 10 nm.

I.3.1.3. Les ultrasons, la radiolyse et les réductions photochimiques

Ces trois méthodes sont regroupées ensemble car elles utilisent un radical alcool pour la réduction du sel d'or AuCl_4^- .



Equation B.1 : formation de l'espèce réductrice

Le mécanisme de réduction (3) du sel d'or ($3+$) en Au (0) est :



Equation B.2 : Réduction du sel d'or ($3+$)

a) Les ultrasons

Le passage des ultrasons à haute intensité au travers de l'eau peut former des cavités acoustiques. Des petites bulles de gaz se forment à partir de ces cavités, croissent et collapent violemment. La compression quasi-adiabatique des gaz à l'intérieur des microbulles dans l'eau aboutit à leur implosion générant alors des ions hydroxyles qui, par réaction avec l'alcool présent dans le milieu, vont donner le radical alcool, agent réducteur permettant la réduction de AuCl_4^- .

L'emploi des ultrasons permet d'obtenir des nanoparticules d'or dispersées dans un solvant aqueux contenant un alcool. La taille des nanoparticules dépend de la concentration et de la longueur de la chaîne alkyle de l'alcool. La réduction est moins efficace en présence de méthanol, d'éthanol, de n-propanol ou de n-butanol qu'en présence de n-pentanol. L'ajout du dodécyle sulfate de sodium, stabilisant les nanoparticules formées, favorise également la réduction alors qu'un électrolyte tel que NaClO_4 tend à l'inhiber. Cette méthode donne accès à des particules de taille comprise entre 10 et 25 nm.

b) La radiolyse

C'est une technique basée sur l'utilisation d'une source radioactive le Cobalt 60. L'irradiation gamma permet de générer l'espèce réductrice. La réduction est réalisée dans une solution aqueuse contenant le sel d'or ($+3$) et un alcool (méthanol, alcool poly(vinyle),...)

stabilisant les nanoparticules formées. Cette technique permet la préparation de particules d'or de taille comprise entre 2 et 15 nm (35).

c) La réduction photochimique

La réduction de l'ion chloraurate AuCl_4^- par la voie photochimique est possible dans le cas où les conditions de la synthèse permettent un haut degré de dissociation de l'ion AuCl_4^- . La présence de radicaux photogénérés par réaction avec le solvant est également indispensable. Les longueurs d'onde des rayonnements utilisés sont généralement voisines de 365 ou 254 nm. La photoréduction de AuCl_4^- est réalisée en milieu aqueux contenant, en plus du sel d'or (+3), du cyanure de sodium, un stabilisant (un dendrimère : le polyamidoamine) ou un mélange de propan-2-ol et d'acétone (36). Les nanoparticules préparées par cette méthode ont des tailles comprises entre 2 et 12 nm. Les agents stabilisant les nanoparticules ne sont pas utilisés.

I.3.2. Les méthodes chimiques de synthèse de nanoparticule

De nombreuses techniques permettent la synthèse par voie chimique de nanoparticules d'or principalement à partir du tétrachloraurate de sodium tétrahydrate $\text{HAuCl}_4 \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$. Le couple $\text{AuCl}_4^- / \text{Au} (0)$ a un potentiel rédox de 0,994 V, le sel d'or (+3) est donc facilement réduit en $\text{Au}(0)$.

Les principaux agents réducteurs cités dans la littérature sont le citrate (37) ou le borohydrure de sodium (38). Des composés tels que le borohydrure de triéthyllithium, le chlorure de tétrakis (hydroxyméthyl) phosphonium, l'hydroxylamine, et l'acide ascorbique, apparaissent de plus en plus comme une alternative au citrate ou au borohydrure de sodium. Des agents réducteurs tels que l'hydrazine (39), le thiocyanate de potassium (40), le diméthylaminoborane (41), le poly(dithiafulvène) (42), l'hexadécylaniline (43), le bitartrate de potassium (44), le tripeptide glutathione (45) ou l'acétylacétonate de sodium (46) ne sont employés que dans quelques cas. Une biréduction originale par une plante, la Fungus *Verticillium*, a également permis la synthèse de nanoparticule d'or (47). Les hydrures simples tels que (LiH, NaH ou KH) ne sont pas employés dans la préparation de nanoparticules métalliques (48).

I.3.2.1. Réduction utilisant le borohydrure de triéthyllithium

Cette méthode de préparation de nanoparticules d'or utilisant le borohydruure de triéthyllithium (LiEt_3BH) pour la réduction de Au (III) en Au (0) est récente (49). La taille des clusters formés est comprise entre 2 et 15 nm.

L'intérêt de cette méthode est que les nanoparticules obtenues sont stabilisées par une matrice polymérique (poly(4-méthyl-1-ène) présente au cours de la réaction de réduction. La synthèse peut avoir lieu dans des solvants organiques tels que le THF. Cette méthode est comparable à celle utilisant le NaBH_4 en milieu monophasique. Cette dernière sera développée ultérieurement.

I.3.2.2. Réduction utilisant le chlorure de tétrakis (hydroxyl) phosphonium

Le chlorure de tétrakis (hydroxyl) phosphonium est utilisé pour la synthèse de nanoparticule d'or en milieu basique aqueux $(\text{CH}_2\text{OH})_4\text{NCl}$.

L'agent responsable de la réduction du sel d'or Au(3+) en Au(0) est la tris(hydroxyméthyl)-phosphine formée in situ [1]. Cette phosphine permet la réduction de l'eau en hydrogène [2], et c'est l'hydrogène qui transforme le sel d'or Au(III) en Au(0).



Equation B.3 : formation de l'oxyde de tris(hydroxyméthyl)-phosphine

I.3.2.3. Réduction utilisant l'hydroxylamine ou l'acide ascorbique

L'hydroxylamine NH_2OH ou l'acide ascorbique (Figure B.3) peuvent également être utilisés pour la préparation de nanoparticules d'or. La synthèse s'effectue en deux étapes dites « seeding growth ». Ces réducteurs interviennent dans la seconde étape de formation des clusters.

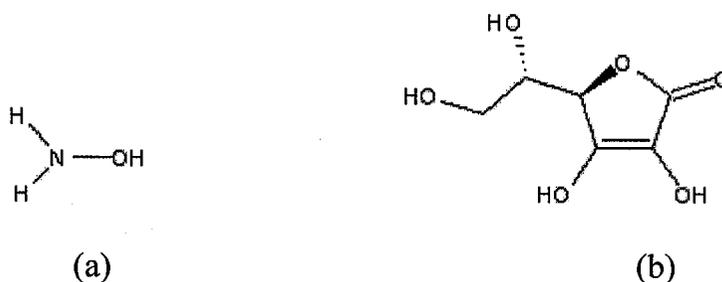


Figure B.3 : (a) hydroxylamine, (b) acide ascorbique

I.3.2.4. Réduction utilisant le borohydrure de sodium NaBH_4

Deux types de synthèse peuvent être réalisées en utilisant le NaBH_4 comme agent réducteur. Une synthèse en milieu biphasique et l'autre en milieu monophasique. Quel que soit la nature du milieu utilisé, le borohydrure de sodium, stabilise peu ou pas les nanoparticules formées. La présence d'un agent de coordination au cours de la réduction est donc indispensable pour éviter l'agglomération des monoclusters formés.

a) Milieu biphasique

La réduction d'un sel d'or ($3+$) par le NaBH_4 à l'interface d'un système biphasique, généralement constitué d'eau et de toluène. La synthèse des nanoparticules d'or stabilisées par des molécules organiques thiolées a été réalisée en 1994 par Mathias Brust (50). Il a utilisé un système à deux phases (eau-toluène) dans lequel l'ion AuCl_4^- est réduit en présence d'alcane thiols. Les nanoparticules obtenues ont des diamètres compris entre 1 et 3 nm et sont caractérisées par microscopie électronique à transmission TEM, spectroscopie IR, UV-Visible, X-ray photoelectron microscopy XPS.

Selon C.D. Bain (51), les molécules organiques de thiols sont absorbées sur la surface du noyau métallique en formant un film en mono couche et cela pour trois considérations;

- l'or (Au) est un métal relativement inerte, il résiste à la contamination atmosphérique,
- Il présente une interaction spécifique très forte pour les sulfures
- les alcane thiols à longue chaîne forment un film mono couche uniforme.

Dans le protocole expérimental décrit par M. Brust (50), la synthèse des nanoparticules d'or consiste en l'extraction de l'ion métallique de la phase aqueuse vers la phase organique (toluène). La réaction de réduction aura lieu dans la phase organique par NaBH_4 en présence de molécules organiques d'alcane thiols. Le greffage de ces molécules sur la surface métallique et l'évolution de la taille des nanoparticules ont lieu simultanément. Ainsi, il a combiné dans un système à deux phases et en une seule étape, la préparation de solutions colloïdales inorganiques (métallique) où une solution aqueuse de sel d'or est réduite par le phosphore en carbone disulfide en obtenant une solution colorée de particules d'or dispersées avec la formation d'une mono couche d'alcane thiols sur la surface des particules d'or.

La réduction nécessite un agent de transfert de phase, généralement le bromure de tétra-octylammonium et se déroule en deux étapes (Equation B.4).

La première étape correspond au transfert du sel d'or de la phase aqueuse vers la phase organique [1] et la deuxième correspond à la réduction des particules d'or à l'interface des phases aqueuse et organique [2].



Equation B.4: Equation bilan de la réduction de HAuCl_4 en milieu biphasique

L'intérêt de cette technique de préparation réside en trois points essentiels;

- c'est une synthèse relativement simple permettant l'élaboration de nanoparticules métalliques de taille contrôlée (entre 2 et 10 nm), à surface fonctionnalisée et propre puisque les sels issus de la réduction seront contenus dans la phase aqueuse et les clusters d'or seront présents dans la phase organique.

- la cinétique de l'évolution de la taille du nanocluster dépend des conditions réactionnelles et non pas de la cinétique de réduction des ions métalliques comme c'est généralement le cas dans les préparations colloïdales à phase condensée.

- les nanoparticules présentent une bonne stabilité et ne montrent aucun signe de décomposition ni d'agrégation après plusieurs semaines de conservation à l'air et à température ambiante.

Des thiols à chaîne alkyle (52), à chaîne aromatique (53), des dithiols (54), des sulfures (55), des dérivés aromatiques, des polymères (56,57), des phosphines (27), des dendrimères (61), ou des sucres ont été greffés, par ce procédé, sur nanoparticules d'or $\text{Au}(0)$. Il faut toutefois préciser que l'inconvénient majeur de cette méthode est que seuls les stabilisants solubles en milieu organique et insolubles en milieu aqueux peuvent être utilisés. Le contrôle de la taille des nanoparticules étant fonction du thiol présent dans la phase organique, une solubilité partielle en milieu aqueux pourrait conduire à la formation clusters inhomogènes.

Il est finalement important de noter que ce procédé est particulièrement adapté à la fonctionnalisation de nanoparticules d'or par des disulfures, NaBH_4 réduit les deux entités (22).

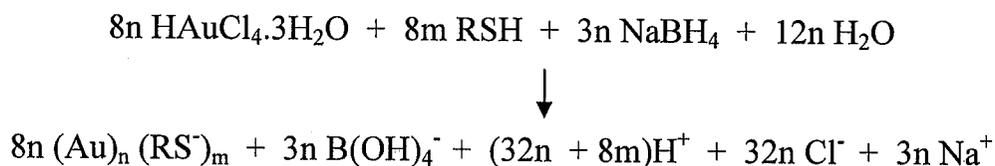
b) Milieu monophasique

La réduction, en milieu monophasique, est classiquement réalisée à température ambiante dans le méthanol. C'est toujours Mathias Brust (50) qui, une année plus tard (1995), a mis au point une nouvelle technique de synthèse des nanoparticules d'or fonctionnalisées, la réduction des ions tétrachloaurate et le greffage de molécules de thiols bifonctionnalisées sur la surface métallique, ont lieu simultanément.

Le produit de la synthèse est insoluble dans l'eau et dans les solvants non polaires mais se dissout bien dans les alcools, éthyle acétate et les solutions aqueuses alcalines (pH>12). Le produit dissout dans l'acétate d'éthyle peut être extrait par une phase alcaline puis ré-extrait par une phase organique après neutralisation de la phase aqueuse. Ceci montre bien que les fonctionnalités des molécules organiques de thiols sont localisées à la surface des nanoparticules d'or. Les échantillons destinés à l'analyse par TEM sont préparés par évaporation d'une goutte de la solution de propan-2-ol contenant les nanoparticules sur un film de carbone amorphe. Cette manipulation est très délicate.

La taille moyenne des nanoparticules d'or est comprise entre 2 et 15 nm. Toutefois pour le taux de greffage des thiols, la majorité des publications font état de l'utilisation de 3 équivalents de thiols par mole d'or (50).

La réduction d'un sel d'Au (+3) à l'aide de NaBH₄ est décrite par l'équation 5



Equation B.5: bilan de la réduction d'un sel d'Au (+3) par NaBH₄

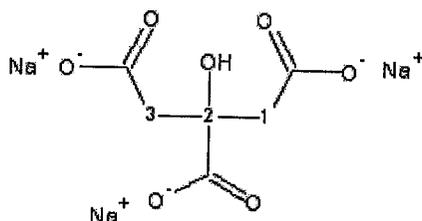
Seuls les thiols solubles dans le méthanol peuvent être utilisés. La stabilisation des nanoparticules d'or par un thiol qui ne possède pas une bonne solubilité dans le milieu de réduction conduit à la formation de particules de tailles très diverses et la synthèse n'est pas reproductible. La solubilité du thiol est donc un point important dont va dépendre la taille des nanoparticules d'or formées au cours de la réduction. Une caractéristique importante de cette méthode est la fonctionnalisation maximale des sites de surface accessibles par les thiols. Les particules formées peuvent acquérir une bonne stabilité.

Des phénomènes de désorption des thiols de la surface de la nanoparticule d'or ont cependant été observés et conduisent à la perte de la stabilité et donc à une agrégation irréversible des nanoparticules (58). Ce phénomène est plus important lorsque deux ou plusieurs thiols différents sont employés pour la fonctionnalisation. Le mécanisme exact de la désorption n'est pas connu et très peu de travaux décrivent l'utilisation simultanée de deux ou plusieurs thiols pour stabiliser des particules (59).

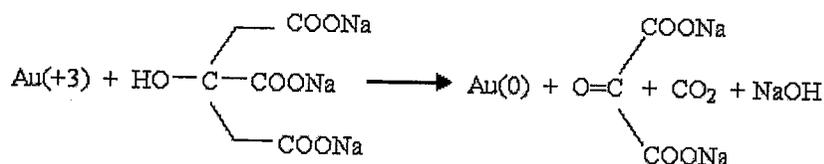
A partir de 1995, de nombreuses études s'appuyant sur la méthode de synthèse décrite par Brust, utilisant le borohydrure de sodium NaBH_4 pour la réduction de l'or(+3) en milieu monophasique ont été réalisées et portent sur le greffage d'alcanethiols (52), de thiols aromatiques (60), de dendrimères (61)...L'importance des nanoparticules d'or pour les applications en pharmacochimie et l'enjeu qu'elles représentent, ont conduit à leur fonctionnalisation en milieu aqueux ; par des protéines (62), des cyclodextrines (63), ou par des polymères hydrosolubles (64). En fin, il faut préciser que l'inconvénient de cette méthode, surtout pour les applications à visée médicale, est que les nanoparticules sont synthétisées dans le méthanol.

I.3.2.5. Réduction utilisant le citrate de sodium

Les nanoparticules préparées par la réduction de l'or à l'aide du citrate de sodium $\text{Na}_3\text{citrate}$ (Figure B.4 (a)) forment une solution aqueuse colloïdale (64).



(a) : 1, 2 et 3 sont des atomes de carbone



(b)

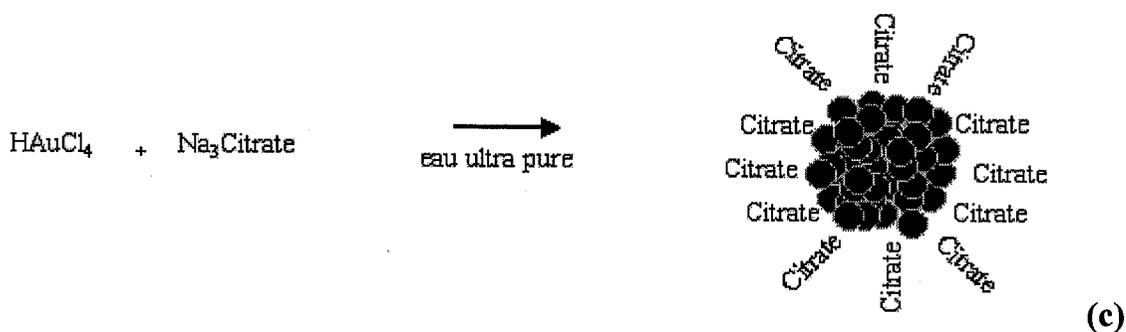


Figure B.4 : (a) Citrate de sodium ; (b) réaction de réduction de Au(+3) ; (c) schéma de la réduction et formation de cluster

Revue bibliographique

En 1973 une des premières études sur l'élaboration de particules sphériques monodisperses est effectuée par Frens G. (65). En exploitant les résultats obtenus par Turkevich (1951) il a conclu que la réduction du chlorure d'or par le citrate de sodium en solution aqueuse pouvait aboutir à un procédé très prometteur de préparation de suspensions monodisperses d'or ayant différents diamètres allant de 16 à 150 nm. La taille des particules dépend de la concentration du citrate de sodium. Elle est déterminée par microscopie électronique.

Durant les années 70 les particules colloïdales d'or ont été très utilisées dans le domaine de la cytochimie. Ces particules sont préparées par des procédés relativement simples et peuvent donner des liaisons avec des molécules biologiques telles que les protéines. En utilisant ce principe, J. W. Slot (66) a préparé des marqueurs biologiques à différentes dimensions pour l'étude immunocytochimique de tissus pancréatiques de rat, en fixant sur la surface du cluster d'or une protéine (staphylococcal protein A). Trois procédés sont décrits, aboutissant à des particules de 5, 12 et 16 nm où respectivement le phosphore blanc, l'ascorbate de sodium et le citrate de sodium sont utilisés pour la réduction du chlorure d'or.

En 1985, J. W. Slot (67) a décrit une nouvelle méthode de préparation de particules colloïdales d'or de diamètre compris entre 3 et 17 nm. Ces particules sont homodisperses (tailles homogènes). Plusieurs protéines sont greffées sur la surface du cluster d'or comme la protéine A (staphylococcal protein A). Le complexe formé s'avère stable pour une longue période et efficace pour l'affinité cytochimique. Dans le protocole expérimental, deux solutions sont préparées séparément. La première contient 1 ml de tétrachloroaurate à 1 %

dans 79 ml d'eau distillée, la deuxième est une solution réductrice obtenue par addition de 4 ml de tri-sodium citrate bihydraté à 5 ml d'acide tannique, 25 mM de carbonate K_2CO_3 complétée à 20 ml par de l'eau distillée. Le carbonate n'est ajouté que pour des volumes supérieurs à 0,5 ml d'acide tannique afin de compenser son effet acidifiant. Les deux solutions sont ensuite portées à 60 °C, ensuite rapidement mélangées en maintenant une agitation vigoureuse. Le temps de réaction de formation des particules se traduisant par un changement de coloration vers le rouge augmente lorsque la concentration de l'acide tannique diminue. En l'absence d'acide tannique, une heure est nécessaire avec une agitation vigoureuse à 60 °C pour que la réaction soit complète. L'effet de l'acide tannique sur la taille des particules d'or est étudié.

En 1995 Grabar K.C. (68) a repris le protocole décrit par Frens (65) en lui apportant quelques modifications. Toutes les solutions aqueuses sont préparées avec de l'eau tridistillée. La verrerie est soigneusement lavée par un mélange HCl et HNO_3 (3:1) et rincée par l'eau tridistillée. Dans un ballon d'un litre muni d'un réfrigérant, 500 ml d'une solution tétrachloroaurate est portée à ébullition avec une agitation vigoureuse, 50 ml d'une solution 38,8 mM de citrate de sodium est rapidement ajoutée, un changement de coloration du jaune au rouge est observée. L'ébullition est maintenue pendant 10 minutes et l'agitation pendant 25 minutes. La solution réactionnelle est refroidie à température ambiante ensuite filtrée sur membrane à 0,8 μm . La solution est caractérisée par absorption à 520 nm et par microscopie électronique à transmission (MET). La dimension des particules est en moyenne de $13 \text{ nm} \pm 1,7 \text{ nm}$ sur 100 particules considérées. Une deuxième méthode de préparation consiste à porter à ébullition dans un ballon d'un litre 500 ml d'une solution 0,01 % $HAuCl_4$ avec une agitation vigoureuse. A cette solution sont ajoutés 7,5 ml d'une solution de citrate de sodium à 1 %, la couleur du mélange vire vers le bleu en 25 secondes, le changement de coloration final vers le rouge-violet a lieu 70 secondes après. L'ébullition continue pendant 10 minutes. L'agitation est poursuivie pendant 15 minutes à température ambiante. L'analyse par TEM révèle que la taille moyenne des particules est de $18 \text{ nm} \pm 4,6 \text{ nm}$ sur 89 particules considérées. Le diamètre des particules dépend de la quantité de citrate de sodium ajoutée.

Le mécanisme de réduction de l'or (+3) par le citrate de sodium n'a pas été précisément déterminé mais il est fort probable qu'après attaque nucléophile de la fonction alcool du citrate sur $Au(+3)$, suivie d'une β élimination du carboxylate on aboutisse à un complexe d'or au degré (+1) et que ce dernier soit finalement réduit en $Au(0)$.

Cette réduction est généralement réalisée à 100°C et nécessite, selon les tailles de particules souhaitées, 0,43 à 2,1 équivalents de citrate (68). Les particules sont de tailles homogènes et très dispersées car la concentration en or est faible et ne doit pas excéder $5 \cdot 10^{-4}$ mol L⁻¹.

Le citrate, en plus de sa fonction de réducteur du sel d'or, stabilise également, par interaction électrostatique, les nanoparticules d'or formées (Figure III.2 ; (c)). Il ne peut cependant remplir ce rôle que pour des particules ayant une taille supérieure à 15 nm. La préparation de particules de taille plus faible nécessite l'utilisation d'un stabilisant, généralement un thiol.

Lorsque l'on parle de la taille de particules préparées à l'aide d'un réducteur (noté R), il convient d'introduire selon la présence ou non d'un stabilisant (noté S), les rapports [R]/[Au] ou [R]/[S].

Si la réduction est opérée avec un rapport [R]/[Au] faible, les particules obtenues seront d'une taille importante. A l'inverse, plus le rapport [R]/[Au] sera grand, plus faible sera la taille des clusters formés. Il a été montré que si le rapport [R]/[Au] était égal à 1,3, la réduction conduisait à des particules de diamètre moyen égal à 24 nm. Si le rapport [R]/[Au] était abaissé à 0,43, des particules de taille moyenne égale à 147 nm étaient formées (65).

Il faut signaler que peu de publications, font référence à une détermination de taille en fonction du rapport [R]/[S] car ce dernier semble dépendre de la nature du stabilisant utilisé. Les particules préparées à l'aide du citrate de sodium sont stables mais peuvent facilement s'agglomérer lors de l'ajout d'un électrolyte ou de molécules pouvant s'adsorber à leur surface (69).

L'utilisation du citrate de sodium convient particulièrement à la préparation de nanohybrides trouvant une application dans le domaine de la biochimie car les particules sont dispersées en milieu aqueux. De nombreuses études décrivant la fonctionnalisation de ces nanoparticules d'or à l'aide de molécules hydrosolubles tels que des protéines (62), des β -cyclodextrines (63), ou le mercaptopropionate (64) ont été décrites (le mercaptopropionate étant utilisé comme stabilisant des particules afin d'empêcher leur agglomération pour un greffage ultérieur d'une molécule biologiquement active).

Comme la réduction est réalisée en milieu aqueux, seuls des stabilisants solubles dans l'eau peuvent être employés. Une fonctionnalisation par des thiols possédant un caractère hydrophobe peut conduire à des particules de tailles inhomogènes. La synthèse est alors non

reproductible. La réduction de HAuCl_4 par le citrate de sodium est un procédé très commode à utiliser et qui donne d'excellents résultats si le citrate est le seul stabilisant. Toute fonctionnalisation ultérieure par un thiol, même hydrophile, fragilise considérablement les particules et provoque souvent une agglomération.

I.4. Stabilisation

L'objectif de cette étude est l'élaboration de nanoparticules hybrides organiques/inorganiques constituées par un cœur métallique formé par des atomes d'or. Ces particules doivent avoir une taille comprise entre 5 et 20 nm, être non toxiques et stables en solution aqueuse. Cette dernière condition impose l'emploi de molécules organiques appelées espaceurs. Selon la littérature, l'utilisation des thiols est prédominante (Figure B.5). La stabilisation est assurée par deux phénomènes que sont : la répulsion électrostatique et la gêne stérique.

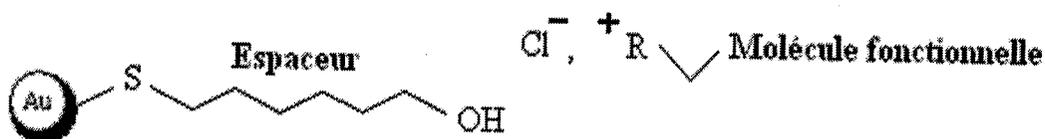


Figure B.5 : Schéma de la fonctionnalisation de la nanoparticule

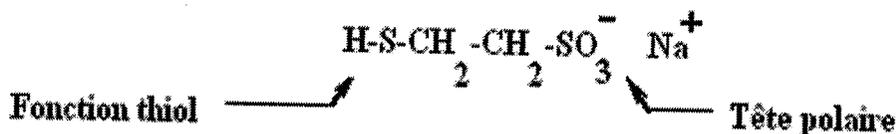


Figure B.6 : mercaptoéthane sulfonate de sodium

Une molécule organique thiolée et polarisée à l'autre extrémité de sa chaîne carbonée est recherchée en tant que stabilisant. Ainsi le mercaptoéthane sulfonate de sodium (Figure B.6) correspond à ce descriptif.

La répulsion électrostatique entre les têtes polaires permet de maintenir dispersées les nanoparticules. La molécule à tête réactive comme le 4-mercaptophénol (hydroxythiophénol), largement utilisé avec les nanoparticules. Son cycle aromatique corrélé à la fonction alcool en fait le thiol de choix pour sa rigidité et sa réactivité avec d'autres molécules. La capacité de l'acide thiomaléique à re-disperser dans l'eau les nanoparticules et la présence de deux

chaînes carbonées sont autant d'éléments qui suscitent leur emploi en tant que molécule protectrice et dispersante de la surface de la nanoparticule.

Le greffage ultérieur de molécules fonctionnelles devant préférentiellement être réalisé par substitution nucléophile sur la fonction alcool de l'espaceur. Il faut noter que la présence du citrate de sodium a une double utilité : en plus de rôle de réducteur de l'or (+ 3), il contribue à la stabilisation des nanoparticules en s'adsorbant à leur surface (figure B.6). Il limite ainsi le contact des nanoparticules et donc leur frittage.

L'analyse de la littérature nous a montré combien la taille, le degré d'agrégation ou de fonctionnalisation des nanoparticules d'or dépendaient de leur mode de préparation. Il est donc nécessaire de disposer de moyens permettant de contrôler au mieux chaque paramètre. Nous allons présenter les différentes techniques d'analyses utilisées pour le contrôle de la taille, de l'agrégation ou de la fonctionnalisation de nanoparticules d'or de taille comprise entre 5 et 20 nm.

I.5. Caractérisation

I.5.1. Contrôle de la taille

Dans la littérature, la taille des nanoparticules est généralement déterminée par la Microscopie Electronique à Transmission (MET). Bien que cette technique ne permet pas d'observer les particules telles qu'elles se présentent en solution car le mode opératoire impose un dépôt préalable sur une grille de carbone et surtout, une évaporation du solvant est nécessaire. Très souvent, ces manipulations sont à l'origine d'une agrégation des clusters avant l'observation. Elle reste néanmoins, parmi les techniques disponibles, la mieux adaptée et la plus utilisée pour le contrôle de la taille des nanoparticules. Il faut également préciser que cette technique d'analyse ne rend compte de la morphologie qu'à un endroit précis de la grille et non pas de l'échantillon complet.

La stabilité des matériaux, leur réactivité chimique, leur opacité, leur fluidité et leur résistance, sont affectés par la taille et les caractéristiques des particules qui les composent. La granulométrie ou spectroscopie à Corrélation de Photons (PCS) permet de déterminer les tailles hydrodynamiques des particules en solutions colloïdales, de 1 nm à quelques microns.

Cette technique est fondée sur la mesure du mouvement brownien des particules (mouvement aléatoire des particules provoqué par les impacts des molécules du solvant sur la surface de la particule). La fréquence et l'amplitude de ce mouvement brownien dépendent de la taille de la particule et de la viscosité du solvant. A une viscosité donnée, plus la particule

est petite et plus son mouvement brownien présente une fréquence et une amplitude relativement importantes.

De même, plus la viscosité du solvant est basse (température plus élevée par exemple), plus ce mouvement brownien est rapide et ample pour une particule de taille donnée. Il est donc important de maîtriser la viscosité et donc la température du milieu. La vitesse de déplacement des particules est définie par le coefficient de diffusion de diamètre hydrodynamique de la particule en solution $d(H)$.

$$d(H) = \frac{KT}{6\pi\eta r} \quad \text{Avec} \quad \begin{array}{l} K: \text{ Constante de Boltzman} \\ T: \text{ Température absolue} \\ \eta: \text{ Viscosité} \end{array} \quad (1)$$

La détermination du coefficient de diffusion translationnel permet la mesure du rayon hydrodynamique. Cette méthode est adaptée à l'étude d'échantillons de tailles homogènes. Le contrôle de la taille des particules préparées à l'aide de la méthode utilisant le citrate de sodium comme réducteur pourra être utilisé par PCS. Les expériences effectuées montrent que les particules citrates étaient plus adaptées à l'utilisation du PCS que les particules préparées par le réducteur NaBH_4 où tout agglomérat d'une dizaine de nanomètres suffit pour rendre cette technique inutilisable. Pour les particules obtenues par réduction avec le NaBH_4 , la Microscopie Electronique à Transmission MET reste la seule méthode permettant l'estimation de la taille.

1.5.2. Contrôle de l'agrégation

La méthode décrite précédemment, c'est-à-dire la Microscopie Electronique à Transmission, peut être utilisée pour détecter une agglomération éventuelle des particules surtout celles préparées par le citrate de sodium. La spectroscopie UV/Visible peut également être utilisée pour étudier la stabilité des particules citrate au cours du temps. L'observation de l'évolution de la bande appelée « plasmon », résultant de l'excitation du cortège électronique des atomes d'or de surface, permet de détecter tout phénomène de rapprochement ou d'agrégation des cœurs métalliques des particules. Cette méthode d'analyse est rarement utilisée pour évaluer l'état d'agrégation au cours du temps. Pour les particules de tailles inférieures à 5 nm l'absorption n'est pas suffisamment importante pour être caractérisée par cette méthode.

Le principe de cette méthode est simple. Si un rayon lumineux d'intensité I_0 pénètre dans un milieu homogène isotrope d'épaisseur d , alors, abstraction faite des pertes par réflexions et diffraction, il peut être affaibli par absorption. L'intensité I du rayon sortant (transmission) vaut alors :

$$I = I_0 - I_{\text{abs}} \quad (2)$$

Si l'on considère uniquement des solutions diluées, pour lesquelles, seule la matière dissoute, à la concentration c , absorbe, on obtient alors :

$$A = \text{Log} \frac{I_0}{I} = \epsilon . c . d \quad (3)$$

L'absorption A (absorbance, extinction) est adimensionnelle. L'épaisseur d est donnée en cm, la concentration c en mol.L^{-1} . Le coefficient d'absorption molaire ϵ a la dimension $\text{cm}^2.\text{mmol}^{-1}$, mais il est généralement exprimé sans dimension.

Cette loi, établie par Bouguer (1728), Lambert (1760) et Beer (1852), est valable pour une lumière monochromatique et des solutions diluées ($c \leq 10^{-2} \text{mol.L}^{-1}$). On obtient un spectre de bandes d'absorption caractérisées chacune d'elles selon ses propriétés par ; place, intensité, forme et structure fine qui dépendent de la nature des transitions électroniques.

I.5.3. Analyse spectroscopique

En fait, les luminophores sont des matériaux qui émettent un rayonnement après qu'ils aient absorbé de l'énergie fournie par une source excitatrice. Cette énergie excitatrice varie selon l'application envisagée du matériau étudié. Elle peut être :

- Une excitation optique par un rayonnement infrarouge, visible ou ultraviolet induisant « la photoluminescence » ; cette technique est utilisée dans les applications telles que les tubes fluorescents, les lasers et les concentrations solaires ;

- Une excitation par un champ électrique dû à l'application d'une différence de potentiel supérieure à 100 V induisant de « l'électroluminescence », et qui est à la base du fonctionnement des écrans plats de télévision ;

- Une excitation par un faisceau d'électrons accélérés sous vide induisant de « la cathodoluminescence ». Cette technique étant mise à profit pour les écrans de télévision et ceux des calculateurs ;

- Une excitation par les rayons X induisant des émissions de « fluorescence visible » qui sont largement développées dans les écrans intensificateurs d'images pour la radiographie ;
- ou une excitation par les rayons γ émis par les processus nucléaires et qui peut être détectée par les cristaux scintillateurs.

Cependant, il est à noter que la photoluminescence est considérée comme le point commun de ces différentes techniques, puisqu'en fin de compte ce sont presque toujours les premiers niveaux d'énergie excités qui émettent la fluorescence visible que l'on cherche à exploiter. Ainsi, toute analyse spectrale de composés destinés aux applications citées ultérieurement devrait obligatoirement débiter par l'étude de la photoluminescence.

De manière générale, la photoluminescence s'effectue en deux étapes :

La première étape consiste en l'absorption du rayonnement incident par les électrons du matériau étudié. Ceux-ci se retrouvent de ce fait dans des états excités.

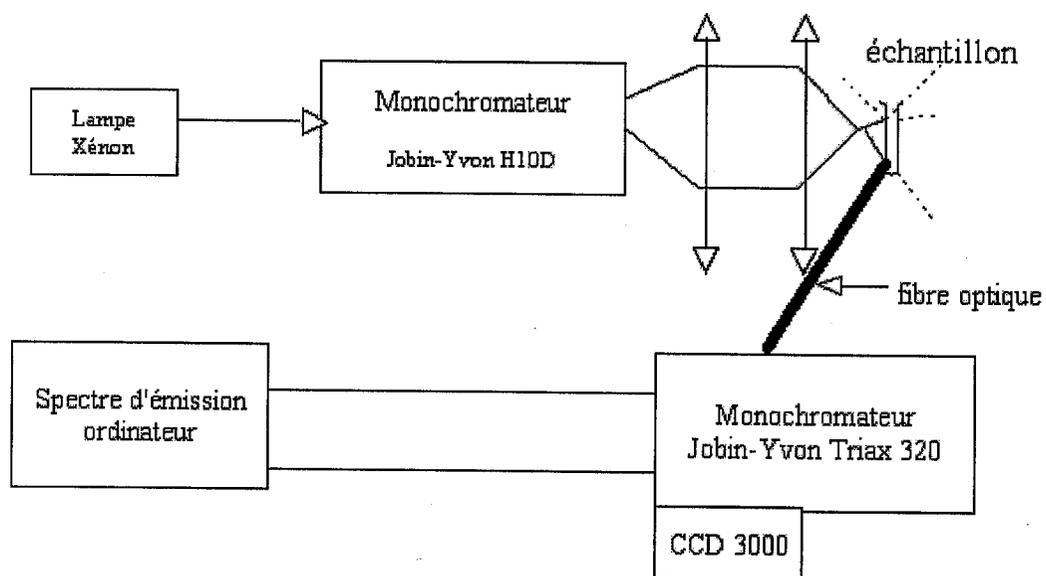
Dans une seconde étape, ces mêmes électrons ne pouvant demeurer longtemps dans les états excités, retournent dans des niveaux d'énergie plus stables en émettant des photons dans le cas où la transition est radiative.

On peut distinguer deux types de photoluminescence : La fluorescence dans le cas où le signal lumineux émis est produit par des transitions radiatives entre des niveaux d'énergie dont la durée de vie moyenne à l'état excité est de l'ordre de 10^{-8} seconde, et la phosphorescence traduite par une émission qui persiste au bout d'une durée pouvant varier entre quelques millièmes de seconde et plusieurs jours même après arrêt de l'excitation.

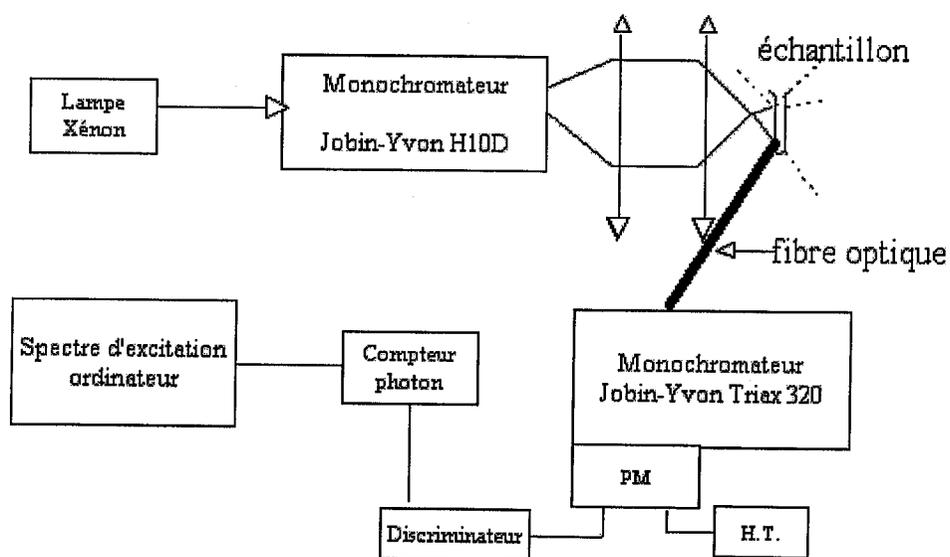
L'étude des matériaux luminescents se fait principalement par la mesure de spectres d'absorption, d'excitation, d'émission et de déclin de luminescence. Nous allons décrire la méthode d'analyse spectroscopique utilisée pour l'étude de la luminescence dans ce travail.

I.5.3.1 Emission sous excitation UV

Les spectres d'émission sont obtenus en excitant à l'aide d'une lampe Xénon (source continue). On sélectionne la longueur d'onde d'excitation à l'aide d'un monochromateur Jobin-Yvon H10D, puis le faisceau est focalisé sur l'échantillon. Le dispositif expérimental utilisé est schématisé ci-dessous (Figure B.7 (a)).



(a)



(b)

Figure B.7 : Montage expérimental de mesure sous excitation par une lampe de Xénon du : (a) spectre d'émission, (b) spectre d'excitation,

La fluorescence est ensuite collectée par une fibre optique puis focalisée sur la fente d'entrée d'un monochromateur Jobin-Yvon Triax 320. La détection s'effectue à l'aide d'une caméra CCD 3000.

I.5.3.2 Excitation

Les spectres d'excitation sont obtenus en excitant à l'aide d'une lampe Xénon (source continue). On sélectionne la longueur d'onde d'émission à l'aide d'un monochromateur Jobin-Yvon H10D. La fluorescence est détectée par un photomultiplicateur (Hamamatsu R1477). Le dispositif expérimental utilisé est schématisé ci-dessus (Figure B.7 (b))

Les fluorophores greffés sur les nanoparticules d'or peuvent servir de sonde dans les systèmes biologiques, et apporter la compréhension des interactions au niveau moléculaire des parties organiques greffées en surface, et contribuer au développement de traceurs biologiques et de dispositifs optoélectroniques (13).

La fonctionnalisation des nanoparticules d'or par des molécules organiques est mise en évidence en surveillant le décalage de la bande de plasmon vers les faibles énergies.

Dans la présente étude, nous avons pu montrer que le chlorure de lissamine rhodamine B sulfonyle était effectivement greffé sur les particules d'or par spectrofluorimétrie.

Cette technique a été utilisée pour déterminer le taux de greffage de molécules organiques en surface des particules d'or

I.5.3.3. Contrôle et quantification du greffage de molécules organiques à la surface des nanoparticules d'or

Le contrôle du greffage des molécules organiques à la surface de particules d'or préparées par la méthode utilisant le citrate de sodium comme agent réducteur ne peut être réalisé que par la spectroscopie UV-Visible. Le chromophore étudié doit être greffé sur les nanoparticules. Il absorbe entre 200 et 1000 nm. La concentration faible en mole de nanoparticule rend la plupart des autres méthodes de caractérisation inadéquates.

Pour les nanoparticules préparées par la méthode utilisant le NaBH_4 comme agent réducteur, l'Infrarouge est peu utilisé. La caractérisation par Résonance Magnétique Nucléaire RMN est très difficile sachant que la récupération et la purification du produit de synthèse ne peuvent pas être réalisées sans risques d'agrégation.

La solubilité des nanoparticules et les phénomènes de désorption des thiols de la surface des clusters d'or limitent fortement leur caractérisation.

Conclusion

De nombreuses méthodes utilisant un réducteur chimique permettent l'élaboration de nanoparticules d'or de tailles comprises entre 2 et 150 nm. Parmi ces méthodes deux d'entre elles semblent être particulièrement intéressantes par rapport aux applications visées. Ce sont celles utilisant le citrate de sodium et le borohydrure NaBH_4 . Le nombre de publications parues ces dernières années, se référant à l'utilisation de ces deux réducteurs, nous aidera dans la mise au point de la synthèse de nanoparticules. Le procédé au citrate de sodium est particulièrement adapté à l'application dans le domaine biologique car les nanoparticules obtenues par cette méthode sont de taille n'excédant pas 20 nm et sont dispersées en milieu aqueux et donc favorable pour une utilisation directe dans le domaine biologique.

La méthode utilisant le borohydrure de sodium permet la synthèse de nanoparticules de taille très faible (2 à 3 nm) et directement fonctionnalisées par les thiols. L'inconvénient réside dans la nature du solvant (méthanol). Ce procédé nécessite alors l'élimination du solvant de synthèse, la purification du produit et sa redispersion en milieu aqueux, avant toute application dans le domaine biologique. Cette manipulation n'est pas évidente.

La caractérisation de nos nanoparticules sera assurée essentiellement par l'UV-Visible la spectroscopie à corrélation de photons et les examens en microscopie électronique à transmission MET.

Les chapitres suivants seront consacrés aux modes de synthèse utilisées et à la synthèse des nanoparticules par la méthode utilisant le citrate de sodium et leur fonctionnalisation par différents thiols.

CHAPITRE B.II. : Partie expérimentale

II.1. Matériel

II.1.1. Produits chimiques

Nous avons utilisé le sel d'or (+3) le tétrachloroaurate trihydraté $\text{HAuCl}_4 \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$ commercialisé par Sigma que nous avons conservé à + 4°C et sous atmosphère d'azote. Les agents réducteurs utilisés sont ; le borohydrure de sodium NaBH_4 provenant de chez Aldrich, conservé à -4°C. Le Citrate de sodium ($\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7\text{Na}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) à + 99% de pureté fourni par Aldrich. L'acide tannique $\text{C}_{75}\text{H}_{52}\text{O}_{46}$ à 95 % et le pentafluorothiophenol $\text{HS-C}_6\text{H}_4\text{F}_5$ 97% commercialisés par Acros Organics. Le 2-mercaptoéthanesulfonate de sodium ($\text{HS-CH}_2\text{-CH}_2\text{-SO}_3^-$, Na^+), le triéthyle amine $\text{N}(\text{C}_2\text{H}_5)_3$ et l'Acide thiomaléique $\text{HS-CH}(\text{COOH})\text{-CH}_2\text{-COOH}$ à 98+% de pureté proviennent de Fluka. L'acide thioctique $\text{C}_8\text{H}_{14}\text{O}_2\text{S}_2$ à 98%, l'acide 3,3-dithiodipropionique $[-\text{S}(\text{CH}_2)_2\text{CO}_2\text{H}]_2$, l'acide 4,4-dithiodibutyrique $[-\text{S}(\text{CH}_2)_3\text{CO}_2\text{H}]_2$, le 4-mercaptophenol $\text{HS-C}_6\text{H}_4\text{-OH}$ à 97%, le sodium hydrogène carbonate NaHCO_3 proviennent de Aldrich. L'acide chloridrique et l'acide acétique de degré de pureté > 90% sont utilisés. La lissamine rhodamine B sulfonyl chloride flacon de 1 g ($\text{C}_{27}\text{H}_{29}\text{ClN}_2\text{O}_6\text{S}_2$) conservée à -4°C provient de Fluka.

Les solvants utilisés (hexane, méthanol, toluène, dichlorométhane, éther diéthylique, eau ultra pure, DMSO) sont de haut degré de pureté.

II.1.2. Analyses

Les spectres UV-visible sont réalisés à température ambiante par un spectrophotomètre PC Shimadzu UV-2401. La fluorescence est mesurée à la température ambiante avec une large excitation centrée à 290 nm en utilisant un spectrofluorimètre monté au laboratoire. La source est une lampe xénon de 450 W couplée à un monochromateur de H10D Jobin-Yvon. La fluorescence est collectée par une fibre optique, dispersée par un monochromateur de TRIAX 320 Jobin-Yvon et détectée par une caméra CCD3000 refroidie par l'air. Les analyses par microscopie électronique de transmission MET de haute résolution ont été réalisées à l'aide du microscope JEOL 2010 fonctionnant à 200 kV et une résolution de 1,2 Å. Pour la détection de l'agrégation des colloïdes, les tailles des particules sont déterminées par spectroscopie à corrélation de photons avec un appareil Malvern Zetasizer 3000 HSA équipé d'un laser He-Ne (633 nm). Les mesures ont été réalisées avec l'indice du dispersant $\text{RI}=1,33$ et le coefficient de viscosité $\text{cP}=0,890$. Les analyses de spectrométrie de masse et Infra-rouge ont été effectuées par le centre d'analyse IBCP UMR 5086 CNRS de Lyon. D'autres techniques

d'analyse ont été utilisées au laboratoire comme la chromatographie sur couches minces CCM ou la dialyse.

II.2. Synthèse de nanoparticules d'or

II.2.1 Réduction à l'aide de NaBH_4

C'est une réduction en système monophasique. Le solvant utilisé est le méthanol, dans lequel nous souhaitons obtenir des nanoparticules hydrophiles. Selon la bibliographie, l'ajout d'un nombre de moles de thiols deux fois supérieur par rapport au nombre de moles de chloroaurate initial permet le contrôle de la germination et la croissance des nanoparticules d'or par la fixation de ces thiols à la surface des particules (7). Sachant que la teneur initiale en thiols est très largement supérieure à la totalité de la surface accessible, les deux thiols doivent être ajoutés en même temps, avant la réaction de réduction par NaBH_4 . Plusieurs facteurs sont à considérer parmi lesquels, la cinétique de greffage forcément différente (réactivité différente) et les phénomènes d'échange entre les thiols à la surface du métal au cours du temps.

a) Mode opératoire

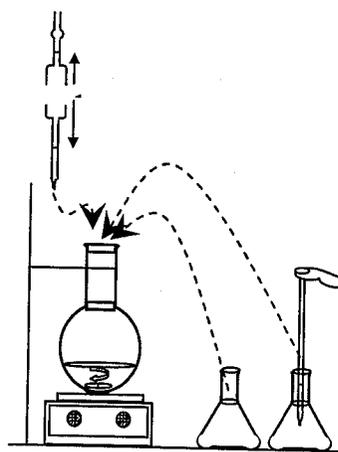


Figure B.8 : Schéma du montage pour la synthèse à l'aide de NaBH_4

Dans un ballon monocol de 500 mL, 500 mg de $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (1,27 mmol) sont dissous dans 150 mL de méthanol avec une agitation modérée pendant quelques minutes (couleur jaune clair). Puis un mélange contenant M_{mp} mg d'hydroxythiophénol et M_{ms} mg de mercaptoéthane sulfonate de sodium (voir Tableau B.1) dans 100 mL de méthanol et 5 mL d'acide acétique est versé dans le ballon monocol. L'agitation est maintenue pendant 5 à 10 minutes. Ensuite 460 mg (12,2 mmole) de NaBH_4 dissous dans 35 mL d'eau ultrapure sont

ajoutés mL par mL. Le mélange réactionnel prend une coloration brune dès le premier mL de la solution NaBH_4 dispersé dans celui-ci puis noire. La réaction dure une heure avec une agitation à température ambiante. Le mélange réactionnel est ensuite acidifié par addition de 10 mL d'une solution d'acide chlorhydrique une fois normal.

Tableau B.1 : pourcentage des thiols en surface des nanoparticules

Nanoparticule	M_{mp}	M_{ms}
NaBH_4 100% MP	317,93 mg (2,9 mmole)	0 mg
NaBH_4 90% MP, 10% MS	286,14 mg (2,286 mmole)	41,70 mg (0,254 mmole)

b) Purification et séchage

Le contenu du ballon est récupéré et divisé en deux volumes équivalents avant d'effectuer successivement une évaporation partielle (environ 6 heures) à l'évaporateur rotatif (pression réduite et température ambiante) muni d'un piège à solvant, trempé dans l'air liquide. La totalité du méthanol est éliminé de la suspension de nanoparticules d'or (solution noire restante) qui est dispersée dans la phase aqueuse résiduelle. La totalité du solvant est éliminé sous vide. La poudre récupérée est lavée soigneusement au diéthyléther (3 fois) puis séchée sous vide pendant 4 à 5 heures. Cette dernière phase est la plus délicate car d'un coté, l'agrégation ne peut être évitée suite à l'évaporation totale du solvant et d'un autre coté la purification par lavage au solvant ne peut éliminer tous les composés résiduels.

c) Redispersion :

La poudre de nanoparticules de couleur noire est redispersable dans le méthanol, le DMSO.

II.2.2. Réduction à l'aide de citrate de sodium

a) Préparation de nanoparticules de taille importante

Nous dissolvons 115,0 mg (0,29 mmol) de $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ dans 200 mL d'eau ultrapure contenue dans un ballon monocol de 250 mL muni d'un réfrigérant à eau, puis nous portons le mélange à reflux. Nous dissolvons 266,0 mg de $\text{Na}_3\text{citrate}$ (1,03 mmol) dans 10 mL d'eau ultrapure et ajoutons cette solution à celle contenue dans le ballon. On observe alors un changement de couleur du jaune clair au rouge foncé. Nous laissons alors la réaction se dérouler pendant une demie heure sous reflux avec une agitation modérée.

b) Préparation de nanoparticules en présence d'acide tannique

Nous dissolvons 10,0 mg de $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ dans 80 mL d'eau Ultrapure que nous versons dans un ballon monocol de 100 mL muni d'un réfrigérant à eau, puis nous portons le mélange à 60°C . Dans un autre ballon monocol de 50 mL muni d'un réfrigérant à eau nous introduisons une solution contenant 40,0 mg de citrate de sodium et 10,0 mg d'acide tannique dissous dans 20 mL d'eau Ultrapure que nous portons également à 60°C . Lorsque la température des solutions contenues dans les deux ballons atteint 60°C , les deux solutions sont mélangées dans un seul ballon. La couleur devient vire du jaune au rouge presque immédiatement comme dans le cas de la synthèse décrite précédemment. Nous laissons la réaction de déroule à 60°C pendant une heure et sous agitation modérée, puis nous chauffons jusqu'à ébullition pendant 10 minutes pour bien homogénéiser la solution.

II.3. Couplage du chlorure de lissamine rhodamine B sulfonyle et l'aminthiophénol

En s'inspirant des travaux décrivant le couplage de la lissamine rhodamine B au 4-sulfonate calix[6]arène (72) nous avons développé un protocole expérimental permettant la synthèse du colorant thiolé dans un solvant méthanol/eau en présence d'un excès du 4-aminothiophénol.

Mode opératoire

22,16 mg du 4-mercaptophénol (0,177mmol) sont dissous dans un mélange constitué de 5 mL de méthanol et 25 mL d'eau ultra pure, 30 mL de triéthylamine est ajouté au mélange. La réaction est maintenue pendant 30 minutes avec une agitation vigoureuse. 0,102g de chlorure de lissamine rhodamine B sulfonyle (0,177 mmol) dissous dans 5 ml de méthanol et 25 ml de l'eau ultra pure est ajouté au mélange. La réaction se poursuit durant une nuit à la température ambiante. Le solvant est ensuite évaporé à pression réduite. La poudre obtenue est dissoute dans 100 mL dichlorométhane, lavée successivement avec 300 mL d'HCl (1N) et NaHCO_3 . Le produit de synthèse est caractérisé par IR et spectrométrie de masse

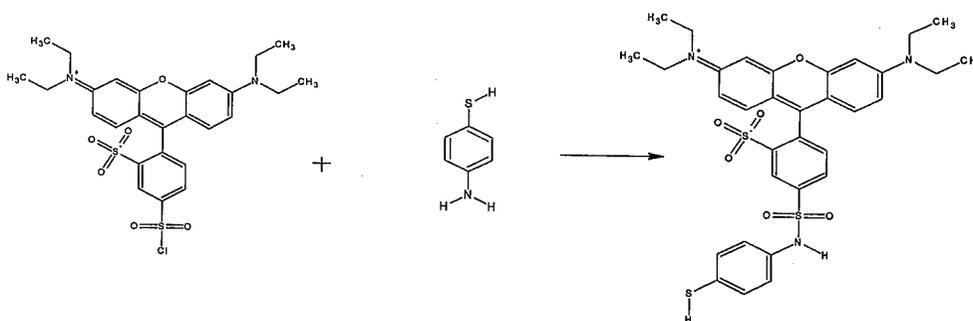


Figure B.9 : réaction de couplage de la lissamine rhodamine B sulfonyle et l'aminthiophénol

IV. Description des nanoparticules

La nanoparticule d'or (Au) est assimilée à une sphère de diamètre $d = 2r$ dans laquelle les atomes d'or sont empilés selon le mode Cubique Faces Centrées (73). Le facteur de compacité de cet empilement est $c = 0,74$; le rayon de l'atome d'or est $r_0 = 1,46 \text{ \AA}$.

Une fois la taille moyenne des nanoparticules déterminée, il est possible d'en déduire :

Le nombre N_{Au} d'atomes d'or par nanoparticule.

Le nombre N_s (n) d'atomes de surface par nanoparticule.

Le nombre N_{max} de sites réellement accessibles.

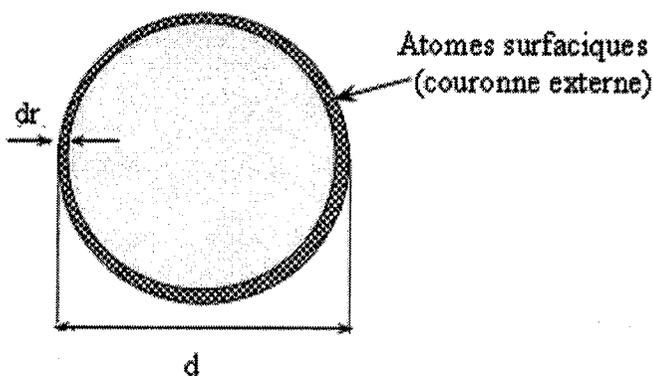
Le pourcentage $\%_{max}$ de sites accessibles par rapport au nombre total d'atomes d'or.

Le diamètre moyen de la nanoparticule étant déterminé, nous pouvons calculer le nombre d'atomes d'or total N_{Au} constituant cette sphère à partir de la compacité c :

$$C = \frac{\text{Volume occupé}}{\text{Volume total}} = \frac{N_{Au} \cdot \frac{4}{3} \cdot \pi r_0^3}{\frac{4}{3} \pi r^3}$$

$$\text{D'où } N_{Au} = C \cdot \left(\frac{r}{r_0} \right)^3$$

Le nombre d'atomes surfaciques N_s situés dans la couronne externe de la nanoparticule est calculé comme suit :



La surface S d'une nanoparticule vaut en première approximation :

$$S = \frac{dV}{dr} ; \text{ sachant que } dV = \frac{(N_s \cdot \frac{4}{3} \cdot \pi r_0^3)}{c} = \text{volume de la couronne externe}$$

$$dr = 2 \cdot r_0 = \text{largeur de la couronne}$$

$$\text{Par définition la surface } S = \pi d^2 \quad \text{Donc } N_s = 6c \cdot \left(\frac{r}{r_0} \right)^2$$

Il faut aussi considérer que seulement 1/3 des atomes de surface est accessible (3). On en déduit donc le nombre de sites réellement accessibles N_{\max} :

$$N_{\max} = \frac{1}{3} N_s \quad \text{on en déduit} \quad \%_{\max} = N_s \cdot \frac{100}{N_{Au}}$$

En appliquant ces résultats à deux types de nanoparticules, nous obtenons les résultats représentés dans le Tableau B.2 suivant:

Tableau B.2 : Quelques données de deux nanoparticules de diamètres différents

Nanoparticules de faible diamètre (8 nm)	Nanoparticules de grand diamètre (15nm)
$r_1 = 4 \text{ nm}$	$r_2 = 7,5 \text{ nm}$
$N_{Au} = 15218 \text{ atomes}$	$N_{Au} = 100313 \text{ atomes}$
$N_s = 3333 \text{ atomes}$	$N_s = 11717 \text{ atomes}$
$N_{\max} = 1111 \text{ atomes}$	$N_{\text{access.}} = 3906 \text{ atomes}$
$\%_{\max} = 7,3 \%$	$\%_{\max} = 3,9\%$

Nous pouvons aussi à partir de la taille des nanoparticules, reporter le nombre de sites accessibles par rapport à la surface (nombre par nm^2) ou aux nanoparticules (nombre par nanoparticule). Ces valeurs seront comparées à celles théoriques calculées en supposant que chaque molécule adsorbée ou greffée occupe sur la nanoparticule la même surface que sur une surface d'Au(111) plate (74). Cette surface est évaluée à $0,197 \text{ nm}^2$ (soit ≈ 5 molécules nm^{-2}) à partir de la densité du Réseau CFC-Au ($59 \text{ atomes nm}^{-3}$)(75). Par exemple, sur des nanoparticules une taille de $2,2 \text{ nm}$, les greffons occupent une superficie correspondant à $1,75$ atome d'or (72,76).

Selon Edelstein (7)

$$S = 4 \cdot \pi \cdot r_0^2 \cdot N_s^{2/3} \quad \text{et} \quad S = 4 \cdot \pi \cdot r^2$$

Par conséquent le nombre d'atomes de surface N_s peut être défini par :

$$N_s = \left(\frac{r}{r_0} \right)^3$$

La fraction d'atomes d'or de surface peut alors être déterminée selon :

$$f = \frac{4}{N_s \frac{1}{3}}$$

CHAPITRE B.III. : Résultats et discussions

Dans cette partie, nous allons montrer que des chromophores peuvent être efficacement greffés sur des nanoparticules d'or dispersibles en solution aqueuse. Le greffage est effectué en deux étapes: d'abord, un greffage primaire des thiols, des stabilisateurs (le 2-mercaptoéthane sulfonate et l'acide thiomaléique) et une molécule d'espaceur (4-mercaptophénol) et ensuite le greffage de la lissamine rhodamine B sur les espaceurs précédemment greffés.

L'efficacité du greffage a été évaluée par le dosage des molécules de colorant restantes en solution après avoir forcé la précipitation des particules par l'addition de sel. On constate que tous les espaceurs participent au greffage de la lissamine rhodamine B.

Introduction

La fluorescence est largement utilisée en biologie avec la recherche de nouveaux dispositifs électroniques (10,11) ou celui des protéines fluorescentes utilisées comme marqueurs de nucléotides (80,13). Dans cette dernière application, le défi actuel est d'augmenter l'efficacité de la détection. Parmi les différentes approches essayées, la Spectroscopie Raman Exaltée de Surface (SERS) est certainement celle qui suscite l'attention la plus considérable (82,83).

Cependant une approche alternative peut être, aussi intéressante et qui consiste à greffer plusieurs molécules fluorescentes sur le même édifice nanoparticulaire contenant également une rive de nucléotide complémentaire au nucléotide cible à détecter, ce qui permettrait de multiplier le seuil de détection par le nombre de fluorophores greffés ou adsorbés efficacement sur la nanoparticule. L'or apparaît comme le meilleur candidat pour la synthèse de nanoparticules. Depuis la publication de Brust et coll. en 1995 (50) ces nanoparticules ont été le centre d'intenses études et un grand nombre de méthodes sont maintenant disponibles pour leur synthèse. Les thiols peuvent facilement être greffés sur la surface de l'or et l'hybridation efficace par des oligonucléotides peut être réalisée (81,84). L'élaboration des nanoparticules d'or avec des oligonucléotides et des fluorophores greffés ou adsorbés sur la surface par l'intermédiaire de thiols appropriés est sérieusement considérée.

Le but de cette étude est de prouver qu'il est possible de greffer ou d'adsorber des quantités significatives de lissamine rhodamine B sur la surface des nanoparticules d'or

colloïdales et cette opération est corrélée avec la possibilité d'optimiser la détection du nucléotide éventuellement attaché sur la nanoparticule.

Cette tentative est rendue plus réaliste puisqu'on a récemment montré que la chimisorption des colorants fluorescents sur des nanoparticules d'or n'était possible que lorsque les nanoparticules s'agrègent (72) ou sont immobilisées sur un substrat de verre (14).

Des tentatives de greffage direct de colorants fluorescents sur des nanoparticules d'or en solution ont été reportées dans la littérature (85,86). Cependant, ces études concernent des particules d'or trop petites pour adsorber plusieurs colorants (85), ou des molécules fluorescentes qui perdent leurs propriétés de luminescence au contact avec les nanoparticules (86). La présente étude est alors la première à considérer la possibilité de fixation de colorant sur des nanoparticules d'or pour l'amélioration de l'efficacité de détection.

C'est le chlorure de lissamine rhodamine B sulfonyle (sulforhodamine) qui a été choisi en raison de son quantum d'efficacité élevée ($\eta = 0,99$) et de la stabilité de ses propriétés optiques après greffage.

Toutes les approches pour la préparation de solutions colloïdales stables d'or comportent la réduction du sel approprié du métal en présence d'un stabilisateur.

Deux voies de synthèse, décrites dans la littérature s'emblent être intéressantes. La première utilise le borohydrure de sodium et conduit à des nanoparticules de faible diamètre d'environ 5 nm (50) mais présente un inconvénient majeur où les sites de greffage sont difficilement accessibles après la réduction du métal. La deuxième méthode utilise le citrate de sodium (65) et conduit à des nanoparticules de diamètre élevé de 15 nm, la taille peut diminuer en adoptant des conditions de synthèse appropriées.

En reproduisant ces deux synthèses, nous avons constaté que le contrôle de la taille et de la dispersion des particules peut être réalisé avec les deux méthodes. Cependant, celle utilisant le citrate de sodium comme réducteur est plus appropriée pour greffer divers thiols sur le même édifice nanoparticulaire en quantités parfaitement ajustables. La méthode utilisant le borohydrure de sodium, le nombre de thiols introduits est plus important que le nombre de sites accessibles. Le greffage dépend des réactions dynamiques d'échange entre les différents thiols en excès (87). Dans ce cas, le nombre de molécules adsorbées diffère de manière significative du nombre de molécules correspondantes en solution (88,89). Ce phénomène est peu probable avec la première méthode où le nombre de thiols introduit est généralement plus faible que celui pouvant être adsorbé. C'est la raison pour laquelle cette

méthode a été choisie pour la présente étude. La méthode de citrate mène seulement aux solutions colloïdales de faibles concentrations (64). Ceci ne constitue pas un inconvénient puisque pour plusieurs applications biologiques les concentrations faibles sont souvent exigées. Cependant, contrairement à la méthode utilisant le NaBH_4 , la méthode citrate a suscité peu d'attention, probablement parce que les techniques généralement employées pour caractériser la liaison Au/thiol (spectroscopie infrarouge, résonance magnétique nucléaire) ne sont pas assez sensibles pour les faibles concentrations.

Des chromophores peuvent être efficacement greffés sur des nanoparticules d'or monodisperses en solution aqueuse. Le greffage est effectué en deux étapes: d'abord, le greffage primaire des thiols stabilisants (le 2-mercaptoéthane sulfonate de sodium et l'acide thiomaléique) et des molécules espaceurs (le 4-mercaptophénol) ensuite le greffage de la lissamine rhodamine B sur les espaceurs.

La luminescence des colorants greffés sur les nanoparticules devrait fournir des informations originales sur l'efficacité de la liaison Au/thiol dans le cas des particules préparées par la méthode citrate. On prouvera en particulier que tous les espaceurs sont efficacement liés à la surface de l'or. Ceci sera réalisé avec le développement d'une procédure spécifique pour estimer le nombre de molécules de colorant fixées sur chaque nanoparticule.

III.1. Synthèse

Toutes les solutions colloïdales d'or ont été préparées et conservées dans des fioles en verre soigneusement lavées. La synthèse est effectuée dans un ballon rond de 500 mL muni d'un condensateur, 115 mg ($1,43 \times 10^{-4}$ mol) de tetrachloroaurate (III) trihydrate sont dissous dans 200 mL d'eau ultrapure. Cette solution est chauffée jusqu'au reflux.

Dans un autre flacon rond de 500 mL, 260 mg ($8,75 \times 10^{-4}$ moles) de citrate de sodium dihydraté sont dissous dans 10 mL de l'eau ultrapure et puis ajoutés au premier flacon. Le mélange est chauffé pendant 30 minutes avec une agitation vigoureuse. Il est ensuite refroidi à la température ambiante. La coloration jaune de la solution vire vers le rouge indiquant la formation des nanoparticules d'or. La microscopie électronique de transmission de haute résolution (TEM) des nanoparticules a montré un diamètre moyen de 16,2 nm avec un écart type de 2,1 nm.

III.2. Elaboration de nanoparticules en présence d'acide tannique

Dans un flacon rond de 500 mL muni d'un condensateur, 10 mg ($1,24 \times 10^{-5}$ moles) tetrachloroaurate (III) trihydrate sont dissous dans 80 mL de l'eau ultrapure. Dans un autre ballon, 40 mg ($1,35 \times 10^{-4}$ moles) de citrate de sodium dihydraté et 10 mg d'acide tannique sont dissous dans 20 mL d'eau ultrapure. Ces deux solutions sont chauffées à 60 °C ensuite mélangées. Le chauffage est maintenu pendant 1 h à 60 °C avec une agitation vigoureuse, ensuite porté à reflux pendant 10 minutes avant d'être refroidi à la température ambiante. La couleur jaune de la solution vire vers le rouge indiquant la formation des nanoparticules d'or. Ils ont un diamètre de 7,3 nm avec un écart type de 1,3 nm.

III.3. Le greffage des thiols sur les nanoparticules

Le greffage du 2-mercaptoéthane sulfonate, l'acide thiomaléique, et le 4-mercaptophénol) est réalisé par l'addition successive, à 30 mL d'une solution des nanoparticules, différentes solutions des thiols toutes les 30 minutes dans l'eau ultrapure à température ambiante et en absence de lumière. Pour chaque thiol, la quantité exacte de molécules greffées est ajustée par l'addition de volumes bien définis. Les solutions mère ont des concentrations molaires de $1,22 \times 10^{-7}$, $1,22 \times 10^{-7}$, et $2,44 \times 10^{-7}$ moles.L⁻¹ pour le 2-mercaptoéthane sulfonate, l'acide thiomaléique et le 4-mercaptophénol respectivement (les différents thiols ont été ajoutés dans cet ordre). Le mélange est agité pendant 30 minutes. La nature et la concentration des solutions de thiol ont été ajustées en fonction des sites accessibles des nanoparticules d'or, typiquement 40% de ces sites seront occupés. Le greffage de la lissamine rhodamine B de sur 4-mercaptophénol est réalisé par ajout à 30 mL d'une solution de nanoparticules fonctionnalisées à la température ambiante et en absence de la lumière de 10 mL de la triéthylamine et 1 mL de solution du chlorure de sulfonyl de la rhodamine B de lissamine dissous dans un mélange de l'eau de méthanol/eau ultrapure dans un rapport (1/99). La concentration du colorant varie en fonction du nombre de chromophores désirés par nanoparticule d'or (de 1 à 1800 par particule). Après 48 h, la réaction est arrêtée et après la séparation de la phase aqueuse, elle est lavée avec de l'éther diéthylique.

III.4 La précipitation des nanoparticules

Elle est effectuée par ajout de 0,2 g de NaCl à 5 mL d'une solution de colloïde à la température ambiante. Après agitation, le mélange est stocké pendant 1 h avant centrifugation; le surnageant est extrait au moyen une pipette pasteur. Les colloïdes

résultants ont été employés immédiatement ou stockés pour l'étude de la taille. Aucun signe de décomposition n'a été observé pendant plusieurs mois.

III.5 Résultats et discussion

III.5.1. Fonctionnalisation des nanoparticules d'or

Les nanoparticules d'or ont été préparées par réduction de HAuCl_4 à l'aide de citrate de sodium selon le protocole décrit dans la partie expérimentale. Nous avons basé mes travaux sur les données de Paik (95), qui a montré que tous les sites de surface des nanoparticules n'étaient pas équivalents et que la limite supérieure de fonctionnalisation était proche de 33%. Nous avons choisi de commencer cette étude par la détermination du taux limite de greffage du 4-mercaptophenol (MP) molécule présentant une réactivité intéressante (groupement phénolique sur lequel seront effectuées les fonctionnalisations ultérieures) en fonction de la quantité ajoutée. Le taux limite correspond au pourcentage maximal de greffage sans agrégation. L'analyse est effectuée par spectroscopie à corrélation de photons (PCS) ou granulométrie laser. Les résultats reportés dans le Tableau B.3 montrent que la solution colloïdale est stable pendant deux mois, seulement lorsque moins de 15% des sites accessibles sont greffés par le 4-mercaptophénol.

Tableau B.3 : Etat de dispersion de solution de nanoparticules d'or en fonction de la quantité de 4-mercaptophenol (MP) ajoutée.

Temps après addition du MP	1 h	24 h	7 jours	2 mois
Etat de dispersion en	C	C (<50 %)	C (<30%)	C (<15%)
Fonction du MP ajouté		A (>50%)	A (>30%)	A (>15%)

C: colloïde; A : agrégats

L'utilisation d'agents stabilisants est alors nécessaire afin d'augmenter le taux de greffage du 4-mercaptophénol. Dans les mêmes conditions précédentes, nous avons déterminé les taux limites de greffage d'une série de composés thiolés:

Le mercaptoéthane sulfonate, permet d'améliorer la solubilité de la nanoparticule.

L'acide thiomaléique permet une dissolution légère de la nanoparticule et joue un rôle protecteur en surface.

L'acide thioctique, a été choisi pour éviter la réversibilité dans l'eau

L'acide 3,3-dithiodipropionique et l'acide 4,4-dithiodibutyrique ont été choisis pour évaluer l'effet de la longueur de la chaîne.

La (L)-glutathione est une molécule qui associe plusieurs fonctions. Elle permet une meilleure solubilisation, une protection à la surface de la nanoparticule.

L'étude de stabilité des nanoparticules greffées par ces composés, par granulométrie au bout de deux mois, montrent que le 4-mercaptophénol, le mercaptoéthane sulfonate et l'acide thiomaléique semblent être intéressants. Pour le mercaptoéthane sulfonate, ce n'est qu'après 8 semaines et 20 % de taux de greffage, que l'agglomération des nanoparticules est observée. L'acide thiomaléique est le composé qui a le moins d'influence sur l'agrégation.

Nous avons ensuite étudié l'effet combiné des trois dérivés thiolés (Figure B.10) à différentes proportions en pourcentage, après les différents essais effectués, le pourcentage suivant :

- 10 % des sites surfaciques greffés par le mercaptoéthane sulfonate pour améliorer la solubilité dans les solutions aqueuses
- 10 % des sites surfaciques greffés par l'acide thiomaléique pour protéger la surface de la nanoparticule
- 20 % des sites surfaciques greffés par le 4-mercaptophénol, pourcentage relativement faible pour éviter l'agglomération mais suffisant pour une fonctionnalisation ultérieure

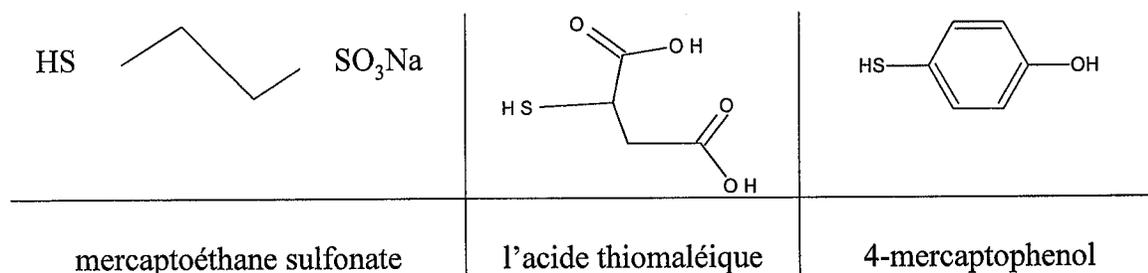


Figure B.10 : Thiols hydrophiles utilisés

a permis de montrer qu'une fonctionnalisation à hauteur de 40% de sites de surfaces accessibles par chacun des thiols permettait aux particules de rester parfaitement dispersées en milieu aqueux (persistance de la coloration rouge) pendant plusieurs semaines. La

resolubilisation complète des nanoparticules après leur précipitation par centrifugation est possible. La taille des nanoparticules est comprise entre 14 et 25 nm (Figure B.11). Il faut noter que très peu de publications décrivent l'utilisation simultanée de deux thiols pour stabiliser des particule d'or (59).

Les notations 10/10/20 ou 0,5/0,5/1 seront adoptées pour les solutions de nanoparticules obtenues par réduction à l'aide du citrate de sodium et fonctionnalisées par les thiols, le mercaptoéthane sulfonate, l'acide thiomaléique, et le 4-mercaptofenol avec les pourcentages respectivement de 10%, 10% et 20%.

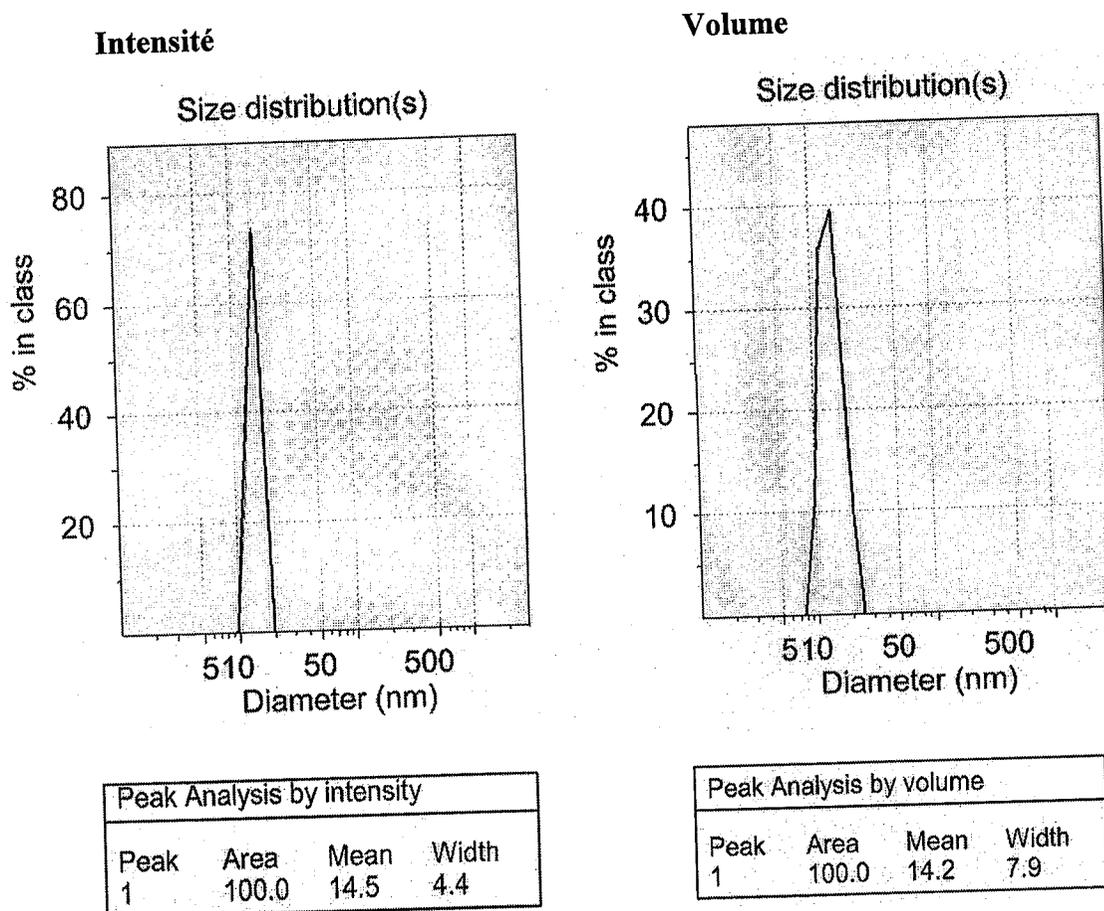


Figure B.11: Distribution de taille déterminée par P.C.S

En se basant sur les travaux de J. W. Slot (67), le diamètre des nanoparticules a été réduit en utilisant l'acide tannique. Nous avons réalisé une série d'expériences de synthèse de nanoparticules tout en préservant les pourcentages de greffage des trois thiols précédemment déterminés, dans lesquelles la concentration d'acide tannique varie. Le dispositif expérimental

et le protocole restant identiques. La distribution des tailles est déterminée par P.C.S. Les résultats obtenus sont regroupés dans le tableau B.4.

Tableau B.4 : Evolution de la taille en fonction du nombre de moles d'acide tannique ajouté

Nombre de mole d'acide tannique ajouté	2,9 10 ⁻⁷	5,9 10 ⁻⁷	5,9 10 ⁻⁶	4,1 10 ⁻⁵
Taille (nm)	26,7	20,9	7,3	5,8

Avec un nombre de moles d'acide tannique ajouté de 5,9 10⁻⁶ moles, nous obtenons, comme le montre les micrographies MET (Figure B.13) des nanoparticule de taille de 7,3 nm avec un écart type de 1,3 nm. Chacune de ces nanoparticules se compose de 12000 atomes d'or, 2540 atomes extérieurs d'or dont 850 sites surfaciques efficacement accessibles pour des thiols. 20% de ces sites c'est-à-dire 170, sont occupés par des espaceurs et constituent des sites de greffage ultérieurs.

III.5.2. Greffage de la lissamine rhodamine B sur des nanoparticules colloïdales stables

La fonctionnalisation des nanoparticules par le colorant s'effectue en deux étapes (figure B.12) : étape [1] celle du greffage primaire des thiols stabilisants, le 2-mercaptoéthane sulfonate (MS) et de l'acide thiomaléique (TA), et des molécules espaceurs, le 4-mercaptophénol (MP); étape [2] celle du greffage de la lissamine rhodamine B de sur l'espaceur.

Cette méthode a été choisie par rapport au protocole en une seule étape comportant le greffage direct de thiorhodamine sur les particules d'or parce qu'elle permet aux différents problèmes de synthèse d'être résolus séparément. Dans la première étape, la quantité de stabilisants MS et TA peut être ajustée pour obtenir une suspension colloïdale stable. Dans la deuxième étape, la fixation de la lissamine rhodamine B, d'un autre chromophore ou d'un groupement fonctionnel différent peut être optimisée.

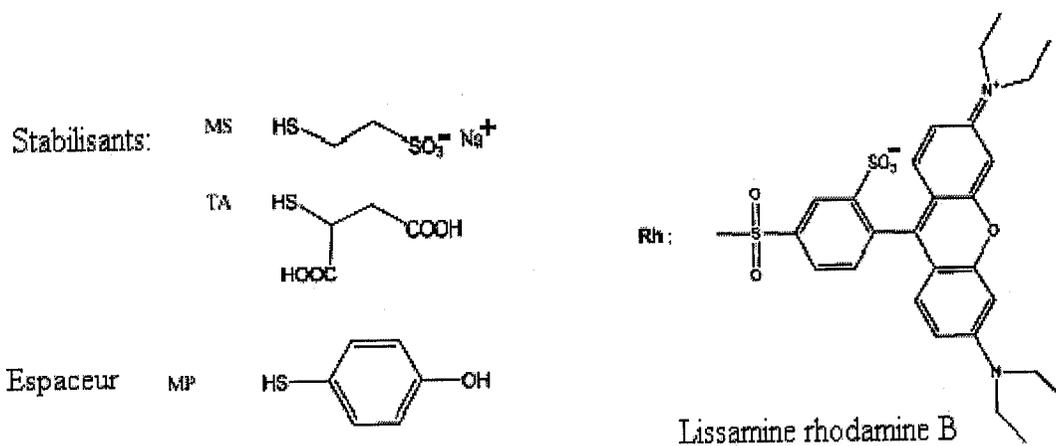
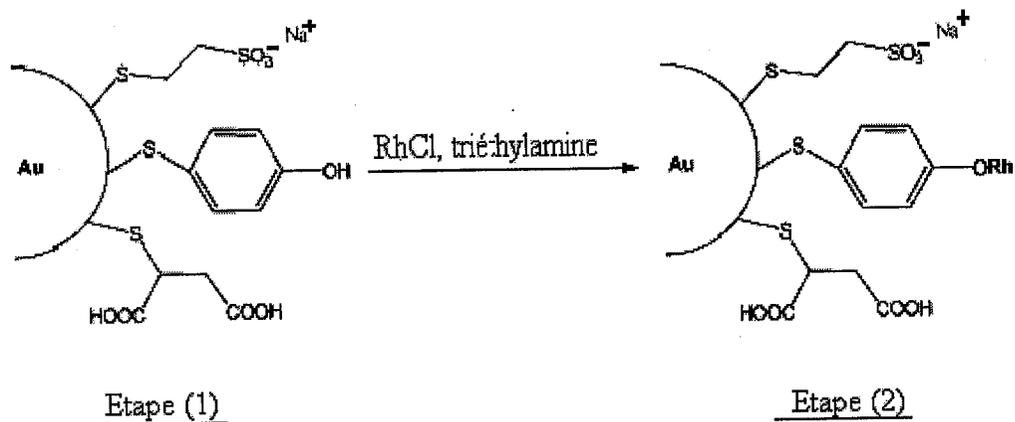


Figure B.12: Schéma des deux étapes de greffage.

Etape (1): greffage des deux stabilisants (2-mercaptoéthane sulfonate et acide thiomaléique) et d'un espaceur (4-mercaptophenol).

Etape (2): greffage de la lissamine rhodamine B sur l'espaceur.

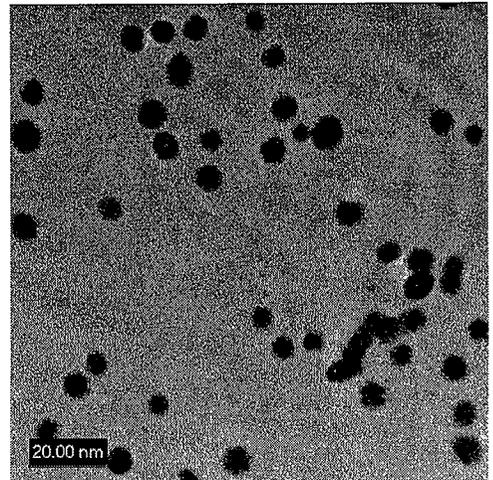
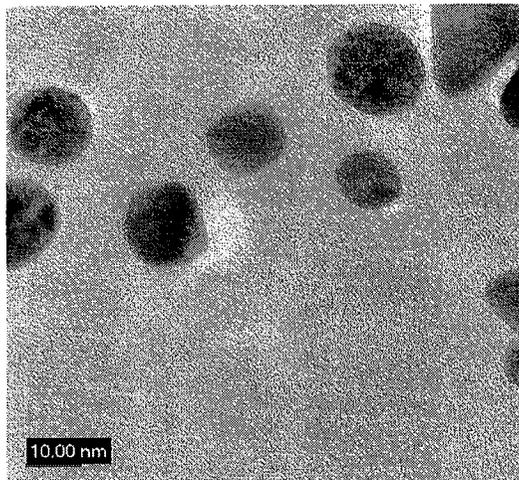
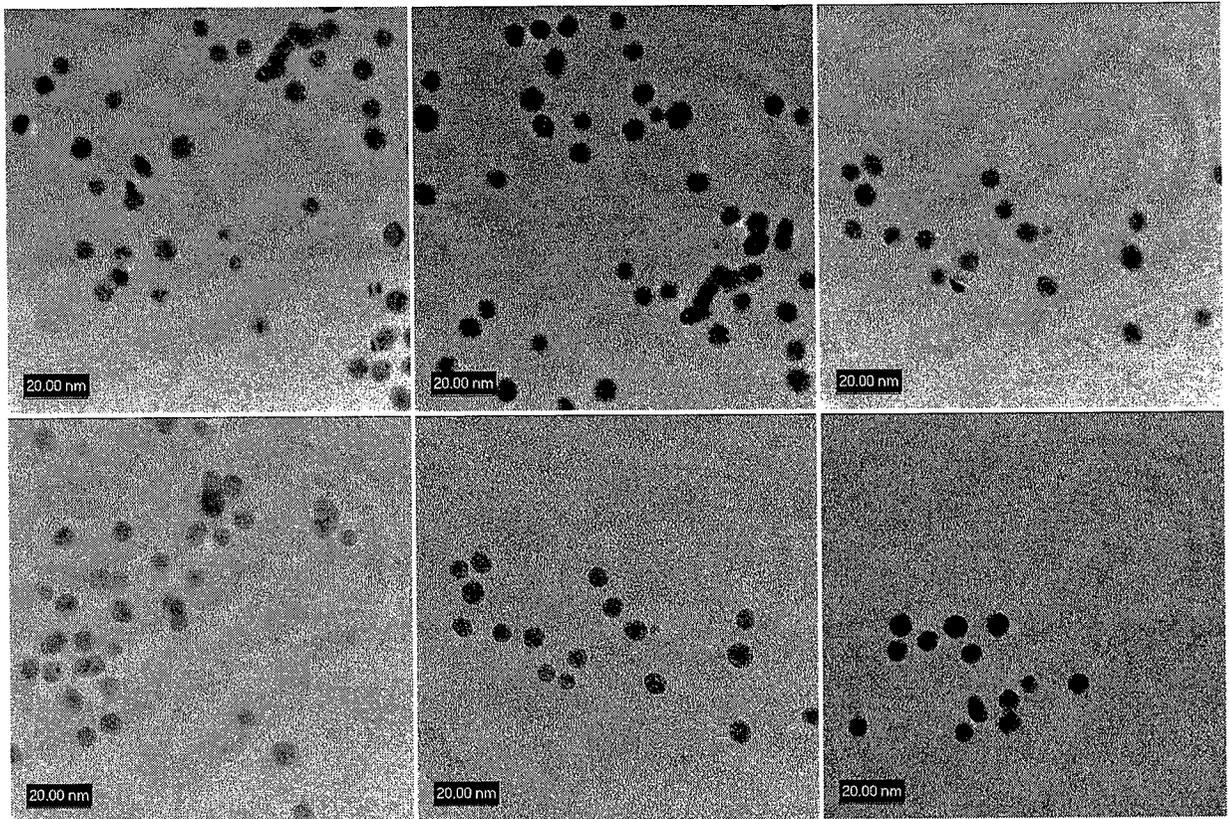


Figure B.13 : Micrographies MET de solution de nanoparticules 10/10/20 avec $5,9 \cdot 10^{-6}$ moles d'acide tannique.

Étape [1] D'abord, la nature et la quantité des espaceurs sur lesquels la lissamine rhodamine B sera greffée ont été déterminées en étudiant des particules d'or avec une taille de 16,2 nm.

Le greffage primaire est assuré par simple mélange des thiols avec les particules d'or en solution aqueuse. Contrairement à la voie de synthèse utilisant la borohydrure de sodium (NaBH_4) où un large excès de thiols est généralement utilisé conformément au protocole de synthèse conduisant à une adsorption concurrentielle. Avec la méthode utilisant le citrate sodium, cette quantité introduite peut être ajustée ou même choisie par défaut de sorte que tous les thiols puissent donner une liaison permanente. D'ailleurs, en connaissant la taille des particules, le nombre d'espaceurs peut être calculé par rapport à la superficie (nombre par nm^2) ou aux particules (nombre par particule). Il est comparé au nombre « théorique » correspondant à la totalité des sites surfaciques accessibles. Ceci est fait en supposant que chaque thiolate adsorbé ou greffé occupe sur les clusters la même surface que sur une surface plane d'or Au(111), c'est-à-dire 3 atomes accessibles (19). Cette surface est évaluée à $0,197 \text{ nm}^2$ (c'est-à-dire ≈ 5 thiols nm^{-2}) à partir de la surface d'un atome d'or en réseau cristallin CFC ($59 \text{ atomes nm}^{-3}$)(91). Nous avons constaté que, sur des clusters de taille de 2,2 nm, les thiolates occupent une superficie correspondant à seulement 1,75 atomes d'or (52). Comme déjà observé dans la littérature (72,76) la présence seule, des espaceurs (MP) mène à une agglomération significative. Des expériences menées ont montré que la stabilité des colloïdes pendant deux mois après l'addition du 4-mercaptophenol MP est réalisée seulement pour des densités d'espaceurs inférieure à $0,75 \text{ nm}^{-2}$, ce qui correspond à moins de 15% des sites surfaciques accessibles. Pour obtenir des quantités significatives de molécules de colorant greffés sur les particules colloïdales stables, l'addition de stabilisants est alors nécessaire (tableau B.5). Ceci a été réalisé en ajoutant les deux thiols décrits précédemment (92) le MS et le TA dans des proportions déterminées par différentes expériences préliminaires. Dans le but d'obtenir des particules avec au moins 1 espaceur par nm^2 (qui correspond à $\approx 20\%$ des sites surfaciques greffés), nous avons constaté que le greffage à (0,5 MS, 0,5 TA, 1 MP) par nm^2 était la condition minimale pour obtenir une solution colloïdale stable pendant des mois. Ceci correspond à un taux d'occupation de 40% de sites surfaciques accessibles des atomes d'or. Ce compromis permet également la resolubilisation totale des nanoparticules après leur précipitation par centrifugation. Le protocole a été modifié en ajoutant l'acide tannique lors de la synthèse (67). Le diamètre des particules a été alors réduit mais la quantité des thiols a été ajustée pour préserver les densités de greffage déterminées précédemment (tableau B.3). Comme le montre la microscopie électronique en transmission, de plus petites particules ont

été obtenues (7,3 nm avec un écart type de 1,3 nm): elles sont polycristallines avec une structure CFC (figure B.14). Chacune d'elles a une surface moyenne de $168 \pm 15 \text{ nm}^2$ de sorte que 168 ± 15 espaceurs/particules aient été introduits en solution. Ces espaceurs constituent les sites de greffage pour les colorants.

Tableau B.5 : Evolution de la taille des nanoparticules ($\pm 1 \text{ nm}$) en fonction des ajouts des thiols. 0,5/0,5/1 (ou 0/0/1) dénote une densité de greffage de 0,5 TA, 0,5 MS, 1 MP (ou 0 TA, 0 MS, 1 MP) molécules par nm^2

	0/0/1	0,5/0,5/1	
		Sans acide Acide tannique	Avec Acide tannique
Taille de la particule après 1 heure	16,2 nm	16,2 nm	7,3 nm
Taille de la particule après 2 mois	Agrégat	22,9 nm	8,4 nm

Étape [2] La fonctionnalisation par la lissamine rhodamine B a été finalement effectuée en présence d'un excès de triéthylamine: une solution rose/rouge foncée est alors obtenue. On s'attend à ce que la lissamine rhodamine B se fixe par substitution sur le groupement phénolique du MP et s'adsorbe sur les particules.

En considérant l'objectif de préparer les nanoparticules fortement luminescentes, il est important de vérifier que la présence de l'or, connu pour absorber fortement dans la gamme UV, ne réduit pas l'intensité de luminescence. Ceci a été fait en comparant la luminescence des colorants greffés sur les particules d'or à une solution contenant seulement le colorant à la même concentration. La diminution de la luminescence par seulement un facteur 3, est identique indépendamment de la présence des espaceurs et de la concentration de la lissamine rhodamine B entre 5 et 500 molécules par particule. Ceci est illustré dans la figure B.15 pour une concentration de 8,6 molécules par particule. Une telle diminution est modérée parce que la bande de fluorescence à 585 nm ne recouvre pas avec la surface de la bande plasmon de l'or à 540 nm. Elle ne devrait jamais compromettre l'augmentation de luminescence prévue avec la fixation de plusieurs colorants sur la même particule.

Des études de cytotoxicité de ; (a) nanoparticules d'or « nues », (b) nanoparticules d'or fonctionnalisées par le thiophénol, et (c) nanoparticules d'or fonctionnalisées par la lissamine rhodamine B, sont effectuées par les biologistes du laboratoire de Châtney-Malabry Faculté de Pharmacie, Université Paris-Sud, 92226 Châtenay-Malabry. Les résultats voir annexe III prouvent leur biocompatibilité.

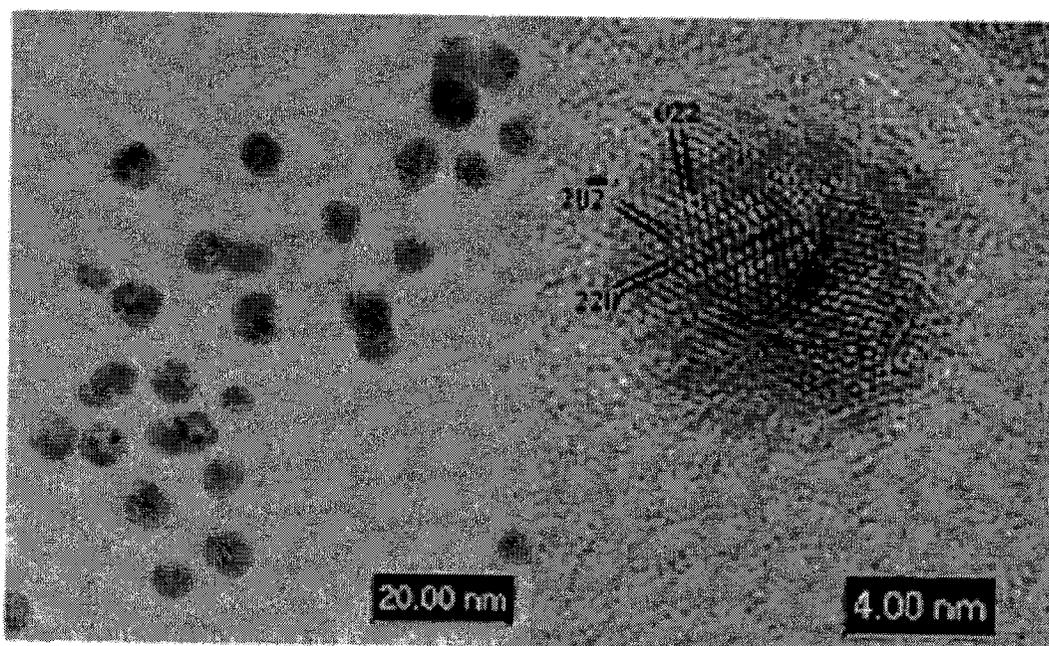


Figure B.14: Micrographies électroniques à Transmission MET de nanoparticules d'or(0.5/0.5/1) préparées avec l'acide tannique.

Indexation de quelques plans dans la phase CFC
(l'image est perpendiculaire à la direction de $\langle 111 \rangle$)

III.5.3. Une procédure spécifique pour doser les colorants fixés sur les particules

La preuve que les colorants sont efficacement liés sur les nanoparticules ne peut pas être déduite des spectres d'émission puisqu'il est connu (et vérifié par nos expériences, figure B.15) qu'un tel greffage n'induit aucune variation apparente dans le maximum de luminescence (72).

Également, les spectres d'absorption représentés en figure B.16 sont insuffisants pour déterminer le rapport adsorption/greffage puisque aucun changement concluant des maximums d'absorption n'est noté. Seulement pour les faibles concentrations de colorant un petit déplacement (moins de 2 eV) est observé dans la bande d'absorption visible du colorant.

Ce changement des propriétés optiques est observé dans le cas de la rhodamine B adsorbée sur des particules d'argent (93). Il est dû au champ local de la molécule qui est augmenté par le champ de dipôle de la sphère résonnante de plasma.

Cependant, le décalage observé est considérablement masqué par la bande plasmon des particules d'or de sorte qu'il ne permette aucune détermination de la quantité de colorants greffés. Afin de prouver et quantifier le nombre de colorants fluorescents greffés sur les particules, un procédé spécifique a été employé. Il consiste à doser les colorants restants en solution après précipitation par addition de sel, des particules et des chromophores qui y sont attachés. Cette méthode est semblable à celle employée par Schroedter et coll. quand il a prouvé la fixation de la biotine sur les particules d'or (94).

Les dosages ont été faits sur des particules fonctionnalisées par des espaceurs avec une densité de (0,5 MS, 0,5 TA, 1 MP) par nm^2 . Ceci correspond à 84 MS, 84 TA et 168 MP par particule. La procédure complète pour mesurer la quantité de colorants fixés sur ces particules notées (0,5 MS, 0,5 TA, 1 MP) est décrite dans figure B.17. Par ailleurs, les particules synthétisées et greffées selon les étapes (1) et (2) sont précipitées par l'addition de NaCl (figure B.17, gauche). La fluorescence du surnageant est alors mesurée; le signal obtenu est caractéristique des colorants qui n'ont pas été fixés sur les particules (figure B.18, gauche). D' autre part, des solutions de référence ont été préparées. Elles se composent de la solution identique sauf que les colorants ont été ajoutés seulement après la précipitation des particules obtenues selon l'étape (1), après la précipitation par addition de sel, le colorant est ajouté selon l'étape (2). La fluorescence du surnageant de référence est alors mesurée. Elle correspond à tous les colorants introduits et comme prévu (figure B.18, droite) la fluorescence est la plus importante (figure B.18, gauche). La quantification des colorants fixés sur les particules peut alors être facilement réalisée en comparant les éventails de luminescence des

Deux solutions (figure B.19). La même quantification a été effectuée en mesurant l'absorbance des surnageants. Elle mène aux résultats semblables, comme présenté dans la figure B.19.

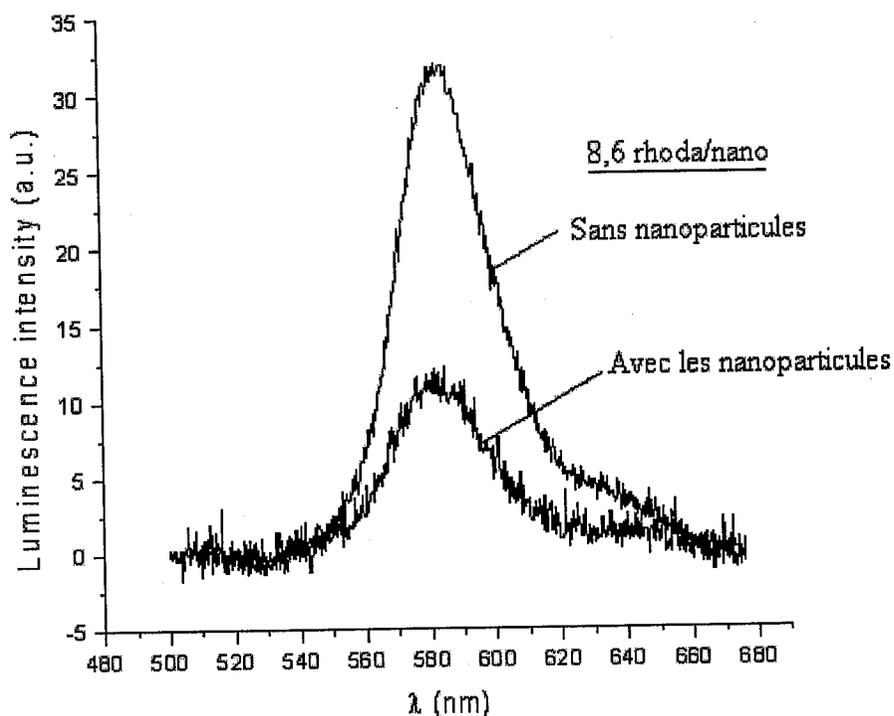


Figure B.15: Comparaison de la luminescence des colorants libres et en présence de nanoparticules d'or. Dans les deux solutions, la concentration en colorant est la même et correspond à 8,6 molécules de colorant par nanoparticule

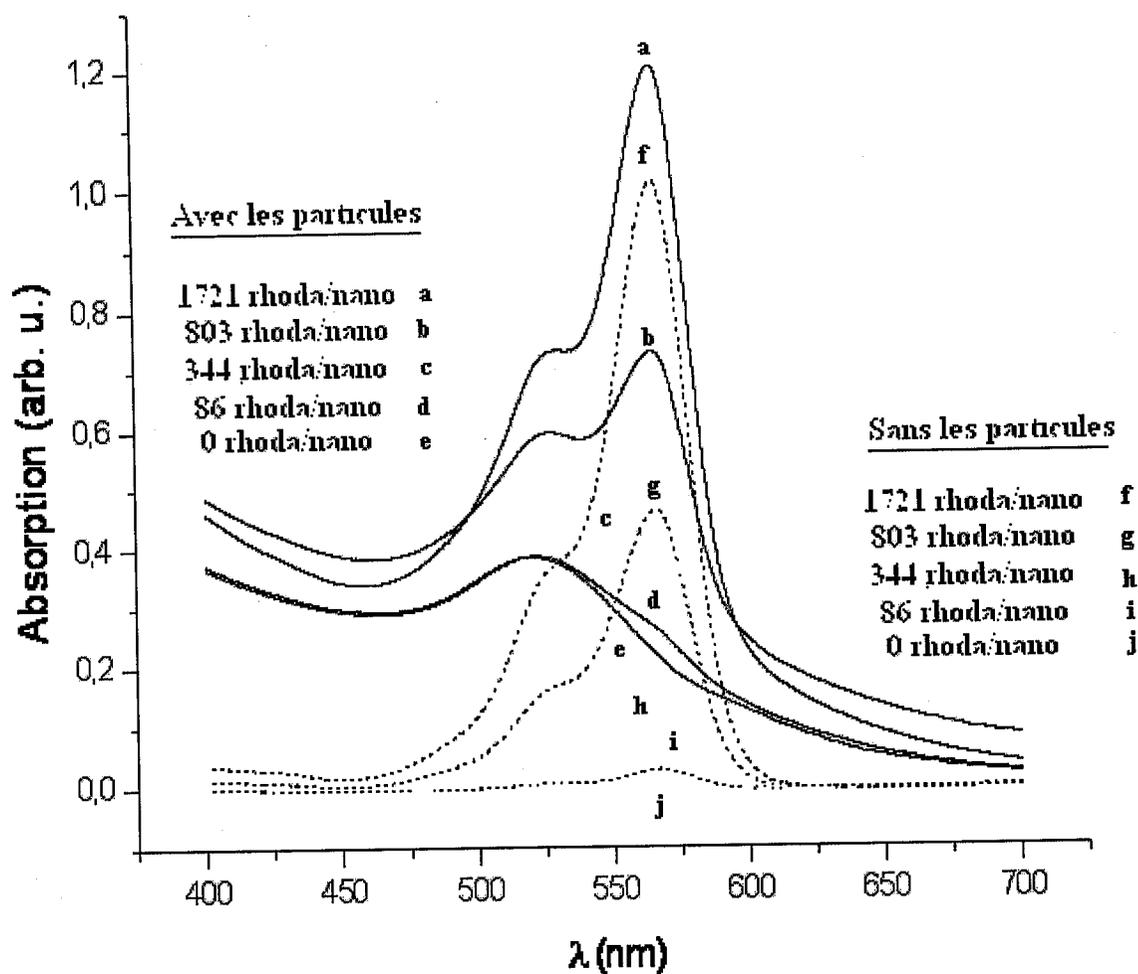


Figure B.16: Absorption des colorants en présence et en absence de nanoparticules d'or pour différentes quantités de lissamine rhodamine B introduite.

Les dosages ont été effectués pour les mêmes particules mais sans espaceurs, c'est-à-dire ayant une densité de greffage de seulement 0,5 MS et 1,5 TA par nm^2 . Ces particules notées (0,5 MS, 1,5 TA, 0 MP) au lieu de (0,5 MS, 0,5 TA, 1 MP) ont été soumises au même procédé comme décrit dans la figure B.17 (milieu).

Les résultats sont donnés dans la figure B.19. Ils devraient permettre de distinguer entre l'adsorption et le greffage en comparant l'efficacité du colorant greffé aux particules ayant des espaceurs sur leur surface.

Le premier résultat est la différence forte des nombres des colorants fixés sur les particules selon la présence ou non d'espaceurs phénoliques.

Dans le cas de particules sans espaceurs, les colorants fixés sur les particules sont seulement adsorbés; les colorants additionnels fixés quand les particules comportent le MP sur leur surface, sont attribués au greffage des colorants sur ces espaceurs. La quantité de colorants adsorbée augmente avec celle introduite. La même observation peut être faite pour les colorants greffés jusqu'à un seuil situé à environ 550 colorants par particule.

À cette concentration, il y a ≈ 200 molécules de colorants greffés par particule, ≈ 80 adsorbés et ≈ 270 restants en solution. Une telle valeur 200 ± 30 est en parfait accord avec le nombre d'espaceurs prévus sur les particules et qui est 168 ± 15 . Le nombre de molécules de colorant trouvées sur les particules coïncide avec celui des espaceurs introduits lors de la synthèse. Ceci est alors la preuve de deux résultats importants: d'abord, tous les espaceurs introduits en solution ont donné une liaison permanente avec les particules d'or, et ont assuré le greffage effectif des colorants. C'est aussi, la première preuve expérimentale que la réaction d'un alcanethiolate sur la surface d'or est, dans le cas de la synthèse par la voie citrate, presque totale.

En ajoutant plus de molécules de colorant, seule l'adsorption reste possible. Ce résultat est confirmé par les pentes des courbes relatives aux particules avec et sans MP. Tous ces résultats montrent que le greffage total peut être réalisé par les espaceurs phénoliques. Ils valident également le procédé très simple utilisé pour déterminer la quantité de colorants adsorbés ou greffés sur des particules.

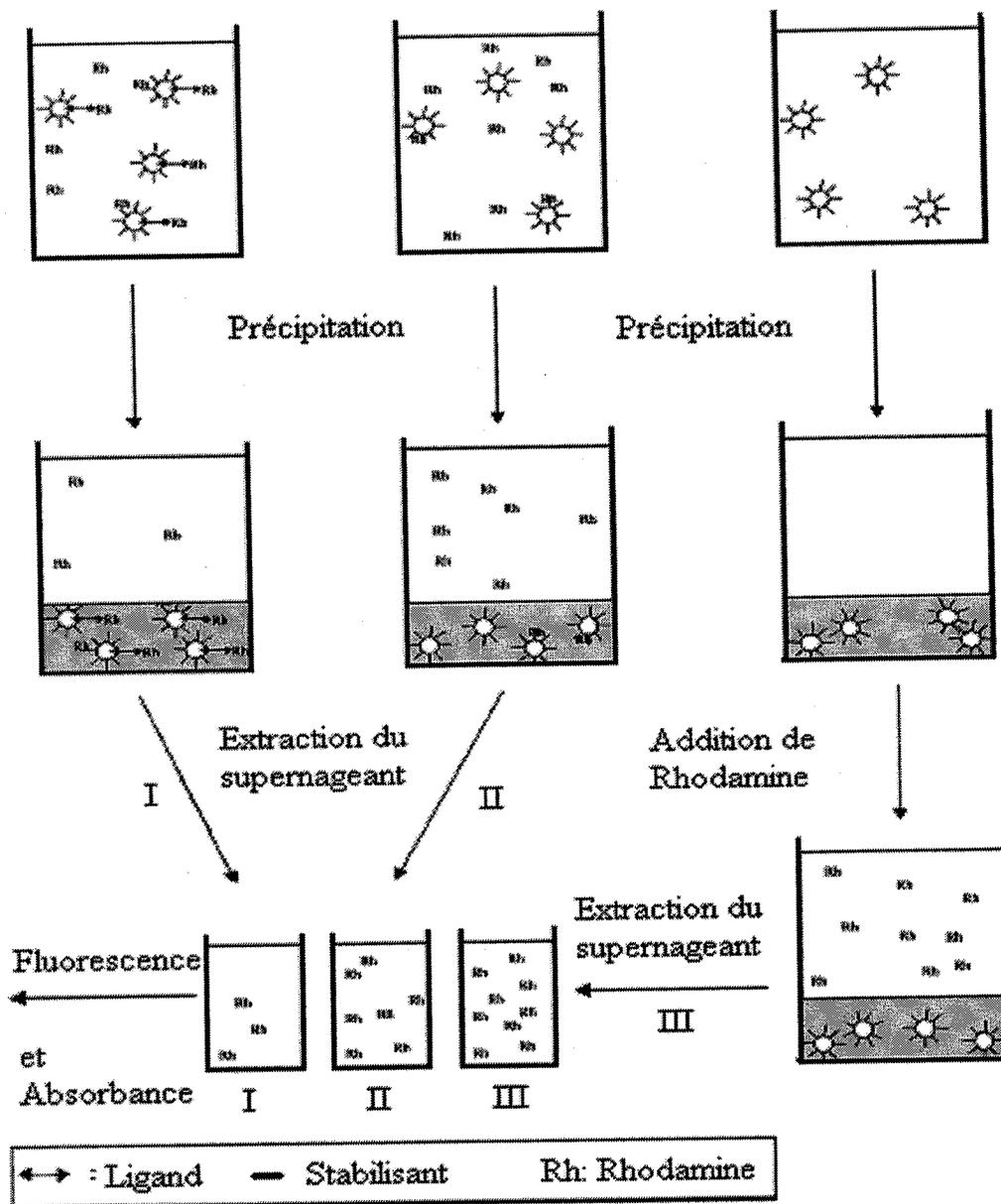


Figure B.17 : Procédure pour doser les colorants (Rh) fixés sur les nanoparticules. A gauche: dosage des colorants sur des nanoparticules ayant des espaceurs (les colorants sont adsorbés, greffés ou libres en solution);

Au milieu: dosage des colorants sur des nanoparticules sans espaceurs (les colorants sont adsorbés ou libres);

A droite: solution de référence (tous les colorants sont libres).

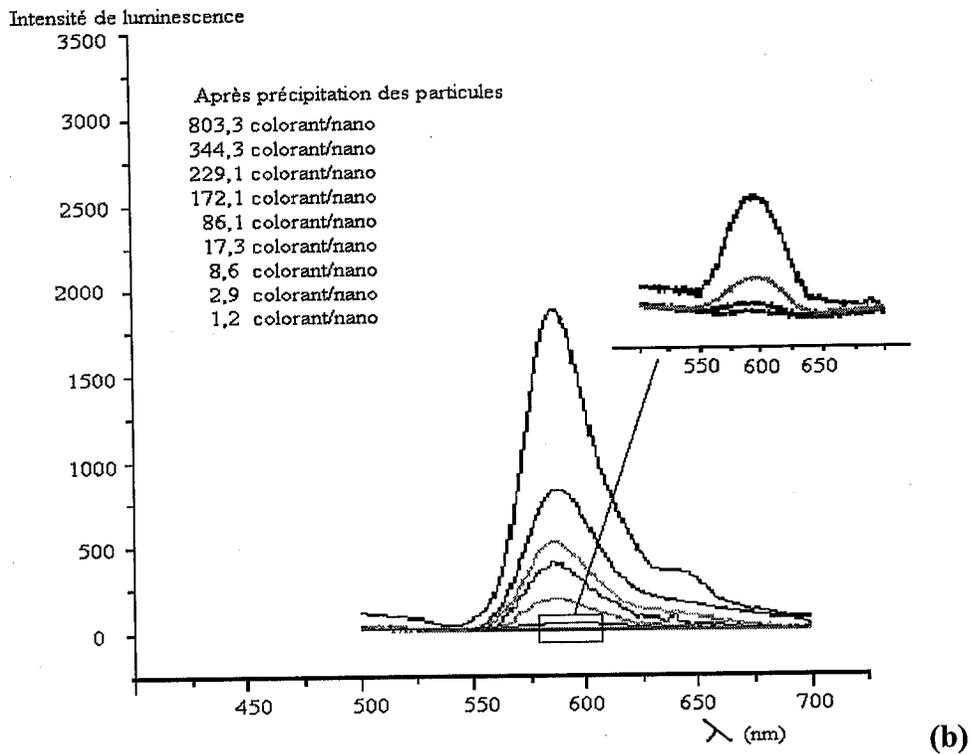
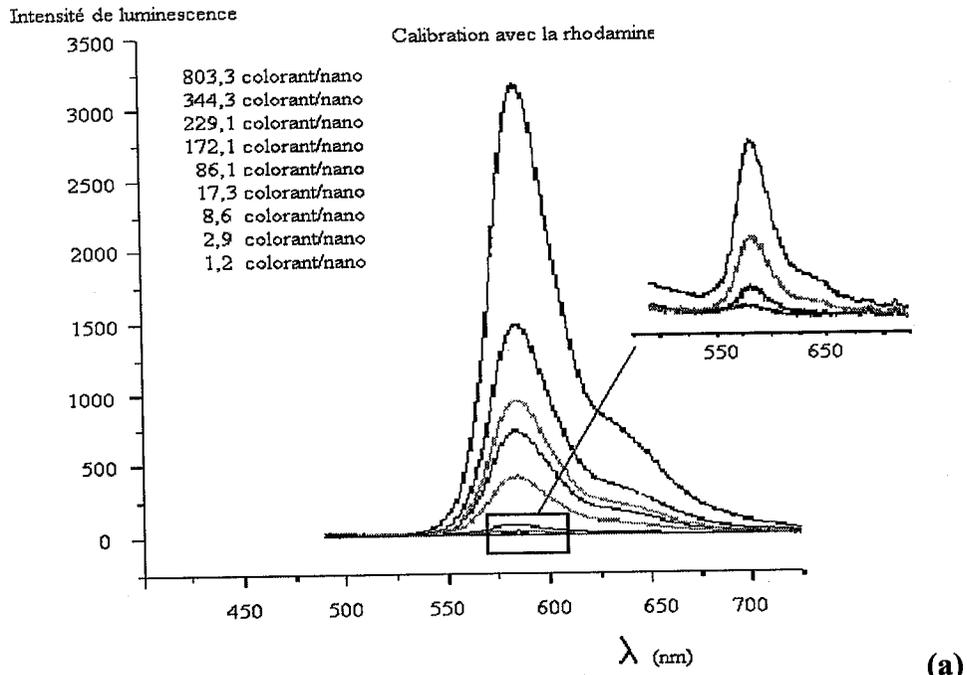


Figure B.18 : fluorescence des supernageants préparés selon les procédures I (gauche) et III (droite) de la figure B.17. **(a) :** luminescence de tous les colorants introduits **(b) :** luminescence après la précipitation des nanoparticules avec des espaceurs; La différence entre les intensités est directement proportionnelle à la quantité des colorants attachés aux nanoparticules.

Nombre de colorant effectivement greffé ou adsorbé

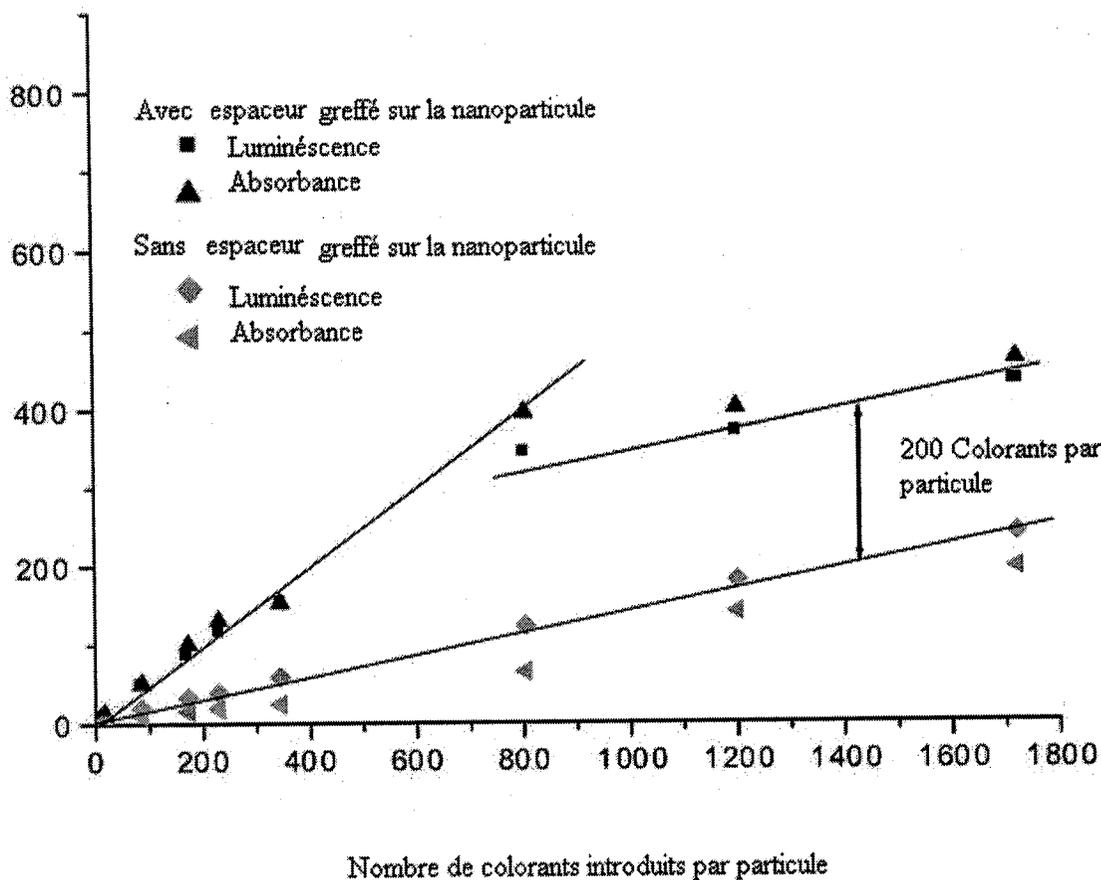


Figure B.19 : Évaluation des quantités de colorants adsorbés et greffés sur des nanoparticules d'or

Conclusion

Une procédure originale pour évaluer l'efficacité de greffage d'un colorant sur des particules d'or a été examinée et validée. Elle consiste à doser les colorants restants en solution après avoir forcé la précipitation des particules par addition de sel. Elle nous a démontré que, dans le cas d'un procédé en deux étapes (le greffage des espaceurs sur des particules, ensuite des colorants sur les espaceurs), les résultats sont concluants. En particulier nous avons montré que tous les espaceurs peuvent être de manière permanente liés aux particules d'or lorsque leur nombre est inférieur à celui des sites surfaciques accessibles.

En conclusion, il faut noter qu'un nouveau nanomatériau potentiellement candidat pour augmenter le seuil de détection des sondes biologiques a été synthétisé. Il est possible de greffer au moins 200 colorants/particules, en présence des particules d'or, la luminescence est diminuée par seulement un facteur 3, donc ≈ 70 colorants peuvent être raisonnablement prévus pour augmenter l'efficacité de détection.

III.5.4. Fonctionnalisation des nanoparticules par la rhodamine thiolée

Après avoir montré qu'il était possible de préparer des particules d'or de faible taille par la méthode citrate en utilisant l'acide tannique, nous avons étudié leur fonctionnalisation primaire par les trois thiols et leur fonctionnalisation secondaire par la lissamine rhodamine B (colorant). Les résultats montrent que le colorant se fixe sur l'espaceur par réaction de substitution nucléophile mais aussi par adsorption physique sur la particule. Afin d'éviter le greffage du colorant par adsorption et de mieux contrôler le nombre de molécules de colorants greffées, nous avons dans une première étape synthétisé la rhodamine thiolée selon le mode opératoire décrit dans la partie expérimentale. Le produit de synthèse est caractérisé par Spectrométrie de masse (Annexe I) et par Infra Rouge (Annexe II). Dans une deuxième étape, nous avons procédé à la fonctionnalisation des nanoparticules par les trois thiols (Figure B.20) 10% des sites accessibles de surface sont greffés par l'acide thiomaléique (AT) 10% par le mercaptoéthane sulfoanate (MS) et les 20% restants sont greffés par le 4-mercaptophénol et la rhodamine thiolée produit de la synthèse précédente aux proportions respectivement (20%,0%), (15%,5%), (10%,10%), (5%,15%) et (0%,20%).

a). Analyses UV/Visible et luminescence

La lissamine rhodamine B est caractérisée par une absorbance à 565 nm et une forte émission fluorescente à 586 nm. Le greffage effectif du colorant couplé à l'aminothiols, sur la

nanoparticule d'or est mis en évidence par l'analyse UV/Visible et par la luminescence des solutions colloïdales et des surnageants après précipitation des nanoparticules d'or par saturation au sel. La courbe de la Figure B.21 montre l'efficacité de la précipitation des particules d'or par la saturation au sel, donc pour une concentration de 0,6 M de NaCl l'addition d'un volume égal à celui de la solution colloïdale permet l'élimination totale des particules qui précipitent. Cette valeur est utilisée pour le reste des expériences.

Les spectres UV-Visible représentés en Figure B.22 mettent en évidence une absorbance à 565 nm de la rhodamine et le thio-rhodamine libres, pour les différentes solutions de nanoparticules greffées à différents pourcentages. On constate un léger déplacement du pic d'absorption du colorant à 570 nm ce qui prouve qu'il est bien greffé. La hauteur du pic dépend du pourcentage du colorant greffé. Les spectres d'émission en luminescence (Figure B.23) présentent les mêmes allures des pics à 586 nm. Les surnageants ne présentent aucune émission en luminescence et de même en absorbance UV-Visible comme on le voit en Figure B.24 où l'absorption à 565 nm est nulle pour les solutions de surnageants. Ces résultats confirment que toutes les molécules de colorants sont effectivement greffées sur les nanoparticules et ont été éliminées après précipitation.

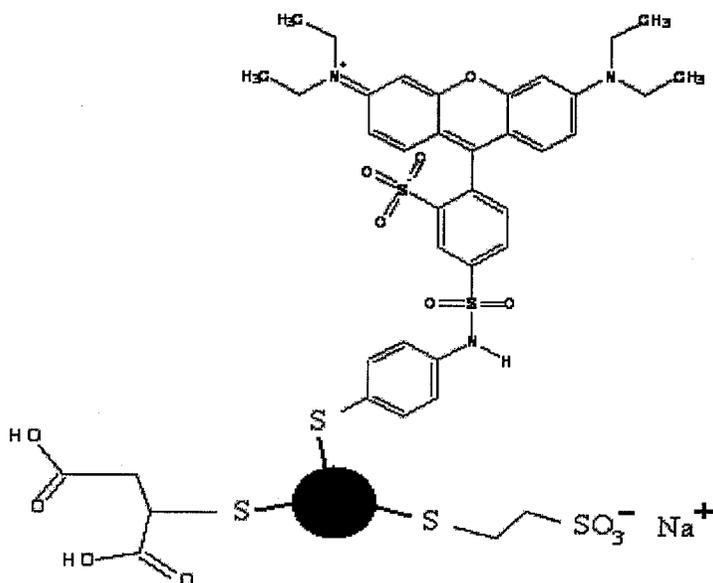
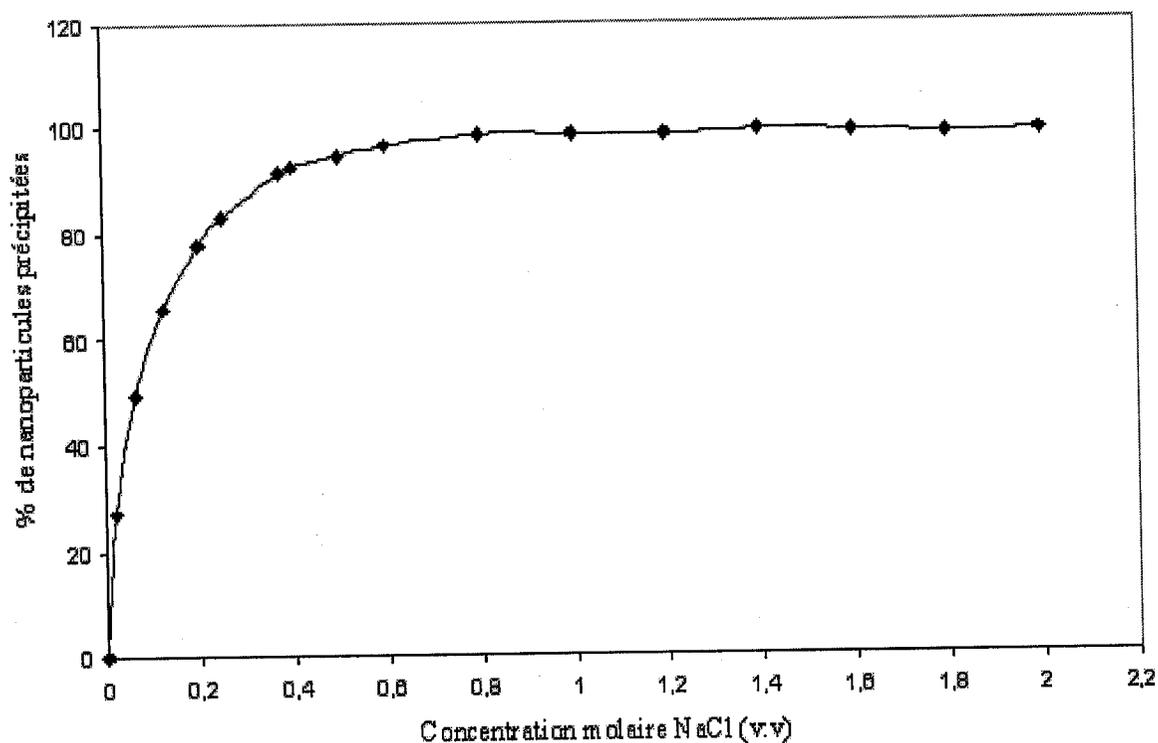


Figure B.20 : Schéma de la particule fonctionnalisée par les thiols



Fig

ure B.21 : Effet de la concentration de la solution de NaCl sur la précipitation des nanoparticules

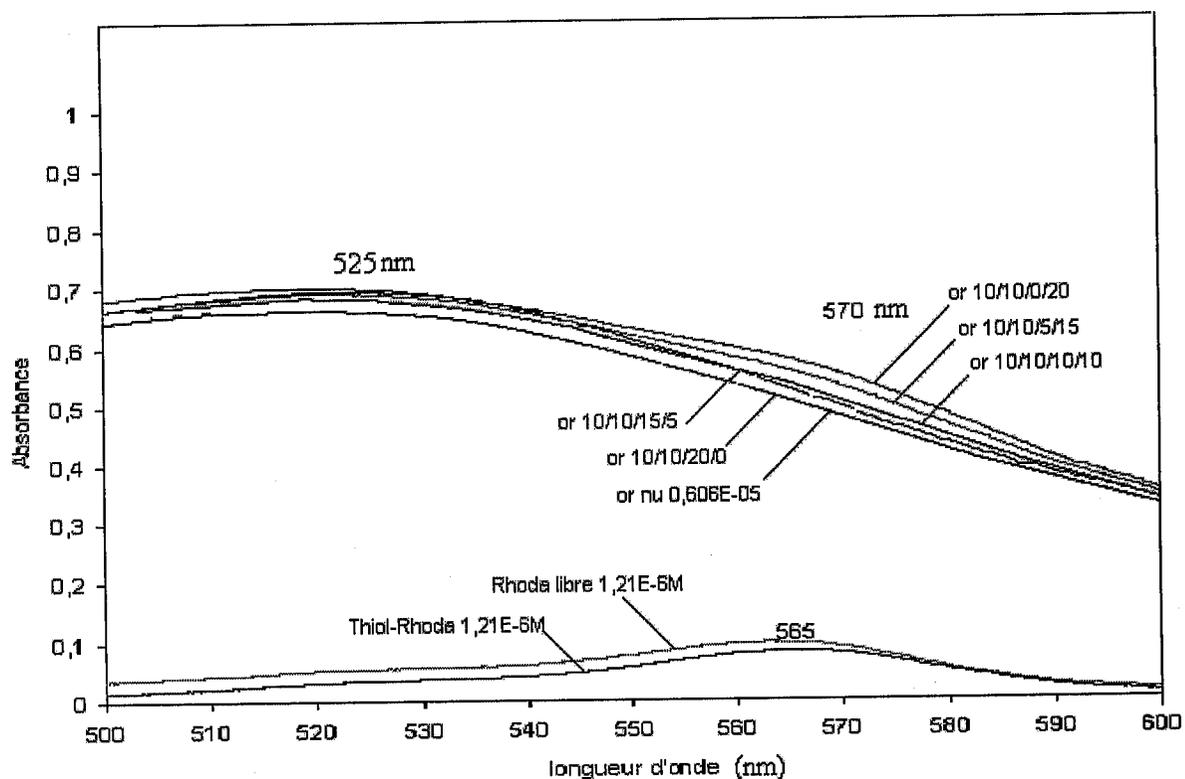


Figure B.22 : Spectres d'absorption de solutions de nanoparticules fonctionnalisées

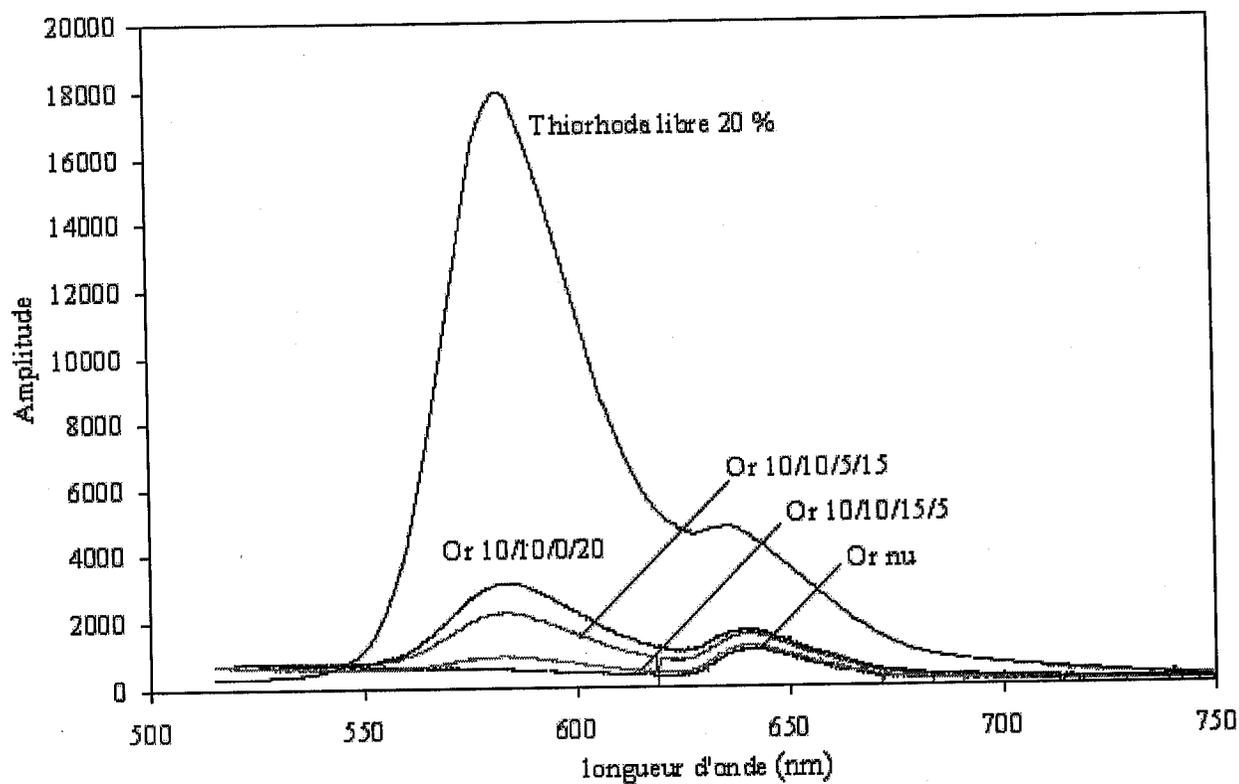


Figure B.23: Spectres d'émission en luminescence de nanoparticules d'or fonctionnalisées.

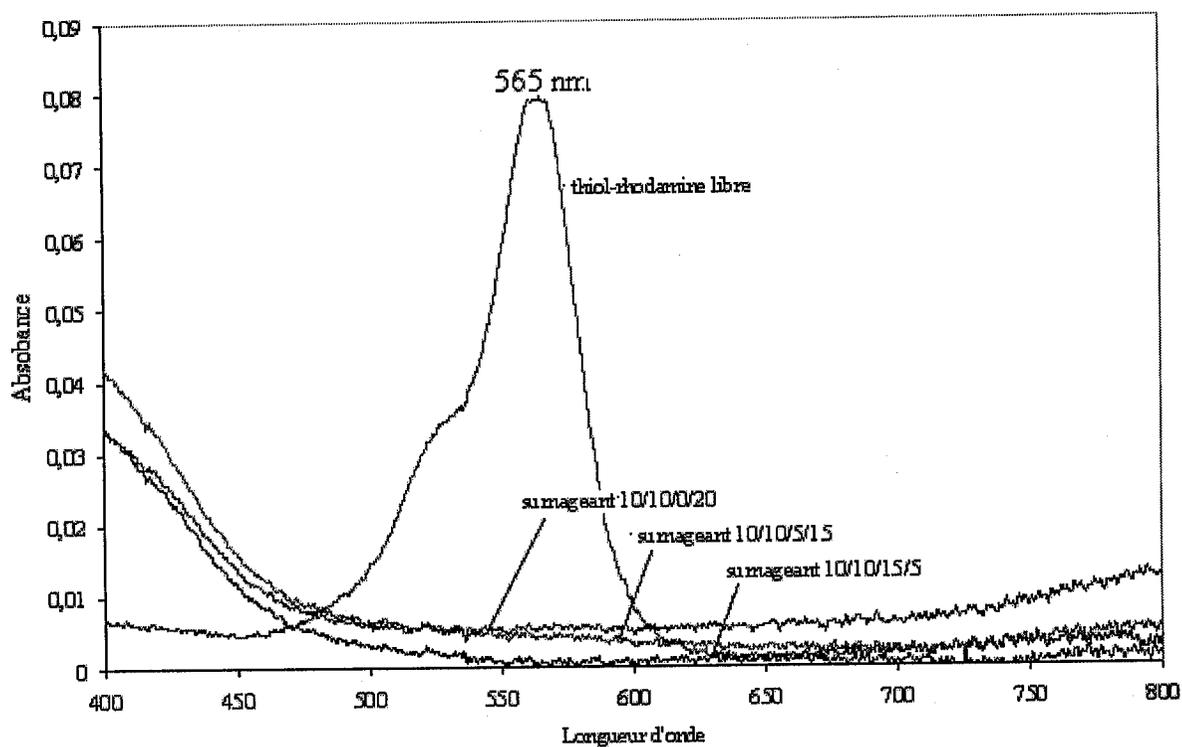


Figure B.24 : Spectres d'absorbance des surnageants après précipitation

Conclusion

Nous avons montré que :

La synthèse de nanoparticules d'or et le greffage du MS et TA à leur surface permet d'obtenir les fonctionnalités requises de solubilité et de protection.

- Le couplage du colorant à l'aminothiophénol avant son greffage sur la nanoparticule permet de contrôler et de quantifier le nombre de colorants greffé.
- Tous les espaceurs peuvent être de manière permanente liés aux particules d'or lorsque leur nombre est inférieur à celui des sites surfaciques accessibles
- Il est possible de greffer au moins 200 colorants/particules, la luminescence est diminuée par un facteur 3, donc ≈ 70 colorants peuvent être raisonnablement prévus pour augmenter l'efficacité de détection.
- Une procédure originale pour évaluer l'efficacité de greffage d'un colorant sur des particules d'or a été examinée et validée et un nouveau nanomatériau potentiellement candidat pour augmenter le seuil de détection des sondes biologiques est synthétisé

Perspectives

D'autres analyses complémentaires sont à effectuer. L'utilisation de nouvelles techniques d'analyse comme le Raman exalté de Surface permet de mieux caractériser ces nanoparticules

le développement des nanoparticules hybrides pour la réalisation de matériaux dendrimères mixtes ou polymères composites peut permettre des applications plus physiques notamment en optique non linéaire

Références bibliographiques

1. Musa R. Kamel ; James D. Wuest ; Michael Isaacson. **Rapport sur les discussions lors de l'atelier sur les nanotechnologies** (FCI) (2001).
2. Wang Z.L., **Adv Mater.**, 10, 13, (1998).
3. Schmid G., Chi L.F., **Adv Mater.**, 10, 515, (1998).
4. Alvisatos A.P., **Science**, 271, 933. (1996).
5. Tomalia D.A., **Adv. Mater.**, 6, 529, (1994).
6. Andres R.P., Averback R.S., Brown W.L., Brus L.E., Goddard W.A., Kaldor A., Louie S.G., Moscovits M., peercy P.S., Riley S.J., Siegel R.W., Spaepen F., Wand Y., **J. Mater.Res.** 4, 704 (1999).
7. **Nanomaterials: Synthesis, Properties and Applications**, edited by **A.Edelstein and R. Cammarata**, Institute of of Physics Publishing, London (1996).
8. Judenstein P., Sanchez C., **J. Mater. Chem.**, 6, p511-525, (1996).
9. Schmid G., Peschel St., Sawitowski T., **Z. Anorg. Allg.Chem.**, 623, p715-723, (1996).
10. M.Bruchez, M.Moronne, P.Gin, S.Weiss and P.A.Alvisatos, **Science**, , 281, 2013, (1998).
11. Kreibig U.and Vollmer M., **Optical Properties of Metal Clusters**, **Springer Series in Material Science 25**, Springer, Berlin, (1995).
12. Niemeyer, C.M., **Angew. chem.** Int. Ed., , 40, 4128, (2001).
13. Lippincott-Schwartz J. and Patterson G.H., **Science** 300, 87-91, (2003).
14. Levi S.A., Mourran A., Spatz J.P., van Veggel F.C., Reinhoudt D.N., Möller M. **Chem. Eur. J.**, , (16), 3808. (2002).
15. Siegel, R. W., **Mater. Sci. Eng. A**, , 168, (1993).
16. Ngyen, H.U.; Collins, R.W., **J. Opt. Soc. Am. A**, , 10, 515, (1993).
17. Guzzi, L.; Peto, G. ; Beck, A. ; Frey, K. ; Geszti, O.; Molnar, G.; Daroczi, C., **J. Am. Chem. Soc.**, , 125, 4332, (2003).
18. Maxwell, D.J.; Taylor, J.R.; Nie, S., **J. Am. Chem. Soc.**, , 124, 9606, (2002).

19. Niemeyer, C., **Angew. Chem. Int. Ed.**, , 40, 4128, (2001).
20. Yonezawa T., Yasui K. and Kimizuka N., **Langmuir**, , 17, 271-273, (2001).
21. Nuzzo R.G. and Allara D.L., **J. Am. Chem. Soc.**, 105, 4481-4483, (1983).
22. Heister K., Allara D.L., Bahnck K., Frey S., Zharnikov M. and Gunze M., **Langmuir**, , 15, 5440-5443, (1999).
23. Badia A., Demers L.L., Dickinson L., Morin F.G., Lennox R.B. and Reven L., **J. Am. Chem. Soc.**, 119, 11104-11105, (1997).
24. Shon, Y.S.; Gross, S.M.; Dawson, B.; Porter, M.; Murray, R.W., **Langmuir**, , 16, 6555, (2000).
25. His A.; Uvdal, K.; Liedberg, B., **Langmuir**, , 9, 733, (1993).
26. Leff, D.V.; Brandt, L.; Health, J.R., **Langmuir**, , 12, 4723, (1996).
27. Weare, W.W.; Reed, S.M.; Warner, M.G.; Hutchinson, J.E., **J. Am. Chem. Soc.**, , 122, 12980, (2000).
28. Wescott, S.L., Oldenburg, S.J.; Lee, T.R.; Halas, N.J., **Langmuir**, , 14, 5396, (1998).
29. M.Hostetler, R.Murray, S.Green, **Langmuir**, 14, p17-30, (1998).
30. Schlenoff, J.B.; Li, M.; Ly, H., **J. Am. Chem. Soc.**, 1995, 117, 12528 Clusters, **Springer Series in Material Science 25**, Springer, Berlin, (1995)..
31. Schaaf, T.G.; Shafigullin, M.N.; Khoury, J.T.; Whetten, R.L.; Cullen, W.G.; First, P.N., **J. Phys. Chem. B**, , 101, 7885, (1997).
32. Paik, W.K.; Eu, S.; Lee, K., Chon, S., Kim, M., **Langmuir**, , 16, 10198, (2000).
33. Sibbad, M.S.; Chumanov, G.; Cotton, T.M., **J. Phys. Chem. B**, , 100, 4672, (1996).
34. Mafuné, F.; Kohno, J.Y.; Takedo, Y.; Kondow, T., **J. Phys. Chem. B**, , 105, 9050, (2001).
35. François, L.; Mostafavi, M.; Belloni, J.; Delois, J.F.; Delaire, J.; Feneyrou, P., **J. Phys. Chem. B**, , 104, 6133, (2000).
36. Esumi, K.; Suzuki, A., Aihara, N.; Usui, K. Torigoe, K., **Langmuir**, 1998, 14, 3157
37. Slot J.W., Geuze H.J., **Eur. J. of Cell Biol.**, 38, 87-93 (1985)

38. Brust M., Walker M., Bethell D., Schiffrin D.J. and Whyman R., **J. Chem. Soc., Chem. Com.**, 801-802, (1994).
39. Seo, Y.S.; Kim, K.S.; Shin, K.; White, H.; Rafailovich, M.; Sokolov, J., **Langmuir**, , 18, 5927, (2002).
40. Baschong, W.; Lucocq, J.M.; Roth, J., **Histochemistry**, , 83, 409, (1985).
41. Esumi, K.; Satoh, K.; Torigoe, K., **Langmuir**, , 17, 6860, (2001).
42. Zhou, Y.; Itoh, H.; Uemura, T.; Naka, K.; Chujo, Y., **Chem. Commun.**, , 613, (2001).
43. Selvakannan, P.R.; Mandal, S.; Pasrischa, R.; Adyanthaya, S.D.; Sastry, M., **Chem. Commun.**, 1334, (2002).
44. Tan, Y.; Li, Y.; Zhu, D., **Langmuir**, , 18, 3392, (2002).
45. Schaaff, T.G.; Hnight, G.; Shafigullin, M.N.; Borkman, R.F.; Whetten, R.L.; **J. Phys. Chem. B**, , 102, (52), 10643, (1998).
46. Guari, Y.; Thieuleux, C.; Mehdi, A.; Réyé, C.; Corriu, R.J.P.; Gomez-Gallardo, S.; Philippot, K.; Chaudret, B.; Dutartre, R., **Chem. Commun.**, 1374, (2001).
47. Mukherjee, P.; Ahmad, A.; Mandal, D.; Senapati, S.; Sainkar, S.R.; Khan, M.I.; Ramani, R.; Parischa, R.; Ajayakumar, P.V.; Alam, M.; Sastry, M.; Kumar, R. **Angew. Chem. Int. Ed.**, , 40, 3585, (2001).
48. a) Fort Y., **Tetrahedron Lett.**, 1995, 36, 6051. b) Massicot, F.; Schneider, R.; Fort Y.; **J. Chem. Res.**, 664, (1999).
49. Corbierre, M.K.; Cameron, N.S.; Utton, M.; Mochrie, S.G.; Lurio, L.B.; Rühm, A.; Lennox, R.B., **J. Am. Chem. Soc.**, , 123, 10411, (2001).
50. Brust, M. Fink, J.; Bethell, D.; Schiffrin, D.J.; Kiely, C.; **J. Chem. Soc., Chem Commun.**, 1655, (1995).
51. Bain C.D., Troughton E.B., Tao Y., Whitesides G.M. and Nuzzo R. G., **J. Am. Chem. Soc.**, , 111, 321-335, (1989).
52. Hostetler, M.J.; Wingate, J.E.; Zhong, C.J.; Harris, J.E.; Vachet, R.W.; Clark, M.R.; Londono, J.D.; Green, S.J.; Stokes, J.J.; Wingnall, G.D.; Glish, G.L.; Porter, M.D.; Evans, N.D.; Murray, R.W., **Langmuir**, 14, 17, (1998).
53. Chen, S.; Murray, R.W., **Langmuir**, 14, 682, (1999).

54. Petre, I.; Agneta C.; Bruce,G.; Chechik,V.; **J. Am. Chem. Soc.**, 124, 9048-9049, (2002).
55. Shelley, E.J.; Yan, D.; Johnson, S.R.; Couillard, M.; Fitzmaurice, D. ; Nellist, P.D. ; Chen,Y. ;Palma, R.E. ; Preece, J.A. **Langmuir**, 18, 1791, (2002).
56. Chen, S.; Templeton, A.C.; Murray, R.W., **Langmuir**, 16, 3543, (2000).
57. Andrew, B.; Brent, S.S.; Michael, S.D.; Charles, L. Mc.; **J. Am Chem. Soc.**, 124, 11562-11563, (2002).
58. Hostetler, M.J.; Stokes,J.J.; Murray, R.W., **Langmuir**, 12, 3604, (1996).
59. Boal, A.K.; Rotello, V.; **Langmuir**, 2000, 16, 9527
60. Johnson, S.R.; Evans, S.D.; Brydson, R.; **Langmuir**, 14,6639-6647, (1998).
61. Frankamp, B.L.; Boal, A.K.; Rotello, V.M.; **J. Am. Chem. Soc.**, 124, 15146-15147, (2002).
62. Jin, R.; Huosheng W.; Zhi, L.; Chad, A.M.; George, C.S.; **J. Am. Chem. Soc.**, 125, 1643-1654, (2003).
63. Jian, L.. Julio, A.; Winston, O.; Esteban, R.; Angel, E.K.; **J. Am. Chem. Soc.**, 123, 11148-11154, (2001).
64. Yonezawa T., Kunitake T., **Colloids and surfaces, A; Physiochemical and Engineering Aspects**, 149193-199, (1999)
65. Frens, G.; **Nature Physical Science**, 241, 20-22, (1973).
66. Slot J. W., **Eur. J. of cell biology**, Vol. 90 pp 533-536, (1981).
67. Slot J.W., Geuze H. J., **Eur. J. of cell biology**, Vol. 38 pp 87-93(1985).
68. Grabar K. C.; Freeman, R. G.; Hommer, M.B.; Natan M. J, **Anal. Chem.**, 67, 735-743, (1995).
69. Enüstün, B.V. ; Turkevich, J., **J. Am. Chem. Soc.**, 85 (21), 3317, (1963).
70. Chandrasekharan N., Kamat P. V., Hu J. and Jones G., **J. Phys. Chem. B** , 104, 11103. (2000).
72. Qin L., Callahan J. H., and Collins G.E., **Chem. Commum**, (2000).
74. Dubois L. H. and. Nuzzo R. G, **Annu. Rev. Phys. Chem.**, 43,437-463. (1992).

75. M. M. Alvarez, J. T. Khoury, T. G. Schaaff, M. N. Shafigullin, I. Vezmar and R. L. Whetten, **J. Phys. Chem. B**, 101, 3706. (1997).
80. Chen S., Ingram R. S., Hostetler M. J., Pietron J. J., Murray R. W., Schaaff T. G., Khoury J. T., Alvarez M. M. and Whetten R. L., **Science**, 280, 2098. (1998).
81. Elghanian R., Storhoff J. J., Mucic R. C., Letsinger R. L. and Mirkin C. A., **Science**, 277, 1078. (1997).
82. Kneipp K., Wang Y., Kneipp H., Perelman L. T., Itzkan I., Dasari R. R. and Feld M. S., **Phys. Rev. Lett.**, 78, 1667. (1997).
83. Nie S. and Emory S., **Science**, 275, 1102. (1997).
84. Alivisatos A. P., Johnsson K. P., Peng X., Wilson T. E., Loweth C. J., Bruchez M. P. and Schultz, P.G., **Nature**, , 382, 610. (1996).
85. Templeton A. C., Cliffler D. E. and Murray R. W., **J. Am. Chem. Soc.**, , 121, 7081. (1999).
86. Makarova O. V., Ostafin A. E., Miyoshi H., Norris J. R. and Meisel D., **J. Phys. Chem. B**, , 103, 9080. (1999).
87. Hostetler M. J., Templeton A. C. and Murray R. W., **Langmuir**, , 15, 3782. (1999).
88. Bain C. D. and Whitesides G. M., **J. Am. Chem. Soc.**, 110, 3665. (1988).
89. Bain C. D. and Whitesides G. M., **Science**, 240, 62. (1988).
90. Dubois L. H. and Nuzzo R. G., **Annu. Rev. Phys. Chem.**, 43, 437-463. (1992).
91. Alvarez M. M., Khoury J. T., Schaaff T. G., Shafigullin M. N., Vezmar I. and Whetten R. L., **J. Phys. Chem. B**, , 101, 3706. (1997).
92. Johnson S. R., Evans S. D. and Brydson R., **Langmuir**, , 14, 6639. (1998).
93. Kerker M. J., **J. Colloid Interface Sci.**, , 105, 297. (1985).
94. Schroedter A. and Weller H., **Angew. Chem., Int. Ed.**, , 41, 3218. (2002).
95. Paik, W.K. ; Eu, S. ; Lee, K., Chon, S., Kim, M., **Langmuir**, , 16, 10198, (2000).

Conclusion Générale

Partie A :

La pertinence physiologique de notre étude a été limitée par les restrictions expérimentales. Cependant, elle a fourni le fond et l'information nécessaires pour des études futures en montrant que les membranes de HEMA-DMAEMA-GOD sont sensibles aux concentrations en glucose dans la gamme physiologique. Une sonde de glucose in vivo basée sur ce type de membranes peut être envisagée. La glucose-oxydase immobilisée ou encapsulée dans une membrane de PHEMA, la réaction du glucose, contenu dans le sang avec l'enzyme en présence de l'oxygène, produit l'acide gluconique et le peroxyde d'hydrogène. Le pH du micro-environnement de la membrane de polymère diminuera. Cet effet aura comme conséquence le gonflement du gel par la répulsion électrostatique menant à la perméabilité accrue de la membrane à l'insuline. L'utilisation de ces membranes dans le contrôle de libération d'insuline en réponse aux concentrations en glucose reste un objectif à atteindre.

Perspectives

Cet objectif peut être réalisable en utilisant un système expérimental amélioré imitant les conditions véritablement physiologiques. Ainsi, si ce type de membrane de HEMA-DMAEMA-GOD sépare deux compartiments, le premier contient une solution physiologique à pH 7,4. C'est le compartiment récepteur. Le deuxième une solution d'insuline, compartiment donneur. Alors, en faisant varier la concentration du glucose, nous pouvons réaliser une étude précise de diffusion de l'insuline en fonction du taux de glucose. L'insuline sera détectée par la mesure de l'absorbance à 276 nm par un spectrophotomètre et de la radioactivité de l'insuline marquée à l'iode 125, un compteur à scintillations liquides avec des équipements de radioprotection seront nécessaires, et les manipulations doivent se faire dans des laboratoires adéquats.

Partie B :

Depuis un certain nombre d'années la notion de vectorisation est développée. L'idée est d'associer la molécule biologiquement active à une espèce de transporteur extrêmement petit ayant des caractéristiques de taille, de biocompatibilité, de charge, et de stabilité.

Afin d'élaborer ce type de transporteur que sont les nanoparticules d'or dans notre cas, nous avons étudié deux méthodes de synthèse ;

La première utilisant le borohydrure de sodium NaBH_4 , cette méthode présente plusieurs inconvénients. La synthèse est effectuée dans un solvant organique et la purification du produit n'est pas possible sans agglomération. La caractérisation n'est pas évidente. Pour ces raisons, et après plusieurs tentatives expérimentales, cette méthode a été abandonnée.

La deuxième méthode de synthèse utilisant le citrate de sodium conduit à des nanoparticules biocompatibles, stables, et solubles dans l'eau mais de taille relativement importante (15 nm). L'utilisation de l'acide tannique a permis de réduire considérablement la taille à (7-8 nm). La couverture de la surface des nanoparticules à hauteur de 40 % des sites surfaciques accessibles par le greffage de l'acide thiomaléique, le mercaptoéthanesulfonate, et le colorant couplé à l'aminotiophénol respectivement dans les proportions 10%, 10%, et 20% a permis d'obtenir des solutions colloïdales de nanoparticules d'or de faible diamètre stables pendant plusieurs mois. L'étude en luminescence a été aussi bien efficace pour la quantification du nombre d'agents fluorescents (colorants) fixés que pour la caractérisation du greffage des agents réactifs sur la nanoparticule.

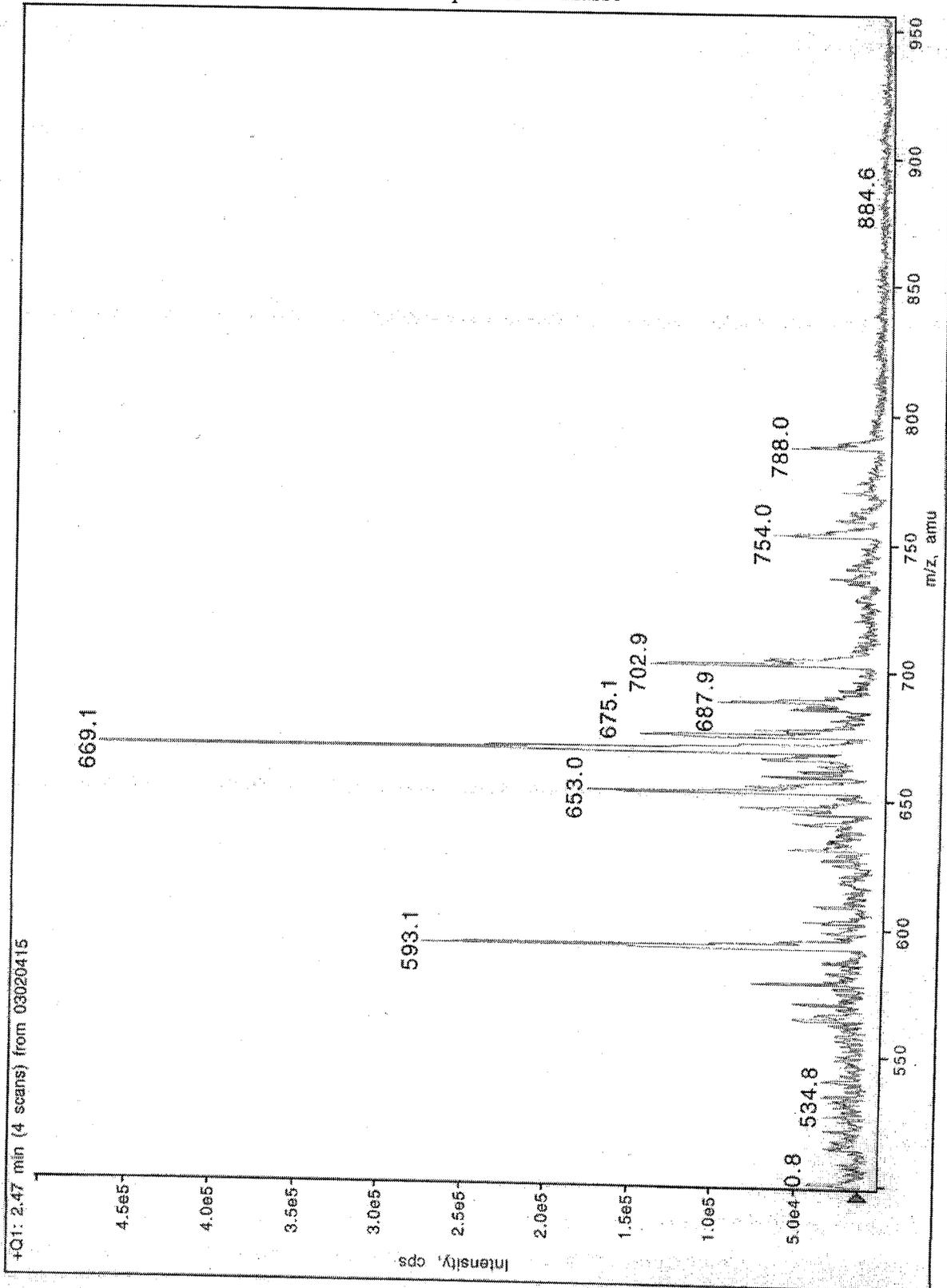
Perspectives

D'autres analyses complémentaires sont à effectuer. L'utilisation de nouvelles techniques d'analyse comme le Ramon exalté de Surface ainsi que les techniques de purification pourraient permettre de mieux caractériser ces nanoparticules. La détection et la destruction des cellules cancéreuses n'est pas la seule application. Enfin le développement des nanoparticules hybrides pour la réalisation de matériaux dendrimères mixtes ou polymères composites peut permettre des applications plus physiques, notamment en optique non linéaire.

Annexes

Annexe I : Spectres de masse

Acq. Time: Mar 04 Feb 2003 at 17:20:52; Exp. Comment: profil PPG en mode full scan/ infusion

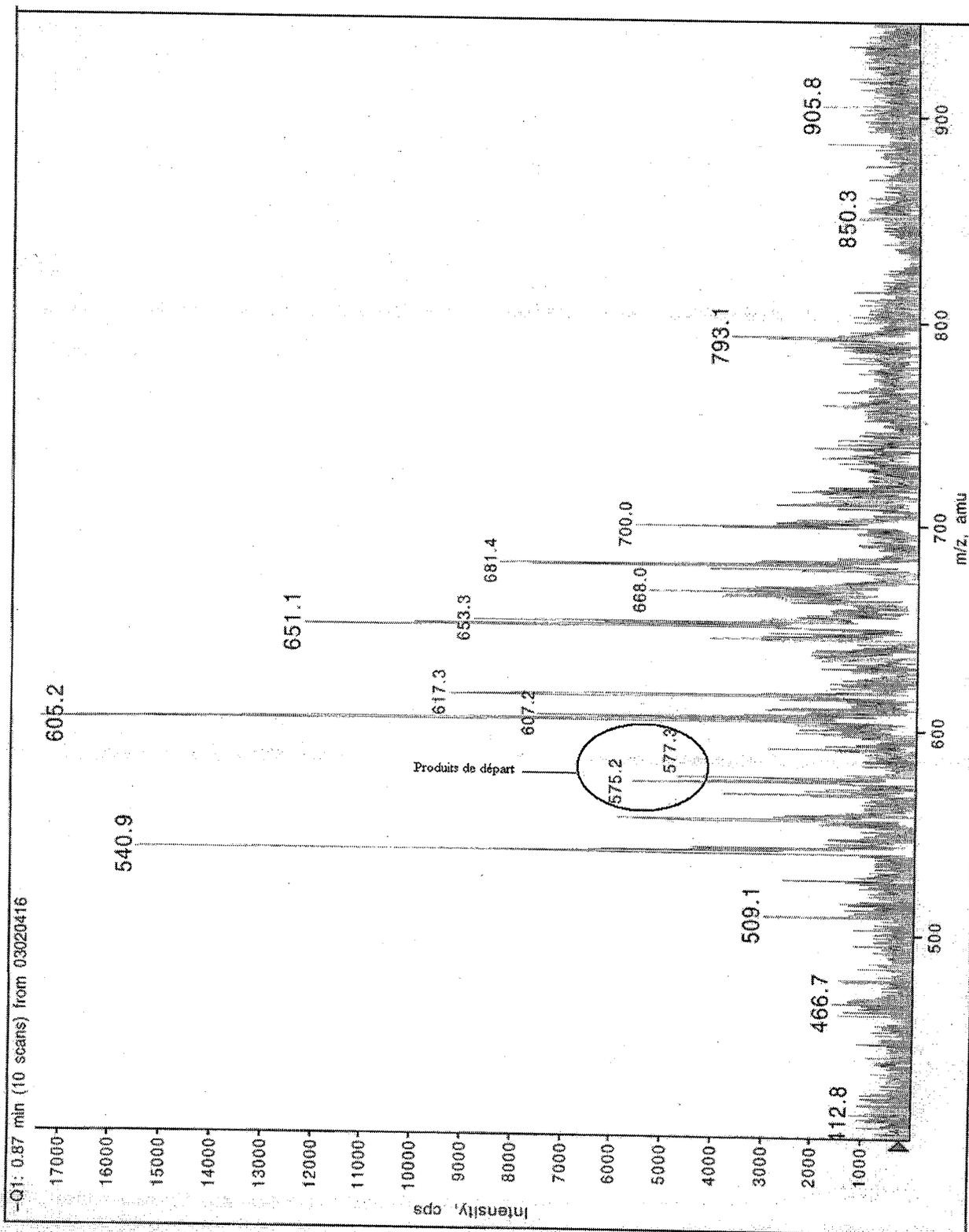


BioMultiView 1.3.1

03020415 (RODATIOLAM)

Period 1, Expt. Mass range 300.0 to 1000.0 by 0.1 amu ; Dwell : 1.0 ms ; Pause : 2.0 ms

Acq Time : Mar 04 Fév 2003 at 17 :20 :52 ; Exp. Comment : profil PPG en mode full scan/infusion

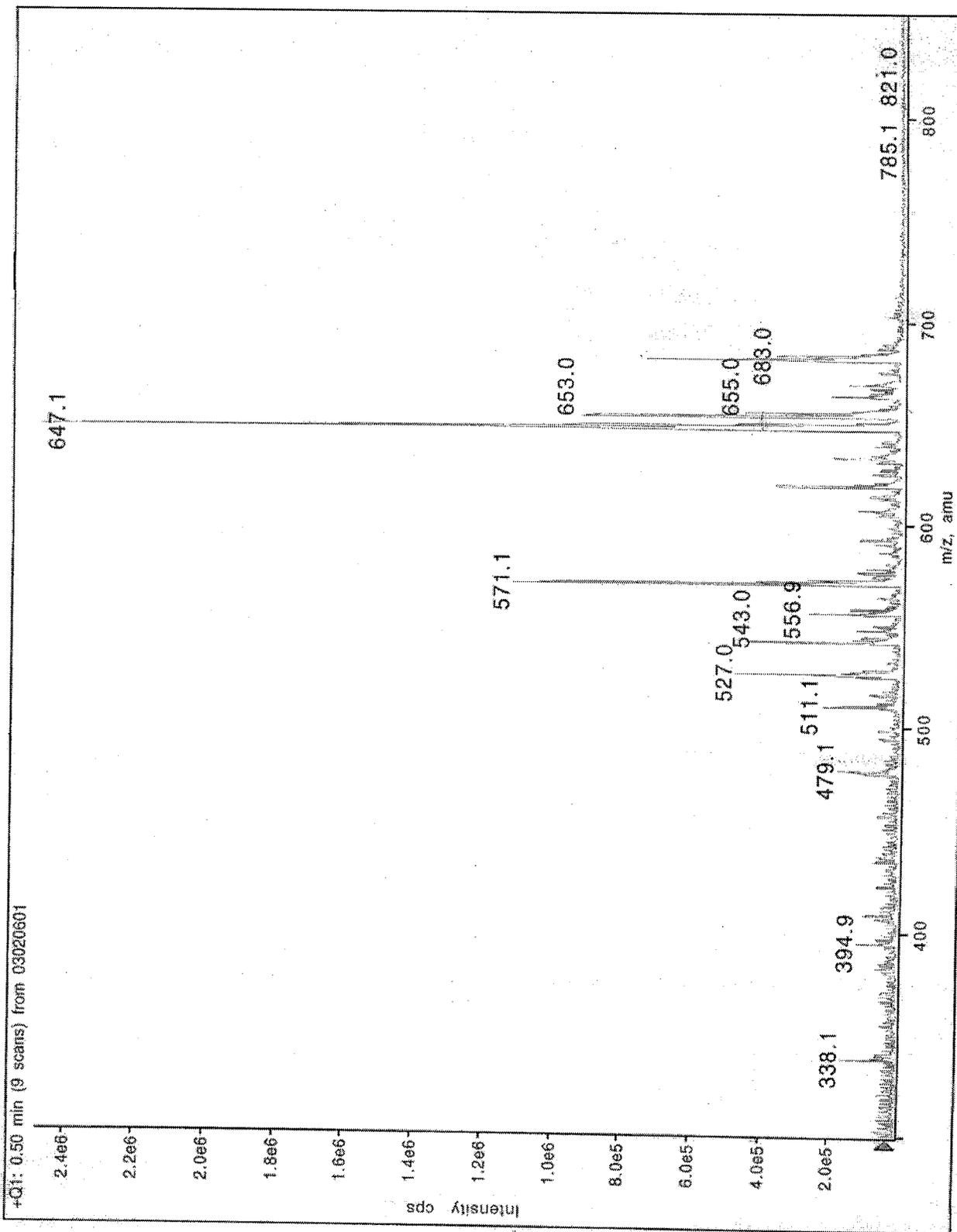


BioMultiView 1.3.1

03020416 (RODATIOLAM)

Period 1, Expt.Mass range 200.0 to 1000.0 by 0.1 amu ; Dwell : 1.0 ms ; Pause : 2.0 ms

Acq Time : Mar 04 Fév 2003 at 17 :49 :03 ; Exp. Comment : profil PPG en mode full scan/infusion



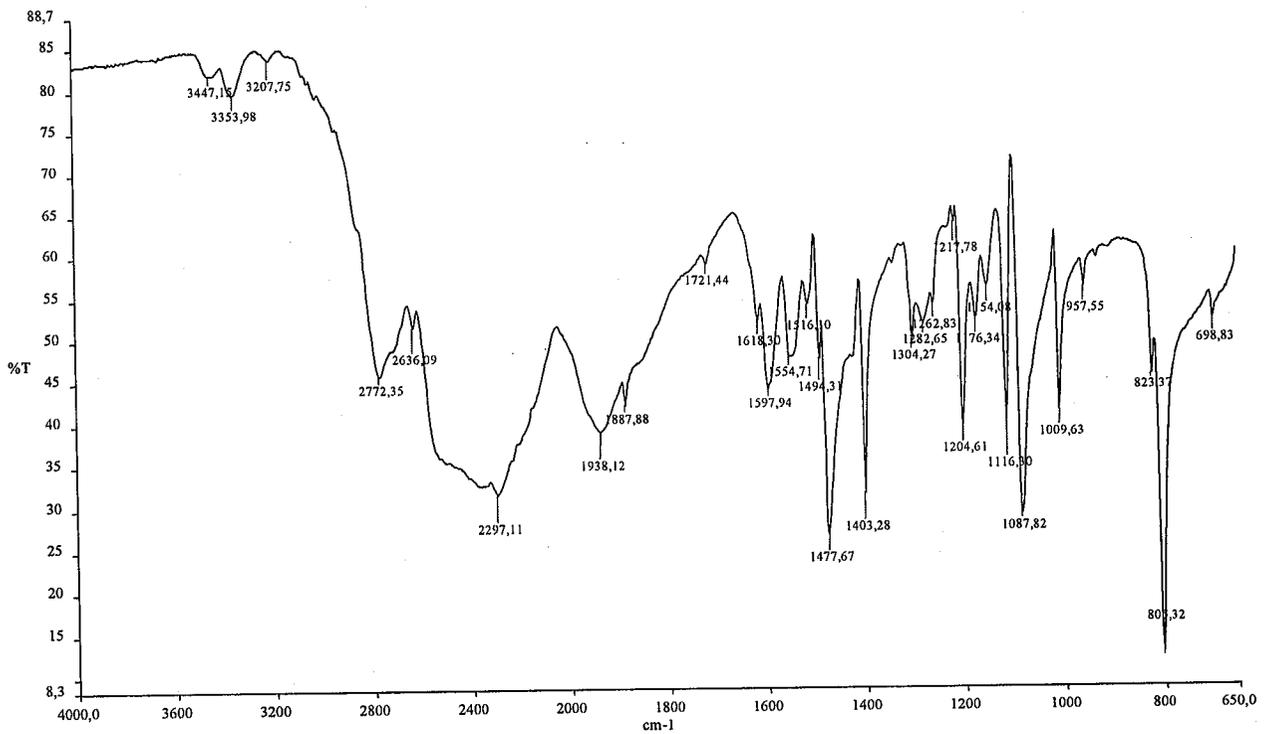
BioMultiView 1.3.1

03020601 (RODATIOLAM)

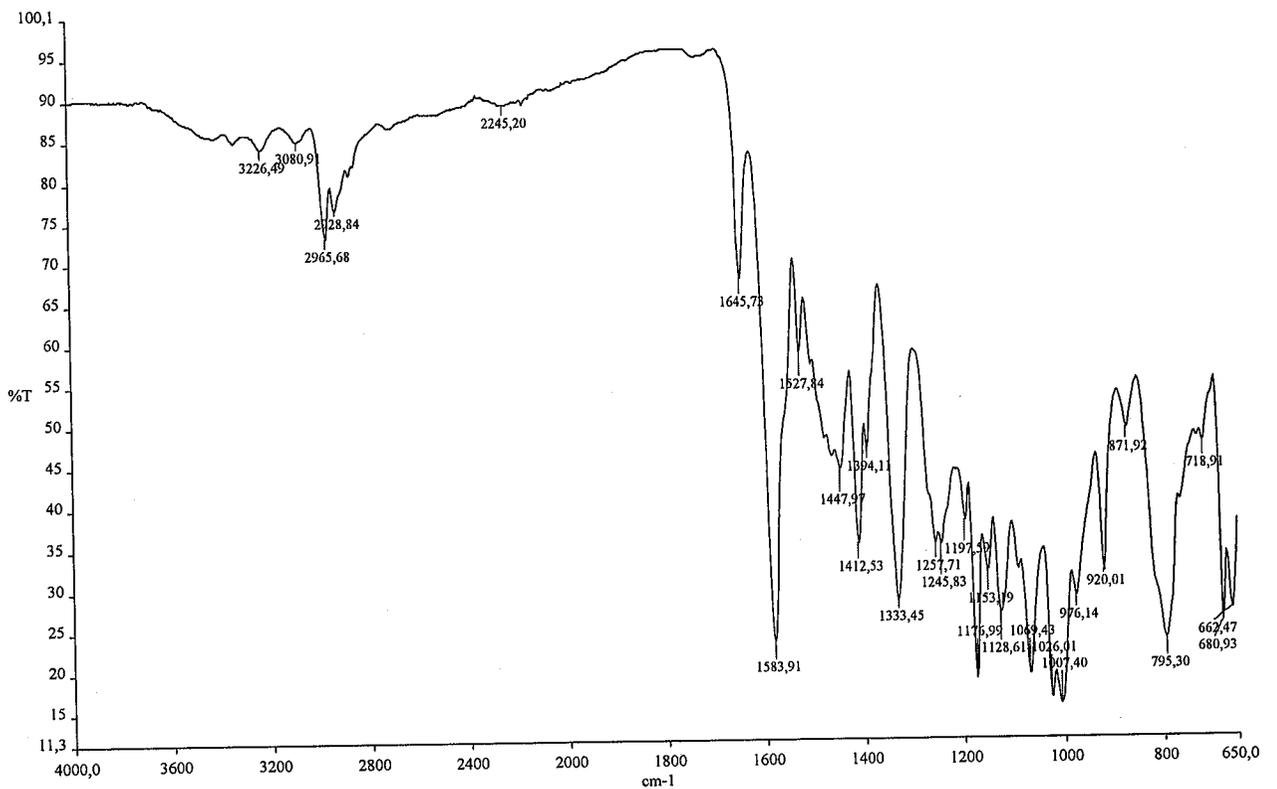
Period 1, Expt. Mass range 300.0 to 900.0 by 0.1 amu ; Dwell : 1.0 ms ; Pause : 2.0 ms

Acq Time : Jeu 06 Fév 2003 at 9 :16 :15 ; Exp. Comment : profil PPG en mode full scan/infusion

Annexe II : Spectres IR

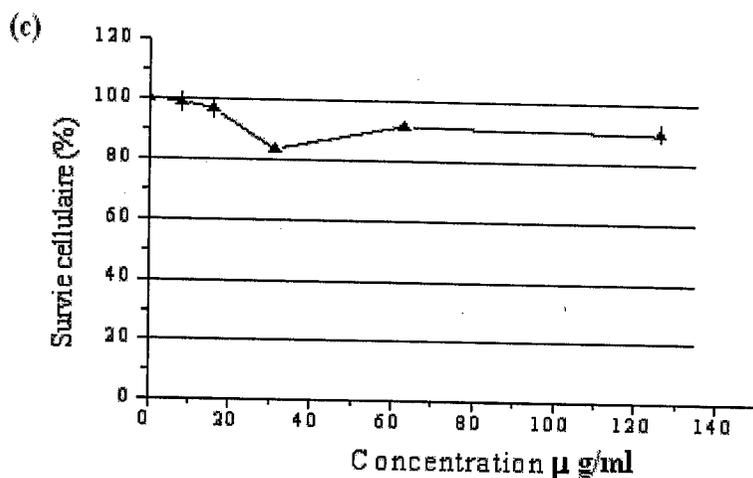
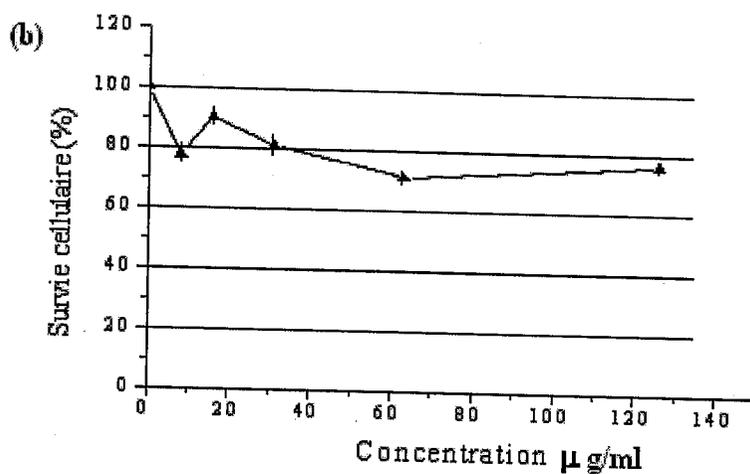
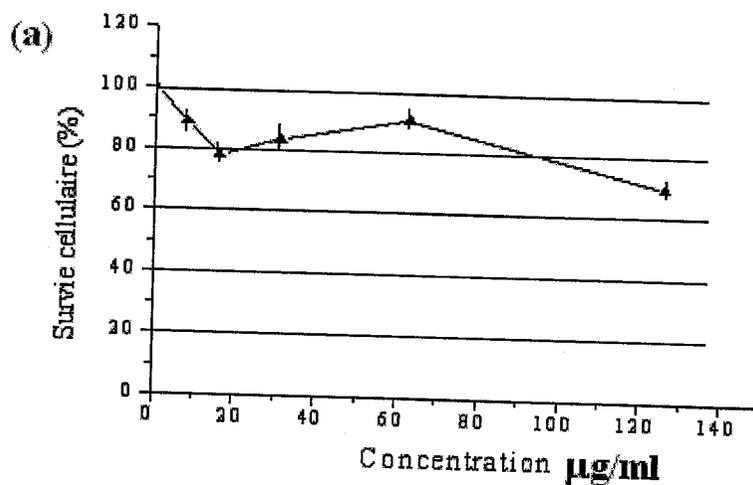


Spectre IR de l'aminethiophenol



Spectre IR Aminethiophenol couplée avec la Lissamine Rhodamine B

Annexe III : Etude de cytotoxicité



(a) : cytotoxicité de nanoparticules d'or « nues », (b) : cytotoxicité de nanoparticules d'or fonctionnalisées par le thiophénol, (c) : cytotoxicité de nanoparticules d'or fonctionnalisées par la lissamine rhodamine B.