



HAL
open science

Elaboration de nanoparticules magnétiques et bioactives pour le traitement du cancer et la régénération de tissus osseux

Xavier Kesse

► **To cite this version:**

Xavier Kesse. Elaboration de nanoparticules magnétiques et bioactives pour le traitement du cancer et la régénération de tissus osseux. Matériaux. Université Clermont Auvergne [2017-2020], 2019. Français. NNT : 2019CLFAC066 . tel-02497378

HAL Id: tel-02497378

<https://hal.science/tel-02497378>

Submitted on 17 Apr 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITE CLERMONT AUVERGNE

ECOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE
LA SANTE – AGRONOMIE - ENVIRONNEMENT

THESE

Présentée pour obtenir le grade de

DOCTEUR D'UNIVERSITE

Spécialité: Ingénierie de la Santé

Par **XAVIER KESSE**

**Elaboration de nanoparticules magnétiques et
bioactives pour le traitement du cancer et la
régénération de tissus osseux**

Thèse soutenue devant le jury le 17 décembre 2019

Christèle COMBES, CIRIMAT, INP Toulouse	Présidente
Sylvie BEGIN-COLIN, ICPMS, Univ. Strasbourg	Rapporteuse
Thierry GACOIN, LPMC, Ecole polytechnique	Rapporteur
Stéphane DESCAMPS, ICCF, UCA	Examineur
Jean-Marie NEDELEC, ICCF, Sigma Clermont	Directeur de thèse
Charlotte VICHERY, ICCF, Sigma Clermont	Co-directrice de thèse

Remerciements

Ces 3 dernières années se sont avérées passionnantes et enrichissantes tant sur le plan personnel que sur le plan professionnel. Je n'aurais peut-être pas pu arriver au bout de ce projet sans l'aide de nombreuses personnes de près ou de loin à qui j'aimerais témoigner toute ma reconnaissance dans cette partie. Mais avant toute chose, je tiens à rendre toute la gloire à l'éternel Dieu des armées (Oui parce que je suis de confession chrétienne à la base même si j'avoue avoir manqué de constance) pour sa grâce, sa miséricorde et ses bienfaits dans ma vie.

Je remercie Monsieur Jean-marie Nedelec d'avoir accepté de diriger cette thèse. Merci également aux membres du jury notamment Thierry Gacoin, Directeur de recherche CNRS à l'école polytechnique (palaiseau, laboratoire PMC), Sylvie Bégin-Colin, Professeur à l'université de Strasbourg (IPCMS), Christèle Combes, Professeur à l'université de Toulouse et Stéphane Descamps, Chirurgien orthopédiste au CHU Gabriel-Montpied de Clermont-Ferrand d'avoir accepté d'évaluer ce travail.

Je voudrais particulièrement exprimer toute ma gratitude envers Charlotte Vichery, ma co encadrante de thèse. Bien plus qu'une encadrante, tu as été une amie, une confidente qui m'a vu évoluer sur le plan scientifique tout le long de ce projet. Tu as toujours eu les mots justes pour m'encourager et me motiver dans les moments difficiles. Tu débordes de qualités qu'il me serait impossible de toutes les citer. Néanmoins ton écoute, ta disponibilité, ta bonne humeur, ta gentillesse et surtout ta rigueur scientifique sont celles qui m'ont le plus marquées. Merci pour toutes les discussions scientifiques enrichissantes qui m'ont amené à prendre le recul nécessaire vis-à-vis de ce projet. J'ai l'habitude de dire que j'ai été un étudiant très chanceux car tu as été un véritable mentor qui à aucun moment n'a ménagé ses efforts pour me guider et me garder sur le bon chemin. En plus d'être une scientifique remarquable, tu es également une excellente pédagogue et manager, des qualités très rares chez les enseignants-chercheurs d'aujourd'hui. Les barbecues, les jeux de société (le Samouraï), les soirées crêpes (salées et sucrées) vont me manquer mais je reste persuadé qu'il y'en aura d'autres dans un futur proche.

Mention spéciale à Aurélie Jacobs, ma collègue de bureau durant ses deux dernières années. On a partagé beaucoup de choses dans cette période entre autre tes goûters de 16h... Par ailleurs, ton aide pour l'évaluation de la cytotoxicité de mes échantillons a été inestimable et je voudrais sincèrement te remercier d'avoir accepté de les faire malgré ton emploi du temps assez chargé.

Merci également à tous les stagiaires qui m'ont aidé à faire avancer ce projet. Je pense particulièrement à Paul, Tian et Antoine.

Même si on s'est connu sur la fin, j'aimerais remercier Florestan Vergnaud le nouveau doctorant de l'équipe qui aura la lourde tâche de perpétuer le projet. J'ai beaucoup apprécié nos discussions scientifiques et je suis convaincu que tu auras également de superbes résultats à la fin de ta thèse.

Merci à Isabelle Maurin, Chercheur CNRS à PMC pour les mesures magnétiques effectuées sur mes échantillons magnétiques durant ces 3 années. J'ai pu constater que tu es une forcenée du travail, chaleureuse, gentille et bienveillante. Tes conseils sur la synthèse des nanoparticules magnétiques ont été très intéressants et je te suis reconnaissant de t'être rendue disponible lors de ma venue à l'école polytechnique pour la vulgarisation scientifique de mes travaux devant l'équipe PMC.

Dans ce même contexte, j'aimerais remercier Damien Mertz et Alexandre Adam de l'ICPMS pour les mesures d'hyperthermie. Nos échanges lors des réunions téléphoniques ont nettement amélioré ma compréhension de l'hyperthermie magnétique.

J'ai également une pensée particulière pour les membres du CICS notamment Christelle Blavignac, Claire Szczepaniak et Lorraine Gameiro. Vous m'avez pouponné, cajolé, encouragé et soutenu à chaque fois que j'y étais pour des observations MET. Encore merci pour votre bienveillance et votre amitié. Vous allez énormément me manquer.

Je n'oublie pas Alexis avec qui j'ai passé de superbes moments au sein et en dehors du laboratoire MPS. Merci pour ton amitié et désolé de t'avoir posé de nombreux lapins au nota bene !

Il serait inconcevable de ne pas remercier Monsieur Jean-Pierre Marcheix et le personnel administratif de l'ICCF tant leur aide au niveau administratif a été inestimable pendant ces 3 années.

J'ai également eu la chance de faire la connaissance dès mon arrivée d'anciens et de nouveaux doctorants, d'ingénieurs et de MCF qui ont facilité mon intégration au sein de l'ICCF. Je pense notamment à Laura, Émilie, Shyam, Olympe, Margot, Eric, Kévin et Audrey et tous ceux dont j'ai oublié de mentionner le prénom.

Pour finir, j'aimerais témoigner toute ma gratitude à ma famille, mes amis et à ma fiancée pour tous les encouragements que j'ai reçus depuis mon arrivée en France jusqu'à l'obtention de ce diplôme tant attendu.

À ma mère

Table des matières

Introduction générale	11
Chapitre 1 : Introduction	13
1. Matériaux pour la régénération osseuse	14
1.2. Greffe des tissus osseux	14
1.2.1. L'autogreffe	14
1.2.2. L'allogreffe	14
1.3. Biomatériaux synthétiques	15
1.3.1. Les métaux et les alliages métalliques	15
1.3.2. Les biocéramiques	16
1.3.3. Les polymères	17
1.3.4. Les composites et les hybrides	18
2. Les verres bioactifs	19
2.1. Structure	19
2.2. Méthodes d'élaboration	20
2.3. Mécanisme de bioactivité	22
2.4. Pourquoi des nanoparticules ?	23
3. Méthodes pour traiter le cancer	24
3.1. Méthodes usuelles	24
3.2. Hyperthermie	25
3.3. Hyperthermie magnétique	26
4. Introduction au magnétisme	27
4.1. Comportement magnétique des matériaux	27
4.2. Notion d'anisotropie	28
4.3. Des particules multi aux particules monodomains	29
5. Dissipation de chaleur par hyperthermie magnétique	31
5.1. Mécanisme de dissipation de chaleur	31
5.2. Paramètres impactant le SAR	32
5.2.1. Amplitude et fréquence	33
5.2.2. Viscosité du milieu	33
5.2.3. Taille des nanoparticules	34
5.2.4. Anisotropie	35
5.2.5. Concentration	35
6. Choix de la source magnétique	36
6.1. Structure de la maghémite	36
7. Objectifs de la thèse	38
8. Références	39

Chapitre 2 : Paramètres de synthèse impactant les propriétés texturales, la composition et l'état d'agglomération de nanoparticules de verre bioactif binaire (SiO₂-CaO) 49

1.	Introduction	50
2.	Synthèse de nanoparticules de verre bioactif par voie sol-gel.....	51
2.1.	La méthode sol-gel.....	51
2.2.	Choix du précurseur de calcium	53
2.3.	Choix de la stratégie de synthèse	53
2.4.	Protocole de synthèse	56
3.	Variation des paramètres de synthèse.....	56
3.1.	Variation de la concentration d'ammoniaque.....	56
3.1.1.	Caractérisation morphologique des particules	56
3.1.2.	Détermination de la surface spécifique et état d'agglomération des particules.....	59
3.1.3.	Caractérisation structurale des particules	61
3.2.	Variation du moment d'ajout du précurseur de calcium	62
3.2.1.	Caractérisation morphologique et état d'agglomération des particules ..	62
3.2.2.	Caractérisation structurale des particules	65
3.2.3.	Détermination de la composition des particules.....	65
3.3.	Variation du ratio Ca/Si initial	68
3.3.1.	Caractérisation morphologique et état d'agglomération des particules ..	69
3.3.2.	Caractérisation structurale des particules	69
3.3.3.	Détermination de la composition des particules.....	70
4.	Conclusion.....	71
5.	Références.....	72

Chapitre 3 : 77

Effet de la quantité de calcium insérée sur la bioactivité de nanoparticules de verre bioactif..... 77

1.	Introduction	78
2.	Protocole de synthèse	79
3.	Caractérisations.....	80
3.1.	Caractérisation morphologique et état d'agglomération des particules	80
3.2.	Détermination de la surface spécifique des particules	81
3.3.	Composition des particules	81
3.4.	Structure des particules	82
4.	Évaluation de la bioactivité des échantillons.....	85
5.	Cytotoxicité des particules.....	89
6.	Conclusion.....	92
7.	Références.....	92

Chapitre 4 : Élaboration de nanoparticules magnétiques et bioactives (γ-Fe₂O₃@SiO₂-CaO)	95
1. Introduction	96
2. Synthèse de nanoparticules multifonctionnelles	97
2.1. Synthèse et caractérisation des nanoparticules de maghémite	97
2.1.1. Protocole de synthèse.....	98
2.1.1.1. Formation de la magnétite.....	98
2.1.1.2. Oxydation de la magnétite en maghémite	98
2.1.1.3. Peptisation et réduction de la dispersion en taille	99
2.1.2. Caractérisations structurale et morphologique des nanoparticules élaborées.....	99
2.1.2.1. Caractérisation structurale.....	99
2.1.2.2. Caractérisation morphologique et état d'agglomération.....	102
2.2. Formation de la coquille bioactive	103
2.2.1. Protocole de synthèse.....	103
2.2.1.1. Fonctionnalisation de la surface des nanoparticules de maghémite et peptisation.....	103
2.2.1.2. Formation de la coquille de silice	104
2.2.1.3. Insertion du calcium dans la coquille de silice.....	105
2.2.2. Caractérisations morphologique et structurale et composition des particules élaborées.....	105
2.2.2.1. Caractérisation morphologique et état d'agglomération	105
2.2.2.2. Caractérisation structurale et composition	108
3. Étude des propriétés magnétiques et d'hyperthermie	109
3.1. Propriétés magnétiques	109
3.1.1. Courbes d'aimantation $M(H)$ à 10 K et à 300 K	109
3.1.2. Mesures ZFC-FC.....	110
3.2. Propriétés d'hyperthermie	112
4. Évaluation de la bioactivité des hétérostructures.....	117
5. Conclusion.....	121
6. Références	121
Conclusions	127
Perspectives	129
Annexe 1	131
1.1. Variation de la concentration d'ammoniaque.....	131
1.2. Variation du moment d'ajout du sel de calcium	131
1.3. Variation du ratio Ca/Si initial.....	132
Annexe 2	133

2.1. Procédure d'isolement et de culture des cellules souches mésenchymateuses (CSM).....	133
2.2. Test de cytotoxicité.....	134
Annexe 3	135
3.1. Synthèse de nanoparticules de maghémite	135
3.2. Fonctionnalisation de la surface des nanoparticules de maghémite et peptisation	136
3.3. Croissance d'une coquille bioactive	136

Introduction générale

L'Organisation mondiale de la santé estime à plus de 75% l'augmentation mondiale du nombre de cancers détectés dans les deux prochaines décennies. La plupart des patients atteints par cette pathologie présentent une forte probabilité de développement de métastases osseuses, lésions cancéreuses se propageant par migration de cellules tumorales primaires. Ces métastases induisent un déséquilibre du processus de remodelage osseux, mécanisme biologique permanent de renouvellement et de réparation des tissus impliquant à la fois l'ostéolyse (résorption de l'os due à l'action des ostéoclastes) et l'ostéogenèse (formation d'une nouvelle matrice osseuse par les ostéoblastes). Ainsi, les patients développent de sérieuses complications squelettiques qui affectent très fortement leur mode de vie (augmentation du risque de fracture associée à de fortes douleurs).

Un traitement couramment utilisé en milieu clinique est la résection totale de la masse tumorale par intervention chirurgicale suivie d'un comblement osseux du défaut généré. La chimiothérapie et la radiothérapie, nécessaires pour s'assurer de la destruction totale des cellules cancéreuses, sont des traitements lourds avec de nombreux effets secondaires. De nouvelles thérapies sont donc en développement comme l'hyperthermie magnétique. Cette méthode est basée sur la réduction de la viabilité des cellules tumorales grâce à la chaleur produite par une source magnétique lorsque celle-ci est soumise à un champ magnétique alternatif. L'utilisation de nanoparticules d'oxyde de fer (magnétite et maghémite) comme nanosources thermiques est très intéressante, car elles présentent d'excellentes propriétés magnétiques. De plus, leur biodégradabilité et non-cytotoxicité sont prouvées étant donné qu'elles sont déjà utilisées en tant qu'agent de contraste T₂ pour l'imagerie médicale.

Dans le cadre de la thèse, nous avons cherché à coupler la capacité de destruction de cellules cancéreuses par hyperthermie magnétique à la régénération du tissu osseux.

La bioactivité, c'est-à-dire la propriété spéciale que possèdent certains matériaux à établir un lien intime et solide avec les tissus hôtes, mise en évidence pour certaines compositions de verres par le Professeur Larry Hench et ses collaborateurs, a propulsé le développement des biomatériaux pour la réparation osseuse dans une nouvelle ère. En effet, certains verres du système SiO₂-CaO-Na₂O-P₂O₅ ont la capacité de se dissoudre et d'induire la croissance d'hydroxyapatite (HAp) à leur surface, matériau similaire à la partie inorganique de l'os.

On trouve dans la littérature des tentatives de synthèse d'un tel matériau multifonctionnel par fusion à haute température (supérieur à 1000°C). Cependant, il a été reporté que l'ajout de seulement 3% de γ -Fe₂O₃ en masse dans le verre inhibe la bioactivité du matériau final. Par ailleurs, la probabilité de former des phases magnétiques indésirables (réduisant la capacité de chauffe du matériau) est très élevée. Le procédé sol-gel, méthode alternative à la synthèse de verres bioactifs développée dans les années 90, apparaît donc comme une méthode de choix, car il facilite le contrôle fin des propriétés texturales, chimiques, surfaciques et morphologiques des matériaux élaborés.

La forte réactivité de surface des nanoparticules d'oxyde de fer et la grande versatilité du procédé sol-gel ont mené au choix de synthétiser des hétérostructures multifonctionnelles, avec un cœur magnétique et une coquille de verre bioactif. L'intérêt principal de tels nano-objets réside dans leur très grande surface spécifique, promettant une forte bioactivité. Obtenir des particules bioactives de taille nanométrique étant non trivial, il est important de maîtriser et d'étudier l'impact des paramètres expérimentaux influençant leur bioactivité.

Ainsi, 4 chapitres constituent ce manuscrit :

Le chapitre 1 traite de généralités sur l'hyperthermie magnétique et les matériaux de substitution osseuse où une attention particulière est portée sur les verres bioactifs. On y justifie également notre choix de matériaux pour l'apport des propriétés recherchées.

Le chapitre 2, purement dédié à la synthèse, met en évidence l'impact des principaux paramètres expérimentaux sur la composition, la taille, la morphologie et l'état d'agglomération de nanoparticules de verre bioactif élaborées par le procédé sol-gel.

Le chapitre 3 présente l'influence de la quantité de calcium sur la bioactivité de nanoparticules de verre bioactif binaire, tant un flou existe dans la littérature à ce propos. Les résultats des tests de cytotoxicité sont également détaillés en vue de montrer le caractère biocompatible des échantillons synthétisés.

Le chapitre 4 s'attache à décrire la formulation d'hétérostructures magnétique et bioactive par le procédé sol-gel. Il présente également une analyse de leurs propriétés magnétiques, d'hyperthermie et de bioactivité.

Chapitre 1 : **Introduction**

1. Matériaux pour la régénération osseuse

Les complications squelettiques (fractures jointives, non jointives ou pertes de masse osseuse importantes) liées à des pathologies (ostéoporose, malformation osseuse), trauma ou résection de tumeurs cancéreuses rendent l'auto-réparation des tissus osseux incomplète, voire même inhibée¹ ou impossible, dégradant ainsi la qualité de vie du patient. Il apparaît alors un besoin de comblement de ces pertes de substance osseuse. Les solutions qui s'offrent au chirurgien sont alors soit la greffe soit l'utilisation de biomatériaux synthétiques.

1.2. Greffe des tissus osseux

La greffe osseuse est la deuxième procédure de transplantation la plus fréquente après la transfusion sanguine avec près de 2.2 millions de greffes effectuées dans le monde chaque année. En orthopédie, l'os lui-même est le meilleur matériau car il présente 2 des propriétés essentielles à la réparation osseuse que sont l'ostéoinduction et l'ostéoconduction. L'ostéoinduction est l'accélération de la minéralisation osseuse par stimulation ou activation de la différenciation des cellules souches en ostéoblastes (cellules formant la matrice osseuse) tandis que l'ostéoconduction est relative à la réception de la repousse osseuse par une interface biocompatible.² Les deux procédures de greffes les plus utilisées en milieu clinique sont l'autogreffe et l'allogreffe.

1.2.1. L'autogreffe

La greffe autologue ou autogreffe est la procédure chirurgicale par excellence de transplantation osseuse au cours de laquelle le greffon et le site d'implantation sont issus du même individu.^{2,3} La crête iliaque (bord supérieur du bassin) est le site privilégié de prélèvement, car étant facilement accessible et de bonne qualité. Néanmoins, de nombreux inconvénients sont liés à cette procédure clinique tels que : une morbidité du site donneur (douleurs chroniques, risque d'infection, complication...) et un volume limité d'os disponible.^{2,4}

1.2.2. L'allogreffe

La greffe allogène ou allogreffe est une alternative à l'autogreffe. Elle fait référence à un transfert du greffon entre deux individus d'une même espèce, mais génétiquement différents.⁵ Elle peut cependant présenter un risque de transmission virale du donneur vers le receveur et reste limitée en terme de volume disponible (seulement 98 prélèvements d'os massif effectués sur donneurs décédés en France en 2016).^{5,6} Ainsi, les greffons allogéniques (Figure 1.1) utilisés en milieu clinique sont généralement fournis par des

banques de tissus spécialisées dans le traitement et le conditionnement de ces matériaux sous forme lyophilisée ou cryo conservée.

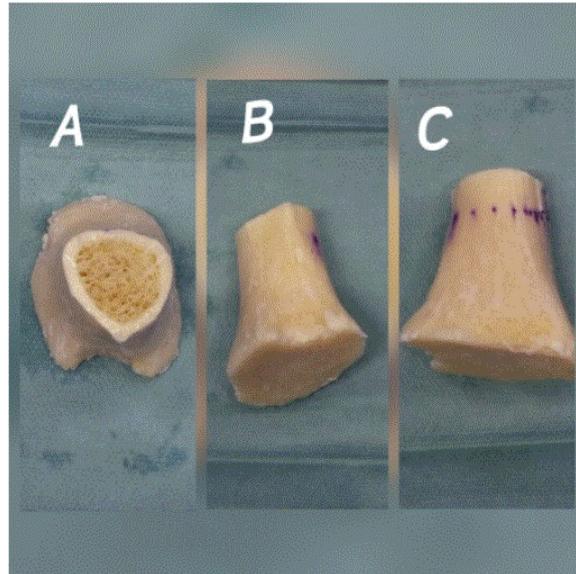


Figure 1.1 : Greffon allogénique de tibia sous différentes vues: A) supérieure, B) latérale, C) antérieure.⁷

1.3. Biomatériaux synthétiques

Lors de la deuxième conférence du consensus de Chester en 1986 organisée par la Société Européenne des Biomateriaux, il a été approuvé que les biomatériaux soient définis comme des matériaux non vivants conçus pour interagir avec les systèmes biologiques. Leur nature dépend fortement de l'usage auquel ils sont destinés. En orthopédie, les biomatériaux synthétiques ont été progressivement améliorés suite à l'étude des différentes réponses biologiques induites à l'interface implant-milieu vivant et à l'amélioration de leurs propriétés physico-chimiques. Ainsi, on distingue 5 classes de biomatériaux synthétiques : *les métaux ou les alliages métalliques, les biocéramiques, les polymères, les composites et les matériaux hybrides.*

1.3.1. Les métaux et les alliages métalliques

Les biomatériaux métalliques constituent la première génération d'implants à usage orthopédique. En effet, ils servent à fixer les fractures et à stabiliser la structure osseuse du corps humain (prothèse articulaire partielle ou totale pour la cheville, la hanche, les genoux, l'épaule...) grâce à leurs excellentes propriétés mécaniques et leur haute résistance à la corrosion en milieu biologique.⁸ Dans ce cadre, ils sont à base d'acier inoxydable, de titane ou d'alliage de titane, de cobalt et de tantale (voir figure 2).^{9,10} Cependant leur inactivité chimique induit la formation d'une capsule fibreuse non adhérente

autour de l'implant métallique augmentant le risque de défaillance à long terme.¹¹ Aussi, ils sont non biofonctionnels c'est-à-dire qu'ils ne possèdent aucune fonction biologique à l'interface matériau-tissu vivant permettant de lutter contre des pathologies qui surviennent lors de la transplantation, comme une propriété antibactérienne qui permettrait de prévenir une infection lors de l'opération chirurgicale.

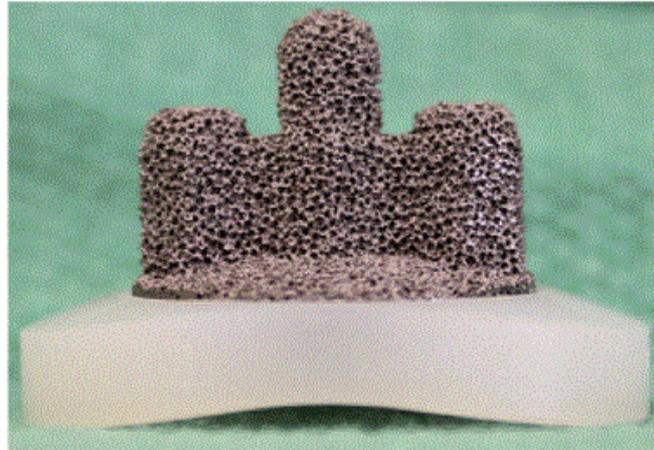


Figure 1.2 : Implant poreux à base de tantale utilisé pour une arthroplastie totale de l'épaule.⁹

1.3.2. Les biocéramiques

Les biocéramiques sont des matériaux inorganiques constitués d'éléments métalliques et non métalliques dont la structure comporte une combinaison de liaisons covalentes et/ou ioniques. On distingue 2 générations de biocéramiques.¹² Les biocéramiques de première génération dites « biocéramiques inertes » majoritairement l'alumine (Al_2O_3) et la zircone (ZrO_2) qui sont utilisées dans les têtes de prothèse de hanche ou de genoux ainsi que dans les implants dentaires, car elles présentent une haute résistance à l'usure et à la corrosion.¹³⁻¹⁵ Comme pour les biomatériaux métalliques, la réponse biologique induite est la formation d'un tissu fibreux non adhérent autour de l'implant dont l'effet peut être négligeable selon la zone d'action du matériau. La deuxième génération de biocéramiques comporte les céramiques biodégradables et bioactives dont la réponse biologique dépend de l'interaction entre leur surface et les tissus environnants.¹² Les céramiques biodégradables composées essentiellement de phosphates tricalciques (α -TCP, β -TCP) et de sulfate de calcium (CaSO_4), créent un environnement favorable à la réparation osseuse en fournissant au milieu *via* leur résorption, les ions nécessaires à la propagation des tissus osseux néoformés.^{16,17} Néanmoins, l'adaptation de la vitesse de résorption du matériau à celle de la réparation tissulaire demeure l'un des principaux challenges.¹⁸ Les céramiques bioactives sont composées majoritairement d'hydroxyapatite synthétique (HAp), de vitro-céramiques (apatite/

wollastonite) et de verres bioactifs.^{12,19-21} Dans le cas des verres bioactifs, en milieu biologique, il y a formation d'une couche d'apatite biologique active en surface *via* laquelle une liaison chimique et mécanique s'établit entre l'implant et les tissus osseux environnants.^{22,23} Les verres bioactifs constituant les céramiques abordées dans cette thèse, ils seront décrits plus en détail dans le paragraphe suivant. Malgré leur excellentes bioactivité et biocompatibilité, les céramiques bioactives sont fragiles ce qui limite leur application au comblement des défauts osseux les moins larges ou au remplacement de petits os subissant peu de contraintes mécaniques. Par ailleurs, on peut également citer des biocéramiques multiphasées permettant de moduler à la fois les propriétés de bioactivité et de biorésorbabilité comme le phosphate de calcium biphasique (HAp + β -TCP). L'intérêt biologique d'un tel matériau est double : assurer la minéralisation osseuse grâce à la phase stable (HAp) tout en se résorbant grâce à la phase résorbable (β -TCP).^{24,25}



Figure 1.3 : Tête fémorale en alumine utilisée lors d'un remplacement total de la hanche.¹⁸

1.3.3. Les polymères

Bien que les polymères soient largement intégrés aux dispositifs médicaux en milieu clinique, très peu sont utilisés en orthopédie. On peut citer en 1^{er} exemple le polyéthylène à ultra haut poids moléculaire (UHMWPE), de masse molaire comprise entre 2 et 6 millions, dont les propriétés mécaniques remarquables, le pouvoir lubrifiant et le caractère chimique inerte en font un excellent composant des têtes d'articulation de prothèses (hanche, genoux, cheville...)²⁶ Il y a également le PMMA (Polyméthyl méthacrylate) utilisé comme composant dans la formulation de ciment osseux.²⁶ A côté de ces polymères dits « non résorbables », il existe les dispositifs polymériques biodégradables qui, comme les biocéramiques biodégradables, se résorbent en un temps donné après que le processus de guérison soit achevé. Un exemple clinique est la fixation mécanique temporaire des fractures par ces polymères synthétiques dont la structure chimique comporte essentiellement des groupements fonctionnels hautement réactifs en milieu aqueux tels que

les fonctions ester et acide carboxylique.^{27,28} Leur utilisation est cependant limitée du fait de leur très faible résistance en compression.

1.3.4. Les composites et les hybrides

D'un point de vue matériau, l'os naturel est un composite, c'est à dire un matériau constitué de phases de natures différentes, notamment une phase organique composée de biopolymères (collagène type I principalement) et une phase inorganique constituée de nanocristaux d'hydroxyapatite. À cette description s'ajoutent une porosité importante (macroporosité) et de très bonnes propriétés mécaniques (haute résistance à la traction, très rigide...) qui lui permettent de jouer ses rôles de protection des organes vitaux et de soutien mécanique. Dans le but de mimer sa structure et ses performances (mécaniques ou/et biologiques), de nombreuses recherches se sont focalisées sur l'élaboration de composites obtenus par combinaison de polymères et de biocéramiques de 2^{de} génération. Par exemple, Wang et *al.*²⁹ ont étudié les propriétés mécaniques et de bioactivité de composites macroporeux formés par dispersion de particules de verre bioactif dans de la gélatine. Il ressort de cette étude que celles-ci sont améliorées lorsque la taille des particules bioactives est inférieure à 100 nm. Par ailleurs, on retrouve différents types de configurations de composites bioactifs étudiés dans la littérature (voir Figure 1.4).

À la différence des composites, les matériaux hybrides sont caractérisés par une interpénétration des réseaux organiques et inorganiques *via* des interactions intermoléculaires si bien qu'aucune des deux phases n'est distinguable. En fonction de la nature des interactions, on distingue 2 types de matériaux hybrides : les matériaux hybrides de classe I (faibles interactions) et II (fortes interactions). Divers composés hybrides bioactifs ont été élaborés pour la réparation tissulaire osseuse notamment par combinaison de verres bioactifs et de polymères naturels.³⁰⁻³²

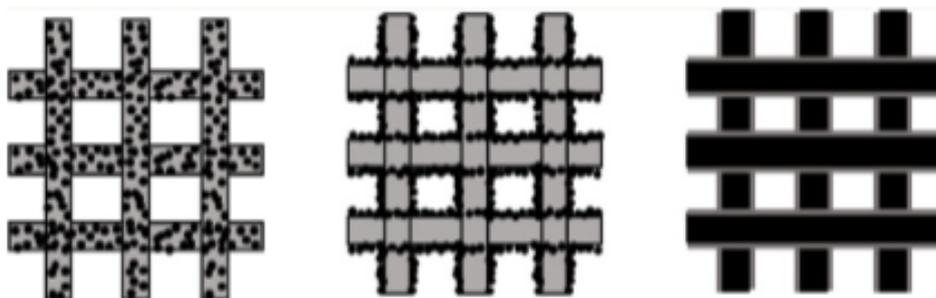


Figure 1.4 : Quelques configurations schématiques des composites bioactifs: dispersion de verres bioactifs dans un polymère (gauche), dépôt du matériau bioactif à la surface du polymère (centre), dépôt de polymère à la surface du matériau bioactif (droite).³³

2. Les verres bioactifs

L'idée de la conception du verre bioactif est tout sauf un hasard. En effet, se basant sur la composition inorganique de l'os naturel, Hench stipula qu'un biomatériau capable de former l'hydroxyapatite en milieu *in vivo* serait susceptible de remplacer les tissus osseux abîmés sans être rejetés par le corps humain.³⁴ Ainsi fut élaboré le 45S5 bioglass® composé de SiO_2 , Na_2O , CaO et P_2O_5 . Il représente le premier exemple de verre bioactif capable de se lier chimiquement de façon intime et solide aux tissus osseux environnants sans être rejeté par le milieu vivant et est considéré comme l'ancêtre des matériaux bioactifs de dernière génération. Dans les années 80, il a été utilisé pour le remplacement d'ossicules (petits os de l'oreille moyenne)³⁵ et dans le domaine dentaire.³⁶ De nos jours, il est inclus dans la formulation de mastic injectable pour le comblement de défauts osseux et sert de prévention contre l'hypersensibilité dentaire.^{37,38} Ces applications font du 45S5, le verre bioactif le plus utilisé en milieu clinique.

2.1. Structure

De façon générale, les verres bioactifs sont à base de silice. Leur structure est composée d'un réseau désordonné de tétraèdres $[\text{SiO}_4]$ (formateurs du réseau vitreux) liés les uns aux autres par les oxygènes situés aux sommets des tétraèdres.³⁹ Ils comportent également des oxydes tels que Na_2O , CaO ou K_2O formés à partir des ions alcalins et/ou alcalino-terreux correspondants (Na^+ , Ca^{2+} , K^+ ...). La présence de ces ions métalliques, appelés modificateurs de réseau, modifie le réseau amorphe par rupture des liaisons Si-O-Si générant ainsi des oxygènes non-pontants dont ils compensent la charge (voir figure 1.5).

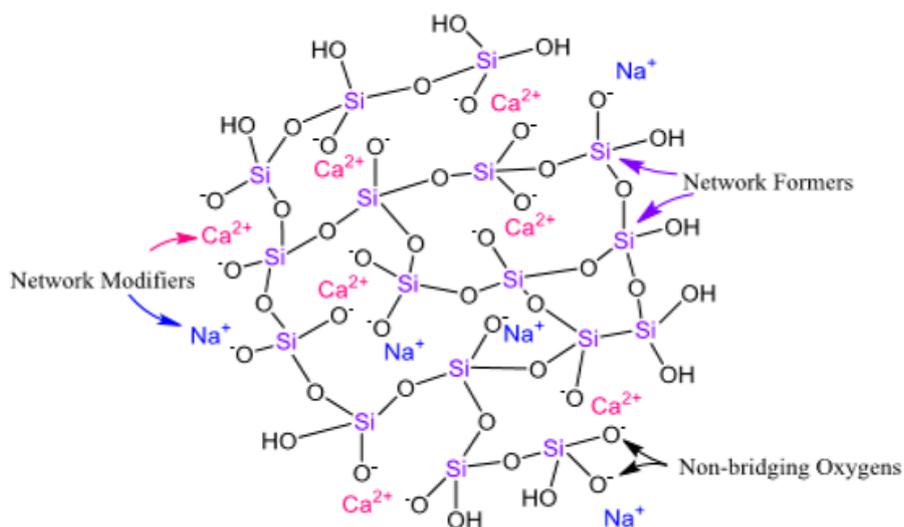


Figure 1.5 : Structure d'un verre bioactif. ⁴¹

D'autres ions tels que Zn^{2+} et Mg^{2+} sont appelés ions intermédiaires, car ils peuvent à la fois jouer le rôle de formateur et de modificateur de réseau.⁴⁰ Il est important de noter qu'une structure plus ouverte, c'est-à-dire moins interconnectée, est recherchée dans le but de faciliter la dissolution du verre dans le milieu physiologique et ainsi relarguer les espèces ioniques qui interagissent positivement avec l'environnement tissulaire.

2.2. Méthodes d'élaboration

La méthode classique d'élaboration des verres bioactifs est la fusion. Elle implique une montée à haute température d'un mélange de précurseurs d'oxydes formateurs et modificateurs du réseau vitreux (entre 1000 et 1400°C) dans un creuset en platine ou en graphite.³³ Se référant au diagramme du système quaternaire SiO_2 - P_2O_5 - Na_2O - CaO , Hench a établi 4 zones dont les propriétés des verres diffèrent selon leur composition (Figure 1.6).¹⁸ La zone A est le domaine de composition correspondant aux verres bioactifs et plus particulièrement au bioverre 45S5 de composition massique 45% SiO_2 , 24.5% Na_2O , 24.5% CaO et 6% P_2O_5 . La zone B regroupe les verres quasi inertes, ceux dont la composition est comprise dans la région C sont résorbables et enfin, les verres de la région D sont techniquement impossibles à synthétiser. Cependant, à cette méthode de synthèse est associée une limitation de possibilités de mise en forme du fait de la très haute température. Aussi, il est également impossible d'obtenir des particules monodisperses ou nanométriques.

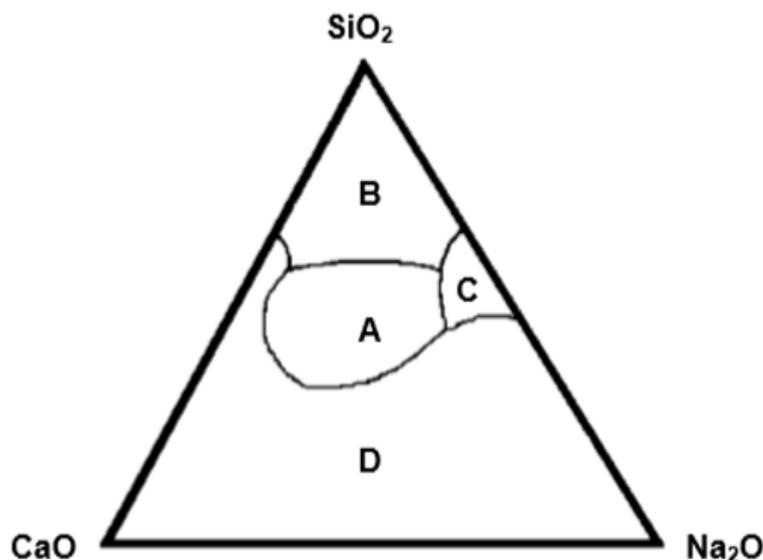


Figure 1.6 : Diagramme ternaire de composition SiO_2 - Na_2O - CaO avec 6% en masse de P_2O_5 .

Pour s'affranchir des inconvénients liés cette méthode conventionnelle, une alternative de synthèse a été explorée au début des années 90 : le procédé sol-gel. Ce procédé consiste en l'obtention d'un réseau inorganique à

température ambiante par hydrolyse et condensation de précurseurs alcoxydes. L'obtention des verres bioactifs par cette méthode nécessite généralement une étape finale de recuit entre 600°C et 700°C, afin d'éliminer les espèces résiduelles (contres ions, précurseurs n'ayant pas réagi ...). Ainsi Li *et al.*⁴² ont montré que pour une même composition, les verres ternaires SiO₂-P₂O₅-CaO élaborés par ce procédé présentent une meilleure bioactivité que ceux obtenus par fusion. Dans cette même étude les auteurs ont également montré que la proportion en silice au-delà de laquelle le verre perd sa bioactivité est de 90 %mol. Selon eux, ces résultats sont liés aux propriétés texturales remarquables des verres synthétisés (surface spécifique élevée et présence de nanopores) qui sont intrinsèques à la méthode sol-gel. Contrairement à la méthode traditionnelle, le procédé sol-gel permet l'obtention de verres dans le système binaire SiO₂-CaO dont les propriétés bioactives sont comparables à celles du bioverre 45S5.⁴³ Par ailleurs, la versatilité de cette méthode de chimie douce offre un large panel de mise en forme (Figure 1.7). Par exemple, des nanoparticules sont obtenues en milieu basique tandis qu'une synthèse en milieu acide favorise l'obtention de monolithes.⁴⁴ Il est également possible de réaliser facilement des dépôts de couches minces sur des substrats de formes variées (par dip-coating). Pour toutes ses raisons, le procédé sol-gel a été choisi comme méthode d'élaboration des particules de verres bioactifs étudiées dans cette thèse.

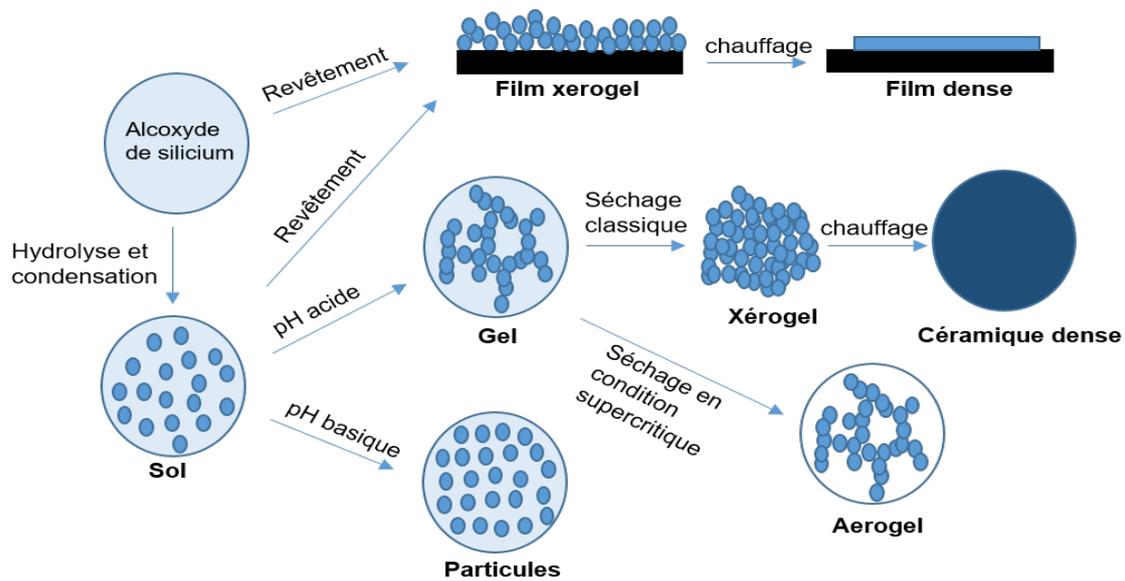


Figure 1.7 : Quelques exemples de mise en forme obtenus par le procédé sol-gel.

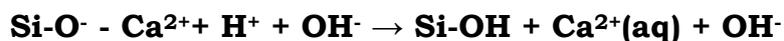
2.3. Mécanisme de bioactivité

Selon Hench, un matériau bioactif induit une réponse biologique à son interface qui aboutit à la formation d'un lien entre les tissus hôtes et le matériau. En 1994, il définit deux nouvelles classes de bioactivité.⁴⁵

- Les verres bioactifs de classe A : ils présentent à la fois des propriétés ostéoconductrices et ostéoproductives c'est-à-dire qu'ils offrent une interface biocompatible favorable à la minéralisation osseuse tout en ayant une surface librement colonisée par les cellules ostéogéniques.⁴⁶ Ces propriétés biologiques sont la conséquence de la rapidité des réactions qui ont lieu à la surface de l'implant, accélérant ainsi l'accroche biologique avec l'os.
- Les verres bioactifs de classe B quant à eux sont caractérisés par des réactions de surface plus lentes. Par conséquent, ils se lient faiblement aux tissus osseux, générant ainsi une faible prolifération de la matrice osseuse.

D'une manière générale, la formation de l'hydroxyapatite à la surface du verre en milieu aqueux est une preuve de son caractère bioactif et un prérequis à sa fixation biologique *in vivo* avec l'os. L'eau distillée et le Tris Buffer ont été les premières solutions aqueuses à être utilisées pour les « tests de bioactivité ».⁴⁷ De nos jours, les tests de minéralisation s'effectuent de plus en plus dans le SBF (Simulated Body Fluid), une solution saline qui mime la composition inorganique du plasma humain.⁴⁸ Ainsi, la bioactivité est la conséquence d'une succession de réactions chimiques de surface décrites comme suit :

- 1- Échange rapide des ions alcalins ou alcalino-terreux (Ca^{2+} , Na^+ , ...) avec les ions H^+ du milieu physiologique.



Création de groupements Si-OH puis augmentation du pH avec la concentration d'ions OH^- dans le milieu.

- 2- Rupture des liaisons Si-O-Si du réseau vitreux par hydrolyse due à l'augmentation du pH du milieu.



Il s'ensuit un relargage d'espèces solubles $\text{Si}(\text{OH})_4$ dans la solution puis une formation continue de groupements silanols (Si-OH) à la surface du verre qui servent de site de nucléation.

- 3- Re-polymérisation d'un gel de silice à la surface du verre par condensation des groupements silanols.



- 4- Formation et croissance d'une couche amorphe riche en calcium et phosphore à la surface du gel de silice par migration des ions Ca^{2+} et PO_4^{3-} (provenant du verre et/ou du milieu).
- 5- Incorporation des groupements OH^- et CO_3^{2-} dans la couche $\text{CaO-P}_2\text{O}_5$ puis cristallisation d'hydroxyapatite carbonatée (HAC).

Puis Hench proposa 6 autres étapes cellulaires conduisant à la fixation biologique de l'implant avec les tissus osseux en milieu *in vivo*.⁴⁹ On note ainsi:

- 6- Adsorption et désorption à la surface de la couche d'HCA des protéines et des facteurs de croissance,
- 7- Action des macrophages,
- 8- Attachement des cellules souches mésenchymateuses,
- 9- Formation des ostéoblastes par différenciation des cellules souches puis prolifération de celles-ci à la surface du verre bioactif,
- 10- Production de la matrice extracellulaire,
- 11- Formation de la matrice osseuse.

2.4. Pourquoi des nanoparticules ?

Les propriétés remarquables des verres bioactifs en font des biomatériaux attractifs dans le domaine orthopédique. Ces dernières années les nanoparticules de verres bioactifs ont fait l'objet d'une grande attention pour l'ingénierie tissulaire et la régénération osseuse. En effet, à l'échelle nanométrique, les propriétés physiques (surface spécifique, topographie, rugosité, etc...) des verres bioactifs permettent de contrôler leur réactivité biologique en présence des tissus mous ou durs.^{18,50,51} Ainsi, Fan *et al.*⁵² ont montré que les nanoparticules sphériques de verres bioactifs 58S caractérisées par un ratio surface/volume (S/V) important améliorent la différenciation et la prolifération des ostéoblastes aussi bien que le processus de biominéralisation. Dans une étude similaire, Gong *et al.*⁵³ ont mis en évidence que la surface spécifique élevée des nanoparticules 58S induit une meilleure prolifération et différenciation des ostéoblastes en comparaison aux particules de bioverre 45S5 de taille micrométrique. De plus, des tests *in vitro* dans le SBF ont également prouvé qu'une taille nanométrique induit un

relargage rapide des ions en solution (par dissolution du verre), accélérant ainsi le mécanisme de bioactivité précédemment décrit.^{54,55}

Outre leur impact positif au niveau cellulaire, le rôle des nanoparticules de verres bioactifs au sein de systèmes composites a été largement examiné par de nombreux groupes de recherche. En effet, Liu *et al.*⁵⁶ ont montré qu'une dispersion de nanoparticules de verres bioactive avec une surface modifiée (diamètre moyen = 40 nm) dans une matrice polymérique (PLLA) augmente la résistance à la traction pour une insertion inférieure à 6% en masse. Au-delà de cette valeur, l'agglomération des particules bioactives génère une diminution des propriétés mécaniques du composite. Tamjid *et al.*⁵⁷ ont également étudié l'impact de la taille des verres bioactifs sur les propriétés mécaniques du composite verre bioactif / PCL. Les auteurs ont noté une amélioration des propriétés mécaniques du composite principalement due à une haute surface d'interface induite par les nanoparticules de verre bioactif.

3. Méthodes pour traiter le cancer

Bien qu'aucune méthode thérapeutique ne soit à ce jour valable pour le traitement curatif des métastases osseuses, différents traitements ou combinaison de traitements permettent d'améliorer la qualité de vie des patients. On distingue les méthodes traditionnelles regroupant de façon non exhaustive *la chirurgie, la chimiothérapie et la radiothérapie* et les méthodes modernes comme *l'hyperthermie magnétique*, sujet d'étude de cette thèse.

3.1. Méthodes usuelles

La chimiothérapie est un traitement basé sur l'utilisation d'agents pharmacologiques caractérisés par une activité antitumorale.⁵⁸ Les foyers cancéreux sont détruits par action des agents sur le mécanisme de croissance des cellules tumorales.⁵⁹ Dans le cas des métastases, ce traitement peut ralentir l'évolution et faire diminuer le volume de la masse tumorale, induisant l'ablation chirurgicale d'une plus faible masse osseuse. Cependant, l'action non sélective des agents chimiothérapeutiques a un effet toxique immédiat et considérable sur les cellules saines à renouvellement rapide.⁵⁹

L'utilisation d'une radiation ionisante (radiothérapie) pour le soulagement ou le traitement de douleurs générées par les métastases osseuses est très courante.⁵⁹ Cependant, l'efficacité de cette méthode est fortement dépendante du type de radiation. Les émetteurs de rayonnement β (particules légères et chargées) tels que le ^{89}Sr et le ^{153}Sm sont très efficaces, car ils induisent une irradiation localisée et continue dans la zone affectée, ce qui permet de lutter efficacement contre les lésions secondaires diffuses.⁶⁰ Néanmoins, le facteur limitant est l'irradiation de la moelle osseuse

provoquant une insuffisance médullaire, pathologie caractérisée par un manque de production de cellules sanguines par la moelle osseuse.

Une intervention chirurgicale est requise lorsque le patient présente des fractures pathologiques causées par des lésions métastatiques et également lorsque les techniques non opératives (chimiothérapie, radiothérapie) sont inefficaces face aux douleurs locales ressenties par le patient.⁶¹ Par ailleurs, le recours à la chirurgie implique également une substitution osseuse (allogreffe, autogreffe, matériau synthétique ...) dans le but d'assurer la stabilité structurale de la zone concernée.^{62,63} L'un des risques associés à cette technique est une potentielle rupture de la reconstruction osseuse due à la propagation des cellules cancéreuses dans la zone traitée.⁶⁴

3.2. Hyperthermie

Dans le domaine médical, l'hyperthermie est un traitement au cours duquel les foyers cancéreux sont exposés à des températures supérieures à 37°C. Dans ces conditions, les cellules cancéreuses, plus sensibles à une élévation de température que les cellules saines, sont totalement détruites ou deviennent vulnérables à d'autres traitements. En effet, une température comprise entre 41 et 46°C altère les fonctions cellulaires (dénaturation des protéines et de l'ADN, modification métabolique de l'oxygène...) et l'environnement physiologique (perméabilité vasculaire, modification du pH...) de la tumeur ^{65,66} augmentant ainsi l'efficacité des méthodes de traitement classiques ou favorisant la mort cellulaire par apoptose.^{67,68} Par ailleurs, induire une température supérieure à 46°C conduit à la carbonisation cellulaire de façon immédiate : on parle de thermoablation. En fonction de la localisation des cellules cancéreuses, on distingue différents types d'hyperthermie incluant l'hyperthermie corporelle, régionale et locale.⁶⁹ Comme son nom l'indique, l'hyperthermie corporelle s'applique lorsque les cellules tumorales sont répandues dans tout le corps (métastases). Les tumeurs situées spécifiquement dans une région du corps difficile d'accès (un organe, un bras) sont traitées par hyperthermie régionale. Le traitement d'une zone plus restreinte se fait par hyperthermie locale. L'effet thermique induit dans l'environnement tumoral provient de l'interaction entre les tissus biologiques et les radiations non ionisantes émises par des sources extérieures, généralement des radiations électromagnétiques radiofréquence (de quelques centaines de kilohertz à quelques mégahertz), micro-ondes (quelques centaines de mégahertz à quelques gigahertz) ou des ultra-sons et s'associe à de nombreux inconvénients comme une faible pénétration dans les tissus biologiques et un chauffage non sélectif des tissus conduisant à des troubles cardiaques et vasculaires.⁷⁰ Face à ces inconvénients, l'hyperthermie induite par des nanoparticules magnétiques sous champ magnétique alternatif offre une nouvelle alternative thérapeutique aux méthodes déjà existantes.

3.3. Hyperthermie magnétique

L'hyperthermie magnétique est une branche de la thermothérapie basée sur l'émission de chaleur dans l'environnement tumoral par l'intermédiaire de particules magnétiques nanométriques en présence d'un champ magnétique alternatif.⁷¹ Un tel champ permet d'atteindre les tissus ou les organes infectés situés en profondeur avec très peu d'effets indésirables. L'originalité de ce traitement réside dans l'utilisation de nanoparticules magnétiques comme thermosources. En effet, elles offrent la possibilité de ciblage passif des cellules cancéreuses par effet EPR (Enhanced Permeability and Retention effect) confinant de façon homogène et sélective la chaleur générée au niveau du site tumoral.⁷² Aussi, l'utilisation de nanoparticules dans un régime super-paramagnétique (particules ferro(i)magnétiques dont l'aimantation est nulle en l'absence de champ magnétique) favorise l'obtention d'une dispersion stable en milieu biologique en absence de champ magnétique extérieur, ce qui prévient le risque d'embolisation des vaisseaux sanguins.⁷³ Par ailleurs, leur large surface spécifique offre des possibilités de fonctionnalisation surfacique, aspect recherché pour l'ajout d'autres fonctionnalités biomédicales à l'hyperthermie comme le relargage de principes actifs. Il est également possible de fonctionnaliser les particules afin d'obtenir une dispersion plus stable (pour l'imagerie médicale) ou avec des marqueurs de certains cancers afin de cibler de manière encore plus précise les zones à traiter.

Bien que les nanoparticules magnétiques présentent *a priori* les propriétés physiques recherchées pour l'hyperthermie magnéto-induite, leur application en milieu clinique est limitée. Aujourd'hui, MagForce® est l'unique entreprise qui propose un traitement adjuvant ou thérapeutique à base de nanovecteurs magnétiques ayant été approuvé en Europe (sous la marque NanoTherm™). Cependant, ce traitement nécessite une grande quantité de particules au niveau du site tumoral (4.5 mL à une concentration de 112 mg/mL).^{74,75} Ainsi, l'un des challenges de cette décennie et des autres à venir est le développement de nouveaux matériaux plus efficaces qui pourront donc être injectés en plus faible dose.

Avant d'étudier plus en détail les phénomènes physiques expliquant et influençant l'hyperthermie magnétique, il est important de rappeler quelques notions de magnétisme.

4. Introduction au magnétisme

4.1. Comportement magnétique des matériaux

Placés sous un champ magnétique H , la plupart des matériaux acquièrent une aimantation M proportionnelle à H telle que $M = \chi H$ où χ est la susceptibilité magnétique. Lorsque χ est faible et négatif, on dit que le matériau est diamagnétique. Cette propriété intrinsèque à la matière et propre à tous les matériaux est caractéristique des couches électroniques pleines. A l'inverse, ceux présentant une valeur de χ faible et positive ont un comportement magnétique dit paramagnétique. Dans ce régime, les électrons non appariés voient leurs moments de spin s'orienter dans la même direction que le champ H . Cependant il n'y a pas d'interaction entre eux si bien qu'en l'absence de champ extérieur, le matériau perd sa polarisation magnétique. En revanche, certains matériaux sont caractérisés par des interactions fortes (de nature électrostatique) entre les électrons voisins, couplant fortement leurs moments magnétiques de spin. Par conséquent, un ordre magnétique s'établit, si bien que le matériau présente une aimantation spontanée malgré la suppression du champ extérieur. L'aimantation spontanée macroscopique mesurée s'explique par la somme des contributions des moments de spin. Ces interactions interatomiques de courte portée sont appelées interactions d'échange. L'interaction élémentaire entre deux moments de spins S_i et S_j s'écrit comme suit :

$$X_{ij} = -A_{ij} S_i S_j$$

où A_{ij} représente l'intégrale d'échange traduisant le recouvrement des orbitales atomiques.

Une valeur positive de A_{ij} traduit un comportement ferromagnétique caractéristique d'un alignement parallèle des moments de spins, alors que lorsque l'intégrale d'échange est négative, on observe un alignement antiparallèle des spins. Un comportement antiferromagnétique est ainsi observé dans le cas d'une compensation totale des moments magnétiques de spin. Autrement dit, l'aimantation spontanée mesurée est nulle. Dans le cas contraire, c'est-à-dire lorsque la compensation est incomplète, le matériau est dit ferrimagnétique. Au-delà de la température de Curie (T_C), l'agitation thermique supprime l'ordre magnétique, qu'il soit ferro- ou ferrimagnétique. Dans le cas du comportement antiferromagnétique, les interactions d'échange deviennent inexistantes au-dessus d'une température dite température de Néel (T_N). Les différents types de couplages magnétiques sont schématisés dans la Figure 1.8.

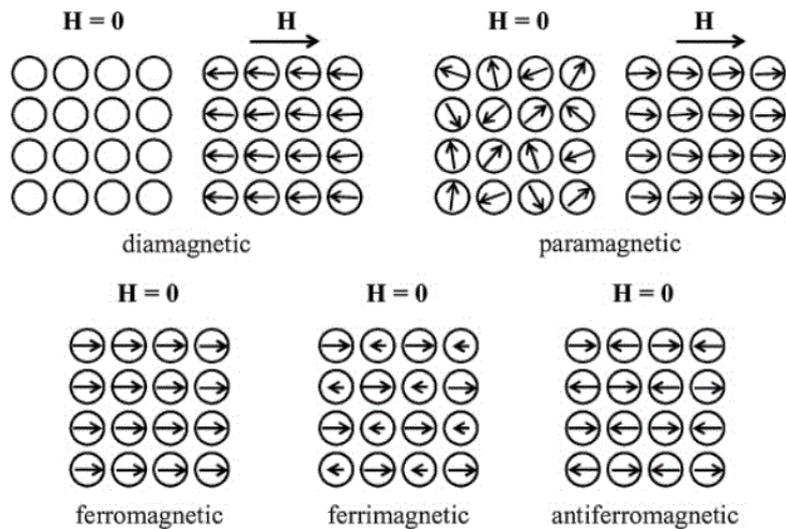


Figure 1.8 : Comportements magnétiques de différents matériaux observés en présence et en absence de champ magnétique.⁷⁶

4.2. Notion d'anisotropie

L'anisotropie représente la dépendance de l'aimantation d'un objet à suivre une direction privilégiée. On distingue plusieurs types d'anisotropie : *l'anisotropie magnétocristalline*, *l'anisotropie de forme* et *l'anisotropie de surface*.

Dans un matériau magnétique, les interactions électrostatiques du champ cristallin avec les moments orbitaux, et donc indirectement avec les moments de spin atomiques (dû au couplage spin-orbite), imposent une orientation préférentielle des orbitales de l'ion positif suivant des axes cristallographiques dits axes de facile aimantation, caractérisés par une énergie magnétocristalline minimale. Ainsi, sous une perturbation extérieure, une différence d'aimantation sera observée selon que la direction du moment magnétique soit parallèle ou perpendiculaire à l'axe de facile aimantation. Cette observation met en évidence l'anisotropie magnétocristalline.

L'existence de pôles magnétiques est à l'origine de la présence d'un champ démagnétisant au sein d'un matériau magnétique dont l'effet est la réduction de l'intensité de la source excitatrice. Dans ces conditions, l'anisotropie de forme privilégie l'alignement de l'aimantation suivant la direction minimisant le champ démagnétisant, c'est-à-dire la plus grande direction du matériau.

Contrairement aux matériaux massifs, les effets de surface influencent grandement les propriétés magnétiques des nanomatériaux. En effet, l'environnement des atomes en surface étant moins symétrique que ceux du cœur, il est possible que cette rupture de symétrie privilégie une orientation

de l'aimantation perpendiculaire à la surface du matériau. L'anisotropie de surface devient ainsi plus importante lorsque la taille du système considéré décroît et peut dans certains cas imposer sa symétrie.

4.3. Des particules multi- aux particules mono-domaines

La nécessité de minimiser l'effet du champ démagnétisant engendre la subdivision des matériaux massifs ferro(i)magnétiques en plusieurs domaines (domaines de Weiss) au sein desquels les moments magnétiques ont une orientation uniforme. Cependant, leur orientation est différente d'un domaine magnétique à un autre si bien qu'en l'absence de champ magnétique, l'aimantation résultante est nulle. Chaque domaine magnétique est séparé par une paroi dite « de Bloch » dont l'épaisseur dépend de la compétition entre l'énergie d'échange et l'énergie magnétocristalline. Par ailleurs les parois de Bloch sont le lieu de retournement progressif de l'aimantation d'une direction de facile aimantation (1^{er} domaine) vers une autre (2^e domaine) (voir Figure 1.9).

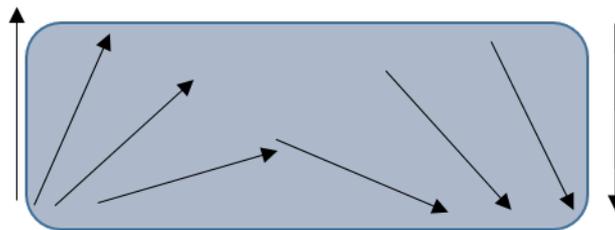


Figure 1.9 : Retournement de l'aimantation dans une paroi de Bloch.

Sous l'effet d'une induction magnétique, le processus de magnétisation d'un tel matériau met en jeu la nucléation de domaines magnétiques, associés à la rotation des dipôles magnétiques le long de l'axe du champ appliqué. L'apparition d'une aimantation spontanée à l'échelle macroscopique (après coupure du champ) permet de mettre en évidence un cycle d'hystérésis caractérisé par un champ coercitif et une aimantation rémanente. Décroître la taille d'une particule sphérique ferro(i)magnétique revient à réduire le nombre de parois si bien qu'en dessous d'un diamètre critique D_c , le coût en énergie pour la formation de celles-ci devient supérieur à l'énergie dipolaire. La particule se structure donc en un monodomaine (un seul domaine magnétique) et le diamètre critique correspondant est obtenu selon la relation suivante :

$$D_c = \frac{9\sqrt{KA}}{\mu_0 M_s^2}$$

avec A la constante d'échange, M_s l'aimantation à saturation et K la constante d'anisotropie.

Considérons une particule ferro(i)magnétique monodomaine isolée (sans interaction avec d'autres particules) avec une anisotropie uniaxiale. L'énergie de la barrière (E_B) séparant les deux états stables d'aimantation est donnée par l'expression $E_B = KV$ où K est la constante d'anisotropie effective et V le volume de la particule (voir Figure 1.10). Lorsque le volume de la particule décroît, l'énergie de la barrière devient du même ordre de grandeur que celle de l'agitation thermique. On définit une température dite de blocage T_B qui rend compte du comportement magnétique de la particule monodomaine en absence de champ magnétique. Lorsque la température T est inférieure à T_B , l'énergie thermique $E_T = k_B T$ est inférieure à E_B si bien que l'aimantation reste bloquée selon une direction de l'axe de facile aimantation. La particule se comporte ainsi comme un matériau ferro(i)magnétique. Cependant, au-dessus de T_B , l'énergie thermique E_T est supérieure à E_B et est donc suffisante pour autoriser le franchissement de la barrière. L'aimantation fluctue alors entre les deux directions de l'axe de facile aimantation. On dit que la particule est dans un état superparamagnétique.

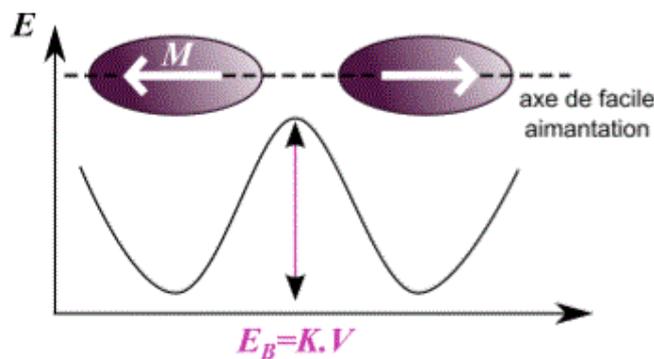


Figure 1.10 : Représentation schématique des deux états d'aimantation d'une particule monodomaine avec une anisotropie uniaxiale séparés par une barrière énergétique E_B .⁷⁷

Le temps caractéristique de relaxation de l'aimantation est donné par la loi de Néel :

$$\tau_N = \tau_0 \exp\left(\frac{KV}{k_B T}\right)$$

Avec τ_0 le temps intrinsèque de retournement de l'aimantation (environ 10^{-9} s), k_B la constante de Boltzmann. À partir de cette équation, la valeur de T_B peut être obtenue en fonction du temps d'acquisition de la mesure τ_m . En effet, $T = T_B$ lorsque $\tau_m = \tau_N$ donc on peut déduire de l'équation précédente que :

$$T_B = \frac{KV}{k_B} \ln\left(\frac{\tau_m}{\tau_0}\right)$$

Le temps τ_m pour une mesure effectuée à l'aide d'un magnétomètre à SQUID étant estimé à 100 secondes, $\ln\left(\frac{\tau_m}{\tau_0}\right) = 25$.

$$\text{Ainsi, } 25k_B T_B = KV$$

Sous un champ magnétique, le processus d'aimantation de la particule superparamagnétique s'effectue par rotation cohérente et collective des spins constitutifs au lieu de la nucléation de domaines magnétiques comme pour un matériau massif. Le retrait de l'induction magnétique conduit à une aimantation résultante nulle. En conséquence, la courbe $M(H)$ présente un champ coercitif et une aimantation rémanente nulle.

5. Dissipation de chaleur par hyperthermie magnétique

5.1. Mécanisme de dissipation de chaleur

La conversion de l'énergie électromagnétique en énergie thermique par un ensemble de nanoparticules dans un régime superparamagnétique s'effectue selon deux mécanismes communément appelés relaxation de Néel et de Brown.⁷⁸ La relaxation de Néel (mise en évidence dans la section précédente) implique la rotation interne de l'aimantation du matériau le long de l'axe de facile aimantation tandis que dans le cas de la relaxation de Brown, la rotation de l'aimantation est associée à la rotation physique de la particule si bien que la chaleur se dissipe par friction avec le milieu (Figure 1.11).

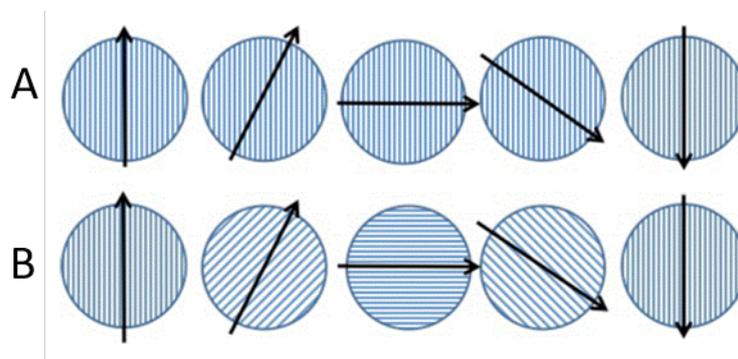


Figure 1.11: (A) Relaxation de Néel, (B) Relaxation de Brown.⁷⁰

Le temps caractérisant le mouvement des nanoparticules est donné par l'équation :

$$\tau_B = \frac{3\eta V}{k_B T}$$

où η est la viscosité du milieu et V le volume hydrodynamique des nanoparticules.

Les deux mécanismes étant distincts l'un de l'autre, on définit un temps de relaxation effectif dont l'inverse caractérise la vitesse de relaxation totale du système tel que :

$$\tau_{eff} = \frac{1}{\tau_N} + \frac{1}{\tau_B}$$

A partir de cette équation, il est évident que la vitesse de relaxation la plus rapide définira le mécanisme de production de chaleur correspondant. Par exemple, pour un système composé de nanoparticules de magnétite, Deastch *et al.*⁷⁹ ont souligné que la relaxation de Brown prédomine pour une taille supérieure à 15 nm tandis que celle de Néel prévaut pour une taille inférieure à 15 nm.

L'efficacité thérapeutique de la thermosource dépend de la quantité de chaleur produite par celle-ci dans la zone à traiter. Elle est définie par le SAR ou SLP (Specific Absorption Rate, Specific Loss Power) et s'exprime selon la relation suivante :

$$SAR = \frac{C_p}{m(Fe)} \frac{\Delta T}{\Delta t} \quad \text{en W/g}$$

où C_p représente la capacité calorifique du fluide par unité de masse, $m(Fe)$ la masse de fer contenue dans la suspension analysée et $\frac{\Delta T}{\Delta t}$ l'évolution de la température en fonction du temps. Cependant, le SAR évolue linéairement avec les conditions de mesure (l'intensité et la fréquence du champ magnétique) ce qui rend difficile la comparaison de l'efficacité des particules élaborées par différents groupes de recherche. En conséquence, une alternative indépendante de ces paramètres, la perte thermique intrinsèque (ILP, Intrinsic Loss Power en anglais) a été proposée pour permettre les comparaisons.⁸⁰ Elle est proportionnelle au SAR suivant la loi :

$$ILP = \frac{SAR}{H^2 f}$$

avec H l'amplitude du champ magnétique et f sa fréquence.

Par ailleurs, il faut noter que l'ILP n'est applicable que pour des valeurs de champ magnétique nettement inférieures à celle du champ de saturation des nanoparticules magnétiques.

5.2. Paramètres impactant le SAR

Depuis les premiers résultats cliniques présentés par le groupe de Jordan *et al.*⁸¹ sur le caractère thérapeutique de l'hyperthermie magnéto-induite, les recherches se sont focalisées sur différentes stratégies d'optimisation ou amélioration de cet effet. De ces études, il ressort que le contrôle des paramètres clé notamment les caractéristiques du champ magnétique

(amplitude et fréquence), la viscosité du milieu, la taille et la dispersion en taille des particules magnétiques, leur concentration et leur anisotropie magnétique impactent grandement l'élévation de température du milieu. Il est ainsi nécessaire de définir la relation entre ces paramètres et le pouvoir chauffant afin d'élaborer les meilleures nanosources possibles et les conditions optimales de leur utilisation.

5.2.1. Amplitude et fréquence

L'évolution du SAR a été largement étudiée dans la littérature pour des valeurs d'amplitude et de fréquence du champ magnétique respectivement dans les gammes 10-38 kA.m⁻¹ et 100-700 kHz.^{82,83} À partir de ces résultats, on remarque que des valeurs élevées d'amplitude et de fréquence induisent une augmentation du SAR, ce qui permet d'induire un effet thérapeutique efficace sur une période restreinte. Cependant, il ne faut pas utiliser une excitation magnétique trop importante, car elle génère des effets indésirables au niveau biologique. En effet, à fortes amplitude et fréquence, la probabilité de dissiper la chaleur de manière non sélective dans les tissus biologiques est très élevée. Ceci est dû aux propriétés électriques des tissus qui favorisent la génération de courant de Foucault.⁸⁴ Se basant sur des tests cliniques d'inconfort effectués sur des patients, Atkinson et Brozovich ont suggéré en 1984 que l'excitation magnétique maximale tolérée par le corps humain correspond à des champs magnétiques dont les produits $H \times f$ sont inférieurs ou égaux à $4,85 \cdot 10^8$ A.m⁻¹.s⁻¹).⁸⁵ Mamiya et ses collègues ont souligné que cette limite peut être étendue à $2 \cdot 10^9$ A.m⁻¹.s⁻¹ pour une zone corporelle plus petite.⁸⁶ Cependant, ces valeurs doivent être considérées comme des indications et non comme des limites absolues tant elles peuvent évoluer selon la localisation de la zone tumorale, l'équipement utilisé, la durée du traitement et le ressenti du patient.

5.2.2. Viscosité du milieu

Au regard de l'expression du temps de relaxation de Brown, il est évident que la valeur de SAR sera impactée par la viscosité du milieu. Les mesures de SAR relevées par Fortin *et al.*⁸⁷ pour des nanoparticules magnétiques dispersées dans l'eau et le glycérol ont montré une baisse de leur capacité chauffante avec l'augmentation de la viscosité due à la faible contribution de la relaxation de Brown au processus de dissipation de chaleur. De la Presa *et al.*⁸⁸ ont observé la même tendance pour des nanoparticules de maghémite de 13 et 14 nm de diamètre dispersées dans une solution d'agar. Par contre, pour des particules plus petites (6, 8 et 11 nm), le pouvoir chauffant reste identique quelle que soit la viscosité du milieu. Ces résultats confirment le fait que les pertes thermiques par relaxation de Brown prédominent

uniquement pour des particules de grande taille et sont maximisées lorsque le milieu à une viscosité très faible.

5.2.3. Taille des nanoparticules

L'influence de la taille des nanoparticules a été largement étudiée dans la littérature et est sujette à débat. D'un côté, les études théoriques menées par Carrio *et al.*⁸⁹ stipulent que les nanoparticules de petite taille constituent les meilleures sources de chaleur. Iacovita *et al.*⁹⁰ ont abouti expérimentalement à la même conclusion. Au contraire, d'autres groupes de recherches estiment que les particules plus grandes et multi-domaines doivent être privilégiées en tant que thermosources, car présentant une forte valeur de SAR.⁹¹ A noter que dans ces conditions, la puissance calorifique dissipée sous un champ alternatif est fonction de l'aire de la boucle d'hystérésis (A_i) de la courbe $M(H)$ selon la formule : $P = A_i.f$. A_i est donc fonction du champ coercitif (H_c), de l'aimantation rémanente (M_r) et de l'aimantation à saturation (M_s). Par ailleurs, de nombreuses études ont prouvé que des valeurs élevées de SAR peuvent être mesurées pour des tailles intermédiaires de particules, proches du diamètre critique caractérisant la zone de transition monodomaine-multidomaine.^{92,93}

Ces résultats contradictoires montrent que d'autres paramètres influencent la chaleur produite par relaxation magnétique des nanoparticules magnétiques comme la nature des particules, leur cristallinité, leur état d'agrégation en solution, paramètres rarement fixés dans les travaux traitant de l'influence de la taille sur le SAR. A titre d'illustration, la Figure 1.12 présente l'évolution des valeurs SAR en fonction de la taille de différents matériaux magnétiques selon des études théoriques.

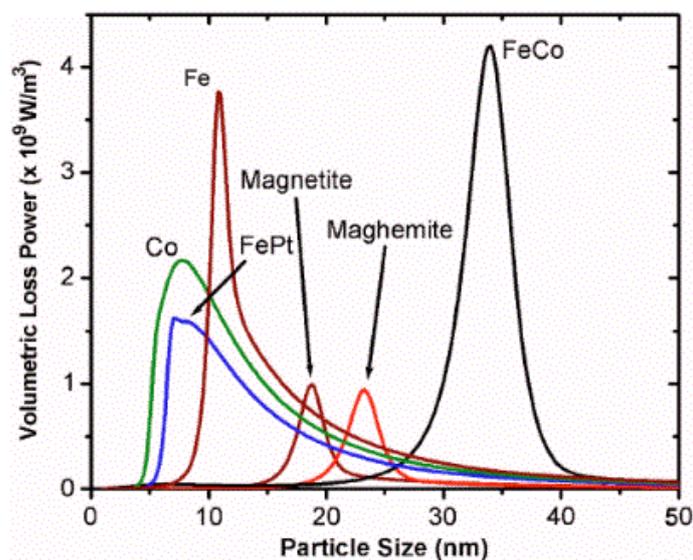


Figure 1.12: Variation du SAR en fonction de la taille des particules pour différents matériaux sous une excitation magnétique de 300 kHz et 39.8 kA.m⁻¹.⁹⁵

De même que la taille, la distribution de taille des particules magnétiques impacte considérablement leur pouvoir de chauffe. En effet, il est admis qu'une importante polydispersité diminue la valeur du SAR à cause d'une réduction du nombre de particules capables de s'échauffer.⁹⁴ Pour cette raison, un système monodisperse en taille est souhaité.

5.2.4. Anisotropie

La dépendance exponentielle du temps de relaxation de Néel avec la constante d'anisotropie montre que la chaleur dissipée peut être contrôlée en modifiant l'anisotropie du système étudié. Dans la littérature, les expériences menées sur deux systèmes fréquemment étudiés en hyperthermie magnétique, à savoir la magnétite et la maghémite, ont montré que l'augmentation de l'anisotropie magnétocristalline *via* l'insertion d'éléments de transitions tels que le cobalt (Co) et le manganèse (Mn) permet d'accroître les valeurs de SAR.^{65,96} Il est également possible d'augmenter l'anisotropie en élaborant des nanoparticules magnétiques à facettes ou cubiques.^{97,98} Cette dernière morphologie, contrairement à la forme sphérique, est d'une part caractérisée par une anisotropie de surface élevée et permet également de limiter le phénomène de spin canting (désalignement des spins de surface).^{98,99} Néanmoins, l'augmentation de l'anisotropie entraîne aussi la croissance du niveau énergétique de la barrière séparant les 2 orientations de l'aimantation selon l'axe de facile aimantation. En conséquence, l'efficacité thérapeutique nécessite l'application d'un champ magnétique d'intensité plus élevée qui peut potentiellement générer des effets indésirables d'un point de vue clinique.¹⁰⁰

5.2.5. Concentration

L'effet de la concentration sur les propriétés d'hyperthermie des nanoparticules magnétiques est corrélé à l'existence d'interactions dipolaires magnétiques entre elles. Lorsque la concentration augmente, la distance inter-particulaire diminue, modifiant ainsi les propriétés magnétiques et les mécanismes de relaxation. Bien que le rôle de ces interactions ait été largement étudié dans la littérature, les conclusions obtenues sont généralement opposées. Par exemple, Sadat *et al.*¹⁰¹ ont montré qu'une très bonne dispersion de nanoparticules de magnétite de 10 nm présente une meilleure efficacité thermique qu'une solution constituée d'agrégats de 100 nm. Une autre étude du groupe de De la presa a montré que l'augmentation de la concentration et la présence d'agrégats n'avaient aucun effet sur les propriétés d'hyperthermie.⁸⁸ Dans leur cas, cela peut s'expliquer par une certaine agrégation initiale des particules en solution et une faible variation des distances inter-agrégats. La force des interactions dipolaires est donc relativement constante lors de la variation de la concentration. A

contrario, des valeurs élevées de SAR ont été reportées pour des nanoclusters d'oxyde de fer.¹⁰² Le fait que l'orientation cristalline et donc l'axe de facile aimantation soient identiques pour chacune des nanoparticules individuelles constituant les clusters est à l'origine de ce phénomène. Dans un système constitué de nanoparticules non agglomérées, Dennis *et al.*¹⁰³ ont montré que l'arrangement spatial sous forme de chainons lorsque la concentration augmente favorise également une croissance des valeurs SAR. Comme précédemment, cette disposition spatiale induit une anisotropie uniaxiale qui empêche les aimantations de tourner librement et impose une relaxation collective de l'aimantation des particules.

6. Choix de la source magnétique

L'effet thérapeutique de la source magnétique est étroitement lié à ses propriétés magnétiques. Cependant, il est également important de s'assurer du comportement biologique de celle-ci afin d'éviter les réactions immunitaires pouvant mettre en jeu la vie des patients. Pour ces raisons, notre choix s'est porté sur les nanoparticules de maghémite qui présentent des propriétés texturales (grande surface spécifique) très utiles dans le domaine du stockage d'énergie ou de la catalyse. Grâce à leur forte aimantation à saturation dans le régime superparamagnétique (en dessous de 30 nm),⁷¹ la maghémite est un matériau de choix pour l'hyperthermie magnétique. Aussi, sa biocompatibilité, non toxicité, biodégradabilité et haute stabilité en milieu physiologique en font un matériau inoffensif pour le corps humain.¹⁰⁴ Par ailleurs, la synthèse de particules de γ -Fe₂O₃ de différentes morphologies et de différentes tailles est bien connue ce qui permet de contrôler leurs propriétés structurales et magnétiques.¹⁰⁵

6.1. Structure de la maghémite

La maghémite appartient à la famille des ferrites dont la formule générique est $M(Fe_2O_4)$. M représente soit un métal divalent (Mg^{II}, Co^{II}, Cd^{II}, Zn^{II}, Mn^{II}, Ni^{II}, Fe^{II}...), soit une combinaison d'ions monovalent (Li⁺), trivalents (Fe^{III}, Mn^{III}) ou tétravalents (Ti^{IV}, Sn^{IV}). Cristallisant dans une structure spinelle, elle est communément nommée ferrite spinelle. La structure spinelle se décrit par un arrangement de sites interstitiels cationiques tétraédriques et octaédriques, formés à partir d'un réseau cubique à face centrée (CFC) d'anions O²⁻ (voir Figure 13). On la représente par la formule chimique $(M_{1-\alpha}Fe^{\alpha})[M_{\alpha}Fe^{3+}_{2-\alpha}]O_4$ dans laquelle les sites tétraédriques et octaédriques sont représentés respectivement par les parenthèses et les crochets. Le paramètre α est le taux d'inversion décrivant la proportion des ions Fe³⁺ dans les sites tétraédriques. Ainsi, selon la valeur de α , la distribution des cations dans les sites se fait différemment.

Lorsque $\alpha=0$, la formule chimique s'écrit : $(M)[Fe^{3+}_2]O_4$. Les ions divalents se trouvent exclusivement dans les sites tétraédriques tandis que les ions ferriques occupent les sites octaédriques. La spinelle est dite *normale*.

Lorsque $\alpha=1$, elle s'écrit : $(Fe^{3+})[M Fe^{3+}]O_4$. Dans ce cas, la moitié des ions ferriques est dans les sites tétraédriques et l'autre moitié, avec l'ensemble des ions divalents, occupe les sites octaédriques. La spinelle est dite *inverse*.

Pour une répartition des cations plus complexe, elle est dite *mixte*.

La structure cristalline de la maghémite découle de celle de la magnétite. Historiquement, la magnétite est le premier matériau magnétique découvert par l'homme. En effet, c'est le composant essentiel de *la pierre de magnétite*, longtemps utilisée comme boussole par les marins chinois. Sa structure cristalline est une spinelle inverse de formule $(Fe^{3+})[Fe^{2+} Fe^{3+}]O_4$ dans laquelle les ions ferreux sont stabilisés en sites octaédriques (minimisation de l'énergie du champ cristallin). Il est possible d'obtenir la maghémite par oxydation de la magnétite. La structure spinelle inverse est conservée, cependant l'oxydation aboutit à une transformation totale des ions Fe^{2+} en Fe^{3+} générant des lacunes dans les sites octaédriques. La formule chimique de la maghémite est donc $(Fe^{3+})[Fe^{3+}_{5/3} \square_{1/3}]O_4$ où \square représente une lacune. Le groupe d'espace de la maghémite est fonction de l'arrangement des lacunes dans les sites octaédriques :

- $Fd\bar{3}m$ si l'arrangement est désordonné,
- $P4_132$ s'il est partiellement ordonné,
- $P4_32_12$ pour une distribution totalement ordonnée des lacunes.

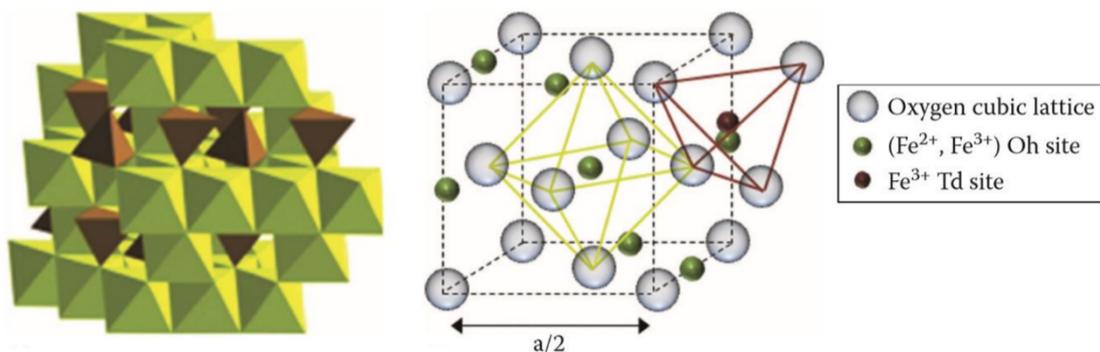


Figure 1.13 : Représentation de la structure spinelle de la magnétite avec les sites octaédriques (O_h) et tétraédriques (T_d).¹⁰⁶

Le couplage antiferromagnétique de super-échange entre les ions Fe^{3+} localisés dans les sites tétraédriques (T_d) et octaédriques (O_h) est à l'origine du ferrimagnétisme observé dans la maghémite à l'échelle macroscopique. Le moment magnétique global (μ) correspondant, résulte de la somme algébrique des moments portés par chaque électron non apparié soit $\mu = \frac{5}{3}(5\mu_B) - 5\mu_B = 3.33 \mu_B$ avec μ_B le magnéton de Bohr. Dans l'état

superparamagnétique, l'aimantation à saturation (M_s) constitue la propriété magnétique essentielle des nanoparticules de maghémite car la courbe d'aimantation du matériau en fonction du champ appliqué ne présente aucun cycle d'hystérésis. Elle est généralement d'environ 60 emu/g, une valeur bien plus faible que celle mesurée à l'état massif (autour de 75 emu/g) due essentiellement à un arrangement non colinéaire des spins à la surface ou dans le volume des particules.^{107,108} Par ailleurs, une autre propriété magnétique, à savoir la température de blocage, peut être déterminée par les mesures magnétiques ZFC-FC (Zero Field Cooled-Field Cooled). Il faut cependant faire attention car la température de blocage ne correspond pas exactement à la température maximale de la courbe ZFC car cette dernière varie en fonction de la dispersion en taille des particules et des interactions dipolaires entre elles. Lorsque la dispersion en taille est faible et que les particules peuvent être considérées comme isolées, T_B correspond au maximum de la courbe ZFC.

7. Objectifs de la thèse

Le principal objectif de cette thèse est la synthèse de nanoparticules aux propriétés magnétiques et bioactives. Pour ce faire, nous envisageons la croissance d'une coquille de verre bioactif binaire SiO_2 - CaO par procédé sol-gel autour d'un cœur magnétique formé de nanoparticules de maghémite élaboré par coprécipitation. Tout d'abord, en vue d'optimiser les propriétés bioactives du matériau multifonctionnel, des études focalisées sur des nanoparticules de verre bioactif seront effectuées. Leur but sera de mesurer l'impact de différents paramètres expérimentaux sur leurs propriétés physico-chimiques (taille, composition, état d'agrégation ...). En outre, l'effet d'un des paramètres clés sur leur bioactivité, la proportion de CaO , sera également étudié par des tests de minéralisation dans du SBF (Simulated Body Fluid). En effet, un désaccord existe dans la littérature quant à l'importance de l'influence de la composition comparativement à celle de la surface spécifique des échantillons sur leur bioactivité. Suite à cette étude, un protocole détaillé sera mis en place afin d'obtenir les hétérostructures d'intérêt. Ces dernières seront finement caractérisées et leurs propriétés magnétiques, d'hyperthermie et leur bioactivité seront évaluées dans le but de montrer leur intérêt pour la destruction de cellules cancéreuses couplées à la régénération du tissu osseux.

8. Références

- (1) Claes, L.; Eckert-Hübner, K.; Augat, P. The Fracture Gap Size Influences the Local Vascularization and Tissue Differentiation in Callus Healing. *Langenbecks Arch Surg* **2003**, 388 (5), 316–322.
- (2) Roberts, T. T.; Rosenbaum, A. J. Bone Grafts, Bone Substitutes and Orthobiologics: The Bridge between Basic Science and Clinical Advancements in Fracture Healing. *Organogenesis* **2012**, 8 (4), 114–124.
- (3) Goldberg, V. M.; Akhavan, S. Biology of Bone Grafts. In *Bone Regeneration and Repair: Biology and Clinical Applications*; Lieberman, J. R., Friedlaender, G. E., Eds.; Humana Press: Totowa, NJ, **2005**, 57–65
- (4) Wang, W.; Yeung, K. W. K. Bone Grafts and Biomaterials Substitutes for Bone Defect Repair: A Review. *Bioactive Materials* **2017**, 2 (4), 224–247.
- (5) Stevenson, S. Biology of Bone Grafts. *Orthopedic Clinics of North America* **1999**, 30 (4), 543–552.
- (6) Friedlaender, G. E.; Strong, D. M.; Tomford, W. W.; Mankin, H. J. Long-term Follow-up of Patients with Osteochondral Allografts. *Orthopedic Clinics of North America* **1999**, 30 (4), 583–588.
- (7) Escudero, M. I.; Poggio, D.; Alvarez, F.; Barahona, M.; Vivar, D.; Fernandez, A. Tibiotalocalcaneal Arthrodesis with Distal Tibial Allograft for Massive Bone Deficits in the Ankle. *Foot and Ankle Surgery* **2019**, 25 (3), 390–397.
- (8) Harun, W. S. W.; Asri, R. I. M.; Alias, J.; Zulkifli, F. H.; Kadirgama, K.; Ghani, S. A. C.; Shariffuddin, J. H. M. A Comprehensive Review of Hydroxyapatite-Based Coatings Adhesion on Metallic Biomaterials. *Ceramics International* **2018**, 44 (2), 1250–1268.
- (9) Wilson, J. 1 - Metallic Biomaterials: State of the Art and New Challenges. In *Fundamental Biomaterials: Metals*; Balakrishnan, P., M s, S., Thomas, S., Eds.; Woodhead Publishing Series in Biomaterials; Woodhead Publishing, **2018**, 1–33.
- (10) Hamidi, M. F. F. A.; Harun, W. S. W.; Samykano, M.; Ghani, S. A. C.; Ghazalli, Z.; Ahmad, F.; Sulong, A. B. A Review of Biocompatible Metal Injection Moulding Process Parameters for Biomedical Applications. *Materials Science and Engineering: C* **2017**, 78, 1263–1276.
- (11) Castner, D. G.; Ratner, B. D. Biomedical Surface Science: Foundations to Frontiers. *Surface Science* **2002**, 500 (1), 28–60.
- (12) Vallet-Regí, M.; Salinas, A. J. 6 - Ceramics as Bone Repair Materials. In *Bone Repair Biomaterials (Second Edition)*; Pawelec, K. M., Planell, J. A., Eds.; Woodhead Publishing Series in Biomaterials; Woodhead Publishing, **2019**, 141–178.

- (13) Li, J.; Hastings, G. W. Oxide Bioceramics: Inert Ceramic Materials in Medicine and Dentistry. In *Handbook of Biomaterial Properties*; Black, J., Hastings, G., Eds.; Springer US: Boston, MA, **1998**, 340–354.
- (14) Akagawa, Y.; Ichikawa, Y.; Nikai, H.; Tsuru, H. Interface Histology of Unloaded and Early Loaded Partially Stabilized Zirconia Endosseous Implant in Initial Bone Healing. *The Journal of Prosthetic Dentistry* **1993**, 69 (6), 599–604.
- (15) Christel, P.; Meunier, A.; Dorlot, J.-M.; Crolet, J.-M.; Witvoet, J.; Sedel, L.; Boutin, P. Biomechanical Compatibility and Design of Ceramic Implants for Orthopedic Surgery. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1988**, 523 (1), 234–256.
- (16) Elliot, J. C. *Structure and Chemistry of the Apatites and Other Calcium Orthophosphates, Volume 18 - 1st Edition*.
- (17) Pietrzak, W. S.; Ronk, R. Calcium Sulfate Bone Void Filler: A Review and a Look Ahead. *J Craniofac Surg* **2000**, 11 (4), 327–333.
- (18) Hench, L. L. Bioceramics: From Concept to Clinic. *Journal of the American Ceramic Society* **1991**, 74 (7), 1487–1510.
- (19) Vallet-Regí, M. Revisiting Ceramics for Medical Applications. *Dalton Trans.* **2006**, 0 (44), 5211–5220.
- (20) Hench, L. L.; Wilson, J. Surface-Active Biomaterials. *Science* **1984**, 226 (4675), 630–636.
- (21) Kokubo, T.; Kim, H.-M.; Kawashita, M. Novel Bioactive Materials with Different Mechanical Properties. *Biomaterials* **2003**, 24 (13), 2161–2175.
- (22) Hench, L. L.; Paschall, H. A. Direct Chemical Bond of Bioactive Glass-Ceramic Materials to Bone and Muscle. *Journal of Biomedical Materials Research* **1973**, 7 (3), 25–42.
- (23) Hench, L. L.; Splinter, R. J.; Allen, W. C.; Greenlee, T. K. Bonding Mechanisms at the Interface of Ceramic Prosthetic Materials. *Journal of Biomedical Materials Research* **1971**, 5 (6), 117–141.
- (24) Daculsi, G. Biphasic Calcium Phosphate Concept Applied to Artificial Bone, Implant Coating and Injectable Bone Substitute. *Biomaterials* **1998**, 19 (16), 1473–1478.
- (25) Sánchez-Salcedo, S.; Arcos, D.; Vallet-Regí, M. Upgrading Calcium Phosphate Scaffolds for Tissue Engineering Applications <https://www.scientific.net/KEM.377.19> (accessed Mar 27, 2019).
- (26) Rey-Vinolas, S.; Engel, E.; Mateos-Timoneda, M. 7 - Polymers for Bone Repair. In *Bone Repair Biomaterials (Second Edition)*; Pawelec, K. M., Planell, J. A., Eds.; Woodhead Publishing Series in Biomaterials; Woodhead Publishing, 2019, 179–197.
- (27) Poetz, K. L.; Shipp, D. A. Polyanhydrides: Synthesis, Properties, and Applications. *Aust. J. Chem.* **2016**, 69 (11), 1223–1239.

- (28) Doppalapudi, S.; Jain, A.; Khan, W.; Domb, A. J. Biodegradable Polymers—an Overview. *Polymers for Advanced Technologies* **2014**, *25* (5), 427–435.
- (29) Wang, C.; Shen, H.; Tian, Y.; Xie, Y.; Li, A.; Ji, L.; Niu, Z.; Wu, D.; Qiu, D. Bioactive Nanoparticle–Gelatin Composite Scaffold with Mechanical Performance Comparable to Cancellous Bones. *ACS Applied Materials & Interfaces* **2014**, *6* (15), 13061–13068.
- (30) Fan, B.; Wang, X.; Zhang, H.; Gao, P.; Zhang, H.; Li, X.; Huang, H.; Xiao, X.; Liu, D.; Lian, Q.; et al. Improving the Osteogenesis and Degradability of Biomimetic Hybrid Materials Using a Combination of Bioglass and Collagen I. *Materials & Design* **2016**, *112*, 67–79.
- (31) Wers, E.; Oudadesse, H.; Lefeuvre, B.; Merdrignac-Conanec, O.; Barroug, A. Evaluation of the Kinetic and Relaxation Time of Gentamicin Sulfate Released from Hybrid Biomaterial Bioglass-Chitosan Scaffolds. *Applied Surface Science* **2015**, *353*, 200–208.
- (32) Lao, J.; Dieudonné, X.; Fayon, F.; Montouillout, V.; Jallot, E. Bioactive Glass–Gelatin Hybrids: Building Scaffolds with Enhanced Calcium Incorporation and Controlled Porosity for Bone Regeneration. *J. Mater. Chem. B* **2016**, *4* (14), 2486–2497.
- (33) *Bioactive Glasses - 2nd Edition*; Heimo Ylänen.
- (34) Hench, L. L. The Story of Bioglass®. *J Mater Sci: Mater Med* **2006**, *17* (11), 967–978.
- (35) Merwin, G. E. Bioglass Middle Ear Prosthesis: Preliminary Report. *Ann Otol Rhinol Laryngol* **1986**, *95* (1), 78–82.
- (36) Stanley, H. R.; Hall, M. B.; Clark, A. E.; King, C. J.; Hench, L. L.; Berte, J. J. Using 45S5 Bioglass Cones as Endosseous Ridge Maintenance Implants to Prevent Alveolar Ridge Resorption: A 5-Year Evaluation. *Int J Oral Maxillofac Implants* **1997**, *12* (1), 95–105.
- (37) Zamet, J. s; Darbar, U. R.; Griffiths, G. s.; Bulman, J. s.; Brägger, U.; Bürgin, W.; Newman, H. N. Particulate Bioglass® as a Grafting Material in the Treatment of Periodontal Intrabony Defects. *Journal of Clinical Periodontology* **1997**, *24* (6), 410–418.
- (38) Jones, J. R.; Brauer, D. S.; Hupa, L.; Greenspan, D. C. Bioglass and Bioactive Glasses and Their Impact on Healthcare. *International Journal of Applied Glass Science* **2016**, *7* (4), 423–434.
- (39) Henderson, G. S.; Calas, G.; Stebbins, J. F. The Structure of Silicate Glasses and Melts. *Elements* **2006**, *2* (5), 269–273.
- (40) Azevedo, M. M.; Jell, G.; O'Donnell, M. D.; Law, R. V.; Hill, R. G.; Stevens, M. M. Synthesis and Characterization of Hypoxia-Mimicking Bioactive Glasses for Skeletal Regeneration. *J. Mater. Chem.* **2010**, *20* (40), 8854–8864.
- (41) Greasley, S. L. Bioactive glass nanoparticles for therapeutic applications, Imperial college London, London, **2015**.

- (42) Li, R.; Clark, A. E.; Hench, L. L. An Investigation of Bioactive Glass Powders by Sol-Gel Processing. *J. App. Biomater.* **1991**, 2 (4), 231–239.
- (43) Brinker, C. J.; Scherer, G. W. *The Physics and Chemistry of Sol-Gel Processing*; Academic Press: Boston, **1990**.
- (44) Jones, J. R. Reprint of: Review of Bioactive Glass: From Hench to Hybrids. *Acta Biomaterialia* **2015**, 23, Supplement, S53–S82.
- (45) Cao, W.; Hench, L. L. Bioactive Materials. *Ceramics International* **1996**, 22 (6), 493–507.
- (46) Wilson, J.; Low, S. B. Bioactive Ceramics for Periodontal Treatment: Comparative Studies in the Patas Monkey. *J Appl Biomater* **1992**, 3 (2), 123–129.
- (47) Clark, A. E.; Pantano, C. G.; Hench, L. L. Auger Spectroscopic Analysis of Bioglass Corrosion Films. *Journal of the American Ceramic Society* **1976**, 59 (1–2), 37–39.
- (48) Kokubo, T.; Takadama, H. How Useful Is SBF in Predicting in Vivo Bone Bioactivity? *Biomaterials* **2006**, 27 (15), 2907–2915.
- (49) Hench, L. L. Chronology of Bioactive Glass Development and Clinical Applications. *New Journal of Glass and Ceramics* **2013**, 03 (02), 67–73.
- (50) Day, R. M.; Boccaccini, A. R.; Shurey, S.; Roether, J. A.; Forbes, A.; Hench, L. L.; Gabe, S. M. Assessment of Polyglycolic Acid Mesh and Bioactive Glass for Soft-Tissue Engineering Scaffolds. *Biomaterials* **2004**, 25 (27), 5857–5866.
- (51) Gorustovich, A. A.; Roether, J. A.; Boccaccini, A. R. Effect of Bioactive Glasses on Angiogenesis: A Review of In Vitro and In Vivo Evidences. *Tissue Engineering Part B: Reviews* **2009**, 16 (2), 199–207.
- (52) Fan, J. P.; Kalia, P.; Di Silvio, L.; Huang, J. In Vitro Response of Human Osteoblasts to Multi-Step Sol-Gel Derived Bioactive Glass Nanoparticles for Bone Tissue Engineering. *Materials Science and Engineering: C* **2014**, 36, 206–214.
- (53) Gong, W.; Dong, Y.; Wang, S.; Gao, X.; Chen, X. A Novel Nano-Sized Bioactive Glass Stimulates Osteogenesis via the MAPK Pathway. *RSC Advances* **2017**, 7 (23), 13760–13767.
- (54) Zhong, J.; Greenspan, D. C. Processing and Properties of Sol-Gel Bioactive Glasses. *J. Biomed. Mater. Res.* **2000**, 53 (6), 694–701.
- (55) Lei, B.; Chen, X.; Han, X.; Zhou, J. Versatile Fabrication of Nanoscale Sol-Gel Bioactive Glass Particles for Efficient Bone Tissue Regeneration. *Journal of Materials Chemistry* **2012**, 22 (33), 16906.
- (56) Liu, A.; Hong, Z.; Zhuang, X.; Chen, X.; Cui, Y.; Liu, Y.; Jing, X. Surface Modification of Bioactive Glass Nanoparticles and the Mechanical and Biological Properties of Poly(l-Lactide) Composites. *Acta Biomaterialia* **2008**, 4 (4), 1005–1015.

- (57) Tamjid, E.; Bagheri, R.; Vossoughi, M.; Simchi, A. Effect of Particle Size on the in Vitro Bioactivity, Hydrophilicity and Mechanical Properties of Bioactive Glass-Reinforced Polycaprolactone Composites. *Materials Science and Engineering: C* **2011**, *31* (7), 1526–1533.
- (58) Lind, M. J. Principles of Cytotoxic Chemotherapy. *Medicine* **2011**, *39* (12), 711–716.
- (59) Greenhalgh, T. A.; Symonds, R. P. Principles of Chemotherapy and Radiotherapy. *Obstetrics, Gynaecology & Reproductive Medicine* **2014**, *24* (9), 259–265.
- (60) Shiloh, R.; Krishnan, M. Radiation for Treatment of Painful Bone Metastases. *Hematology/Oncology Clinics of North America* **2018**, *32* (3), 459–468.
- (61) Bickels, J.; Dadia, S.; Lidar, Z. Surgical Management of Metastatic Bone Disease. *The Journal of Bone & Joint Surgery* **2009**, *91* (6), 1503–1516.
- (62) Harrington, K. D.; Sim, F. H.; Enis, J. E.; Johnston, J. O.; Diok, H. M.; Gristina, A. G. Methylmethacrylate as an Adjunct in Internal Fixation of Pathological Fractures. Experience with Three Hundred and Seventy-Five Cases. *The Journal of Bone & Joint Surgery* **1976**, *58* (8), 1047–1055.
- (63) Dhaliwal, J.; Seif, A.; Singh, S.; Sinha, A. Cement Augmentation of Bone Defect in Pathological Humeral Diaphyseal Fracture Treated with Retrograde Intramedullary Nail. *Ann R Coll Surg Engl* **2012**, *94* (6), 444–445.
- (64) Yazawa, Y.; Frassica, F. J.; Chao, E. Y.; Pritchard, D. J.; Sim, F. H.; Shives, T. C. Metastatic Bone Disease. A Study of the Surgical Treatment of 166 Pathologic Humeral and Femoral Fractures. *Clin. Orthop. Relat. Res.* **1990**, No. 251, 213–219.
- (65) Kumar, C. S. S. R.; Mohammad, F. Magnetic Nanomaterials for Hyperthermia-Based Therapy and Controlled Drug Delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2011**, *63* (9), 789–808.
- (66) Stauffer, P. R.; Goldberg, S. N. Introduction: Thermal Ablation Therapy. *International Journal of Hyperthermia* **2004**, *20* (7), 671–677.
- (67) Sneed, P. K.; Stauffer, P. R.; McDermott, M. W.; Diederich, C. J.; Lamborn, K. R.; Prados, M. D.; Chang, S.; Weaver, K. A.; Spry, L.; Malec, M. K.; et al. Survival Benefit of Hyperthermia in a Prospective Randomized Trial of Brachytherapy Boost ± Hyperthermia for Glioblastoma Multiforme. *International Journal of Radiation Oncology*Biography*Physics* **1998**, *40* (2), 287–295.
- (68) Beik, J.; Abed, Z.; Ghoreishi, F. S.; Hosseini-Nami, S.; Mehrzadi, S.; Shakeri-Zadeh, A.; Kamrava, S. K. Nanotechnology in Hyperthermia Cancer Therapy: From Fundamental Principles to Advanced Applications. *Journal of Controlled Release* **2016**, *235*, 205–221.

- (69) Wust, P.; Hildebrandt, B.; Sreenivasa, G.; Rau, B.; Gellermann, J.; Riess, H.; Felix, R.; Schlag, P. Hyperthermia in Combined Treatment of Cancer. *The Lancet Oncology* **2002**, 3 (8), 487–497.
- (70) Nijhawan, G.; Nijhawan, S. S.; Sethi, M. Chapter 12 - Hyperthermia Treatments. In *Noble Metal-Metal Oxide Hybrid Nanoparticles*; Mohapatra, S., Nguyen, T. A., Nguyen-Tri, P., Eds.; Micro and Nano Technologies; Woodhead Publishing, **2019**, 241–263.
- (71) Cruz, M. M.; Ferreira, L. P.; Alves, A. F.; Mendo, S. G.; Ferreira, P.; Godinho, M.; Carvalho, M. D. Chapter 19 - Nanoparticles for Magnetic Hyperthermia. In *Nanostructures for Cancer Therapy*; Ficai, A., Grumezescu, A. M., Eds.; Micro and Nano Technologies; Elsevier, **2017**, 485–511.
- (72) Adamiano, A.; Iafisco, M.; Tampieri, A. 9 - Magnetic Core-Shell Nanoparticles: Remote Driving, Hyperthermia, and Controlled Drug Release. In *Core-Shell Nanostructures for Drug Delivery and Theranostics*; Focarete, M. L., Tampieri, A., Eds.; Woodhead Publishing Series in Biomaterials; Woodhead Publishing, **2018**, 259–296.
- (73) Huang, H. S.; Hainfeld, J. F. Intravenous Magnetic Nanoparticle Cancer Hyperthermia. *Int J Nanomedicine* **2013**, 8, 2521–2532.
- (74) Maier-Hauff, K.; Rothe, R.; Scholz, R.; Gneveckow, U.; Wust, P.; Thiesen, B.; Feussner, A.; von Deimling, A.; Waldoefner, N.; Felix, R.; et al. Intracranial Thermotherapy Using Magnetic Nanoparticles Combined with External Beam Radiotherapy: Results of a Feasibility Study on Patients with Glioblastoma Multiforme. *Journal of Neuro-Oncology* **2007**, 81 (1), 53–60.
- (75) Maier-Hauff, K.; Ulrich, F.; Nestler, D.; Niehoff, H.; Wust, P.; Thiesen, B.; Orawa, H.; Budach, V.; Jordan, A. Efficacy and Safety of Intratumoral Thermotherapy Using Magnetic Iron-Oxide Nanoparticles Combined with External Beam Radiotherapy on Patients with Recurrent Glioblastoma Multiforme. *Journal of Neuro-Oncology* **2011**, 103 (2), 317–324.
- (76) Das, P.; Colombo, M.; Prosperi, D. Recent Advances in Magnetic Fluid Hyperthermia for Cancer Therapy. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2019**, 174, 42–55.
- (77) Vichery, C. Procédé de Recuit Protégé Appliqué à Des Nanoparticules d'oxyde de Fer: Étude Des Relations Structure / Propriétés Magnétiques. thesis, Palaiseau, Ecole polytechnique, **2012**.
- (78) Rosensweig, R. E. Heating Magnetic Fluid with Alternating Magnetic Field. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* **2002**, 252, 370–374.
- (79) Deatsch, A. E.; Evans, B. A. Heating Efficiency in Magnetic Nanoparticle Hyperthermia. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* **2014**, 354, 163–172.
- (80) Kallumadil, M.; Tada, M.; Nakagawa, T.; Abe, M.; Southern, P.; Pankhurst, Q. A. Suitability of Commercial Colloids for Magnetic

- Hyperthermia. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* **2009**, 321 (10), 1509–1513.
- (81) Jordan, A.; Wust, P.; Fähling, H.; John, W.; Hinz, A.; Felix, R. Inductive Heating of Ferrimagnetic Particles and Magnetic Fluids: Physical Evaluation of Their Potential for Hyperthermia. *International Journal of Hyperthermia* **2009**, 25 (7), 499–511.
- (82) Li, Z.; Kawashita, M.; Araki, N.; Mitsumori, M.; Hiraoka, M.; Doi, M. Magnetite Nanoparticles with High Heating Efficiencies for Application in the Hyperthermia of Cancer. *Materials Science and Engineering: C* **2010**, 30 (7), 990–996.
- (83) Cervadoro, A.; Giverso, C.; Pande, R.; Sarangi, S.; Preziosi, L.; Wosik, J.; Brazdeikis, A.; Decuzzi, P. Design Maps for the Hyperthermic Treatment of Tumors with Superparamagnetic Nanoparticles. *PLoS ONE* **2013**, 8 (2), e57332.
- (84) Glock, K.; Hirsch, O.; Rehak, P.; Thomas, B.; Jäger, C. Novel Opportunities for Studying the Short and Medium Range Order of Glasses by MAS NMR, ²⁹Si Double Quantum NMR and IR Spectroscopies. *Journal of Non-Crystalline Solids* **1998**, 232–234, 113–118.
- (85) Atkinson, W. J.; Brezovich, I. A.; Chakraborty, D. P. Usable Frequencies in Hyperthermia with Thermal Seeds. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering* **1984**, BME-31 (1), 70–75.
- (86) Mamiya, H. Recent Advances in Understanding Magnetic Nanoparticles in AC Magnetic Fields and Optimal Design for Targeted Hyperthermia
<https://www.hindawi.com/journals/jnm/2013/752973/> (accessed May 29, 2019).
- (87) Fortin, J.-P.; Wilhelm, C.; Servais, J.; Ménager, C.; Bacri, J.-C.; Gazeau, F. Size-Sorted Anionic Iron Oxide Nanomagnets as Colloidal Mediators for Magnetic Hyperthermia. *Journal of the American Chemical Society* **2007**, 129 (9), 2628–2635.
- (88) de la Presa, P.; Luengo, Y.; Multigner, M.; Costo, R.; Morales, M. P.; Rivero, G.; Hernando, A. Study of Heating Efficiency as a Function of Concentration, Size, and Applied Field in γ -Fe₂O₃ Nanoparticles. *The Journal of Physical Chemistry C* **2012**, 116 (48), 25602–25610.
- (89) Carrião, M. S.; Bakuzis, A. F. Mean-Field and Linear Regime Approach to Magnetic Hyperthermia of Core–Shell Nanoparticles: Can Tiny Nanostructures Fight Cancer? *Nanoscale* **2016**, 8 (15), 8363–8377.
- (90) Iacovita, C.; Florea, A.; Dudric, R.; Pall, E.; Moldovan, A. I.; Tetean, R.; Stiufiuc, R.; Lucaciu, C. M. Small versus Large Iron Oxide Magnetic Nanoparticles: Hyperthermia and Cell Uptake Properties. *Molecules* **2016**, 21 (10).
- (91) Kashevsky, B. E.; Kashevsky, S. B.; Korenkov, V. S.; Istomin, Y. P.; Terpinskaya, T. I.; Ulashchik, V. S. Magnetic Hyperthermia with Hard-

- Magnetic Nanoparticles. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* **2015**, 380, 335–340.
- (92) Liu, X. L.; Fan, H. M.; Yi, J. B.; Yang, Y.; Choo, E. S. G.; Xue, J. M.; Fan, D. D.; Ding, J. Optimization of Surface Coating on Fe₃O₄ Nanoparticles for High Performance Magnetic Hyperthermia Agents. *J. Mater. Chem.* **2012**, 22 (17), 8235–8244.
- (93) Jordan, A.; Rheinländer, T.; Waldöfner, N.; Scholz, R. Increase of the Specific Absorption Rate (SAR) by Magnetic Fractionation of Magnetic Fluids. *Journal of Nanoparticle Research* **2003**, 5 (5/6), 597–600.
- (94) Gazeau, F.; Lévy, M.; Wilhelm, C. Optimizing Magnetic Nanoparticle Design for Nanothermotherapy. *Nanomedicine* **2008**, 3 (6), 831–844.
- (95) Habib, A. H.; Ondeck, C. L.; Chaudhary, P.; Bockstaller, M. R.; McHenry, M. E. Evaluation of Iron-Cobalt/Ferrite Core-Shell Nanoparticles for Cancer Thermotherapy. *Journal of Applied Physics* **2008**, 103 (7), 07A307.
- (96) Le, A.-T.; Giang, C. D.; Tam, L. T.; Tuan, T. Q.; Phan, V. N.; Alonso, J.; Devkota, J.; Garaio, E.; García, J. Á.; Martín-Rodríguez, R.; et al. Enhanced Magnetic Anisotropy and Heating Efficiency in Multi-Functional Manganese Ferrite/Graphene Oxide Nanostructures. *Nanotechnology* **2016**, 27 (15), 155707.
- (97) Martinez-Boubeta, C.; Simeonidis, K.; Makridis, A.; Angelakeris, M.; Iglesias, O.; Guardia, P.; Cabot, A.; Yedra, L.; Estradé, S.; Peiró, F.; et al. Learning from Nature to Improve the Heat Generation of Iron-Oxide Nanoparticles for Magnetic Hyperthermia Applications. *Scientific Reports* **2013**, 3, 1652.
- (98) Guardia, P.; Di Corato, R.; Lartigue, L.; Wilhelm, C.; Espinosa, A.; Garcia-Hernandez, M.; Gazeau, F.; Manna, L.; Pellegrino, T. Water-Soluble Iron Oxide Nanocubes with High Values of Specific Absorption Rate for Cancer Cell Hyperthermia Treatment. *ACS Nano* **2012**, 6 (4), 3080–3091.
- (99) Cullity, B. D.; Graham, C. D. *Introduction to Magnetic Materials*, 2. ed.; IEEE Press: Piscataway, NJ, **2009**.
- (100) Blanco-Andujar, C.; Teran, F. J.; Ortega, D. Chapter 8 - Current Outlook and Perspectives on Nanoparticle-Mediated Magnetic Hyperthermia. In *Iron Oxide Nanoparticles for Biomedical Applications*; Mahmoudi, M., Laurent, S., Eds.; Metal Oxides; Elsevier, **2018**, 197–245.
- (101) Sadat, M. E.; Patel, R.; Sookoor, J.; Bud'ko, S. L.; Ewing, R. C.; Zhang, J.; Xu, H.; Wang, Y.; Pauletti, G. M.; Mast, D. B.; et al. Effect of Spatial Confinement on Magnetic Hyperthermia via Dipolar Interactions in Fe₃O₄ Nanoparticles for Biomedical Applications. *Materials Science and Engineering: C* **2014**, 42, 52–63.
- (102) Hugounenq, P.; Levy, M.; Alloyeau, D.; Lartigue, L.; Dubois, E.; Cabuil, V.; Ricolleau, C.; Roux, S.; Wilhelm, C.; Gazeau, F.; et al. Iron Oxide Monocrystalline Nanoflowers for Highly Efficient Magnetic

- Hyperthermia. *The Journal of Physical Chemistry C* **2012**, *116* (29), 15702–15712.
- (103) Dennis, C. L.; Jackson, A. J.; Borchers, J. A.; Hoopes, P. J.; Strawbridge, R.; Foreman, A. R.; van Lierop, J.; Grüttner, C.; Ivkov, R. Nearly Complete Regression of Tumors via Collective Behavior of Magnetic Nanoparticles in Hyperthermia. *Nanotechnology* **2009**, *20* (39), 395103.
- (104) Laurent, S.; Forge, D.; Port, M.; Roch, A.; Robic, C.; Vander Elst, L.; Muller, R. N. Magnetic Iron Oxide Nanoparticles: Synthesis, Stabilization, Vectorization, Physicochemical Characterizations, and Biological Applications. *Chemical Reviews* **2008**, *108* (6), 2064–2110.
- (105) Périgo, E. A.; Hemery, G.; Sandre, O.; Ortega, D.; Garaio, E.; Plazaola, F.; Teran, F. J. Fundamentals and Advances in Magnetic Hyperthermia. *Applied Physics Reviews* **2015**, *2* (4), 041302.
- (106) Magnetic Nanoparticles: From Fabrication to Clinical Applications <https://www.crcpress.com/Magnetic-Nanoparticles-From-Fabrication-to-Clinical-Applications/Thanh/p/book/9781439869321> (accessed Aug 27, 2019).
- (107) Shendruk, T. N.; Desautels, R. D.; Southern, B. W.; van Lierop, J. The Effect of Surface Spin Disorder on the Magnetism of $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ Nanoparticle Dispersions. *Nanotechnology* **2007**, *18* (45), 455704.
- (108) Morales, M. P.; Serna, C. J.; Bødker, F.; Mørup, S. Spin Canting Due to Structural Disorder in Maghemite. *Journal of Physics: Condensed Matter* **1997**, *9* (25), 5461–5467.

Chapitre 2 :

Paramètres de synthèse impactant les propriétés texturales, la composition et l'état d'agglomération de nanoparticules de verre bioactif binaire ($\text{SiO}_2\text{-CaO}$)

1. Introduction

Ces dernières années, l'élaboration de nanoparticules de verre bioactif a fait l'objet d'intenses recherches dans le domaine de la régénération des tissus osseux. En effet, la réduction de la taille des particules induit une augmentation de leur surface spécifique, dont la conséquence est l'amélioration de leurs propriétés bioactives et ostéogéniques.¹ Des particules de taille nanométrique permettent également une forte versatilité de mise en forme du matériau final. Par exemple, afin de mimer le plus possible la structure et les propriétés de l'os naturel, un grand intérêt existe pour l'élaboration de nanocomposites formés par dispersion de nanoparticules de verre bioactif dans une matrice polymérique.^{2,3} Cependant, l'état d'agglomération souvent très important des nanoparticules ne permet pas l'obtention de nanocomposites aux propriétés mécaniques similaires à celles de l'os.⁴ Ainsi, l'un des challenges aujourd'hui est d'élaborer des nanoparticules de verre bioactif présentant un faible état d'agglomération.

D'un autre côté, la vitesse de minéralisation du verre bioactif peut être également améliorée en réduisant la connectivité du réseau de silice *via* l'incorporation d'un modificateur de réseau comme le calcium.⁵ Cependant, l'addition du précurseur de calcium dans le milieu de synthèse doit être contrôlée afin d'éviter des effets indésirables tels qu'un important état d'agglomération,⁶ une forte polydispersité en taille,⁷ et une morphologie irrégulière⁸ des particules. Au-delà de l'importance des ions Ca^{2+} dans l'obtention d'un système bioactif, il est important de mentionner qu'ils ont un vrai intérêt biologique, car ils améliorent la prolifération et la différenciation des ostéoblastes (cellules responsables de la formation de l'os) aussi bien que la minéralisation de la matrice extracellulaire.^{9,10}

Dans ce chapitre, il sera d'une part présenté une variante du procédé sol-gel permettant d'élaborer des nanoparticules monodisperses de verre bioactif binaire ($\text{SiO}_2\text{-CaO}$). Ensuite, l'impact de plusieurs paramètres de synthèse (moment d'ajout du précurseur de calcium et de la quantité initiale de calcium) sur la morphologie, la taille, la dispersion en taille, l'état d'agglomération et la composition finale des nanoparticules bioactives sera évalué. En outre, dans le but de pouvoir contrôler la surface spécifique des nanoparticules, la concentration en hydroxyde d'ammonium a été variée, car elle est connue dans la littérature pour être le paramètre principal impactant la taille des particules obtenues par voie sol-gel.

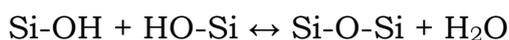
2. Synthèse de nanoparticules de verre bioactif par voie sol-gel

2.1. La méthode sol-gel

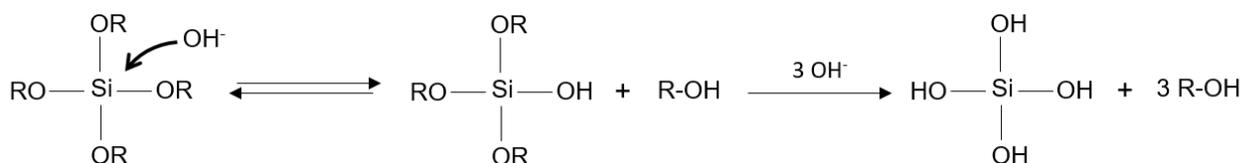
Les nanoparticules de verre bioactif ont été élaborées par modification du procédé Stöber, une variante du procédé sol-gel largement utilisée dans la littérature. Pour rappel, le procédé sol-gel est une méthode de chimie douce impliquant l'hydrolyse et la condensation d'alcoxydes (ici de silicium) à basse température et à pression atmosphérique. Typiquement, la réaction d'hydrolyse induit le remplacement des groupements alcoxydes (-OR) par des groupements hydroxydes (-OH) suivant la réaction :



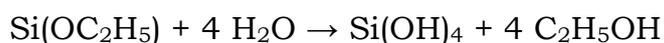
Par la suite, la condensation des groupements silanols permet la formation de ponts siloxanes (Si-O-Si) *via* les mécanismes de condensation par ololation et oxolation représentés par les réactions suivantes :



L'obtention de nanoparticules étant souhaitée, le pH du milieu doit être basique. Dans ces conditions, dites de Stöber, la réaction d'hydrolyse est déclenchée par une attaque nucléophile de l'anion OH^- (provenant de la dissociation de l'eau) sur l'atome de silicium, déplaçant ainsi le groupement -OR pour former une liaison Si-OH comme suit :



La vitesse de la condensation étant plus importante que celle d'hydrolyse, et l'attaque nucléophile sur des atomes de silicium situés en milieu de chaîne étant favorisée, le processus de polymérisation conduit à la formation de particules de silice de plus en plus larges, chargées négativement en surface. Les réactions ci-dessous résument de façon générale la formation des particules de silice:



La méthode Stöber conduit à l'obtention de particules sphériques de silice homogènes en taille. Le mécanisme de formation des particules a été

largement étudié dans la littérature, mais est toujours sujet à débat.¹¹ La théorie établie par Lamer et Dinegar a été la première à expliquer les mécanismes de nucléation et de croissance de particules en solution (cf. Figure 2.1). En effet, en dessous d'une concentration dite concentration limite de sursaturation C_N , les réactions de polycondensation entre les espèces monomères hydrolysées conduisent à la formation de germes (nuclei). Cette phase dite de « nucléation », dont la vitesse est très rapide, s'arrête lorsque la concentration en précurseur retombe en dessous d'une concentration C_0 . Une fois formés, les germes grossissent et leur taille se stabilise par diffusion ou addition des monomères à leur surface, et ce jusqu'à ce que la concentration en monomères dans le milieu atteigne celle de la solubilité de l'alcoxyde. En résumé, il est possible d'élaborer des nanoparticules homogènes en taille en découplant les phases de nucléation et de croissance des germes, c'est-à-dire en provoquant la nucléation sur une courte période puis en limitant la croissance des nuclei par diffusion, sachant qu'au cours de cette phase les particules de petite taille croissent plus rapidement que les plus larges.

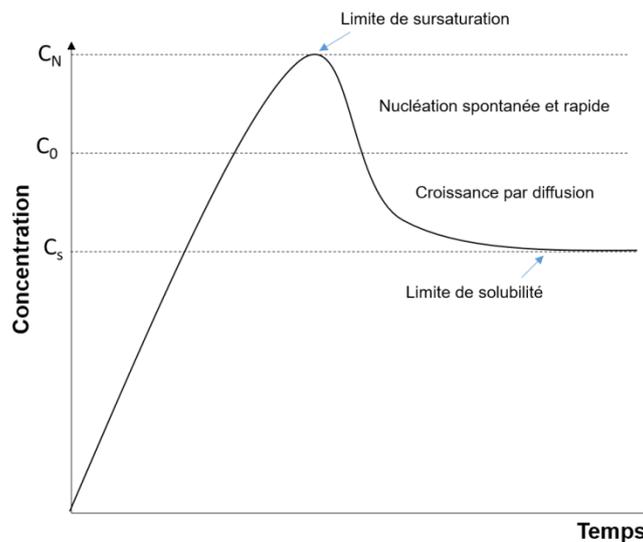


Figure 2.1 : diagramme de Lamer.

Des analyses MET effectuées par Bogush et Zukoski ont cependant révélé la présence de germes tout le long de la réaction Stöber, au contraire de ce que prédit la théorie classiquement précédemment décrite.¹² Ils ont donc proposé un nouveau modèle : tout d'abord, l'étape de nucléation génère la formation de particules primaires dont la taille est inférieure ou égale à 10 nm. Puis, l'instabilité colloïdale de celles-ci (due à une surface spécifique élevée) résulte en la formation de particules secondaires *via* leur agrégation. Il s'en suit un processus de restructuration ou d'homogénéisation de leur taille au cours duquel les particules primaires sont « consommées » par les particules secondaires (mûrissement d'Ostwald). Lorsqu'une taille critique est atteinte,

les répulsions électrostatiques dues au pH basique deviennent importantes, favorisant ainsi la très bonne dispersion des particules dans le milieu.

2.2. Choix du précurseur de calcium

La présence du calcium dans le milieu réactionnel est nécessaire dans le but d'obtenir un système bioactif. Généralement, le $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ et le CME (2-méthoxyéthanolate de calcium) sont les précurseurs de calcium utilisés à cet effet.

Le CME est un alcoxyde de calcium qui prend part aux réactions successives d'hydrolyse et de condensation induisant l'incorporation *in situ* du calcium dans le réseau silicate au cours de la réaction sol-gel.¹³ Ainsi, une distribution homogène du calcium est obtenue au sein des verres bioactifs. L'avantage principal de ce précurseur est qu'il permet l'obtention de matériaux hybrides qui ne supporterait pas de traitement post-synthèse à haute température. Cependant, le CME étant très réactif sous air, la synthèse doit s'effectuer sous atmosphère inerte (azote, argon).¹⁴ Notons également que peu d'alcoxydes de calcium sont disponibles commercialement et que le succès de la synthèse dépendra du contrôle de sa réactivité par rapport au TEOS.

Contrairement au CME, l'obtention des matériaux bioactifs par utilisation du $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ nécessite un traitement thermique à haute température. En effet, le sel de calcium additionné au cours ou après la réaction sol-gel ne s'incorpore pas directement dans le réseau vitreux, mais s'adsorbe à la surface des particules. Après le séchage, un recuit au-delà de 400°C permet la diffusion du calcium dans le réseau vitreux. Les synthèses étant plus simples à mettre en œuvre et plus facilement contrôlables lorsque le nitrate de calcium est utilisé, il a été choisi comme source de calcium au cours de ces 3 années de thèse.

2.3. Choix de la stratégie de synthèse

Dans la littérature, l'obtention de nanoparticules bioactives par modification du procédé Stöber s'effectue selon 2 principales stratégies de synthèse. La première consiste en l'ajout du sel de calcium après la formation des particules de silice. La deuxième consiste en l'ajout du sel de calcium au début des réactions d'hydrolyse et de condensation. Puis l'obtention des particules bioactives s'obtient soit par ajout du mélange dans une solution basique, soit par ajout de la base au mélange.

La Figure 2.2 schématise ces différentes stratégies de synthèse.

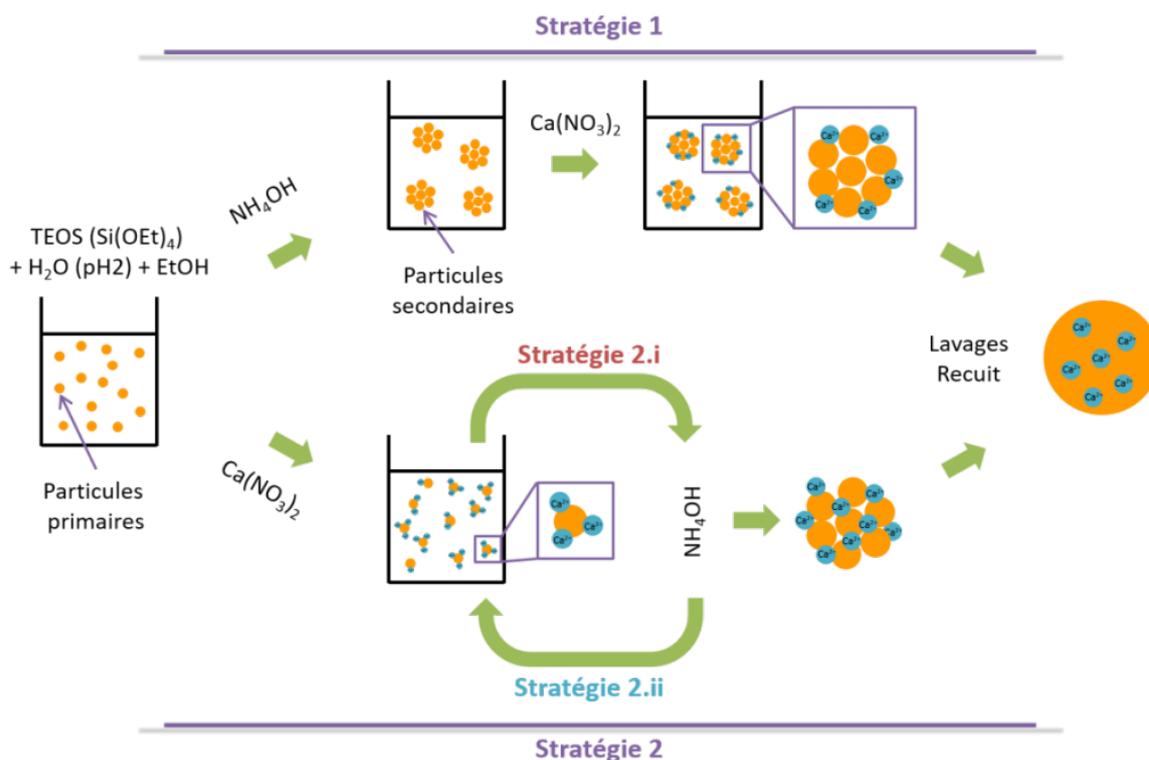


Figure 2.2 : Représentation schématique des différentes stratégies de synthèse permettant d'élaborer les nanoparticules bioactives binaires (SiO₂-CaO).¹⁵

Au vu des images issues de la littérature de particules bioactives synthétisées selon chacune des stratégies (Figure 2.3), il semble que la stratégie 1, c'est à dire l'ajout du sel de calcium après la formation des particules de silice, soit la bonne stratégie à adopter, car elle permet l'obtention de particules sphériques et non agglomérées. Par conséquent, nous avons choisi cette voie pour la synthèse de nos échantillons. Le protocole de synthèse est détaillé en Figure 2.4.

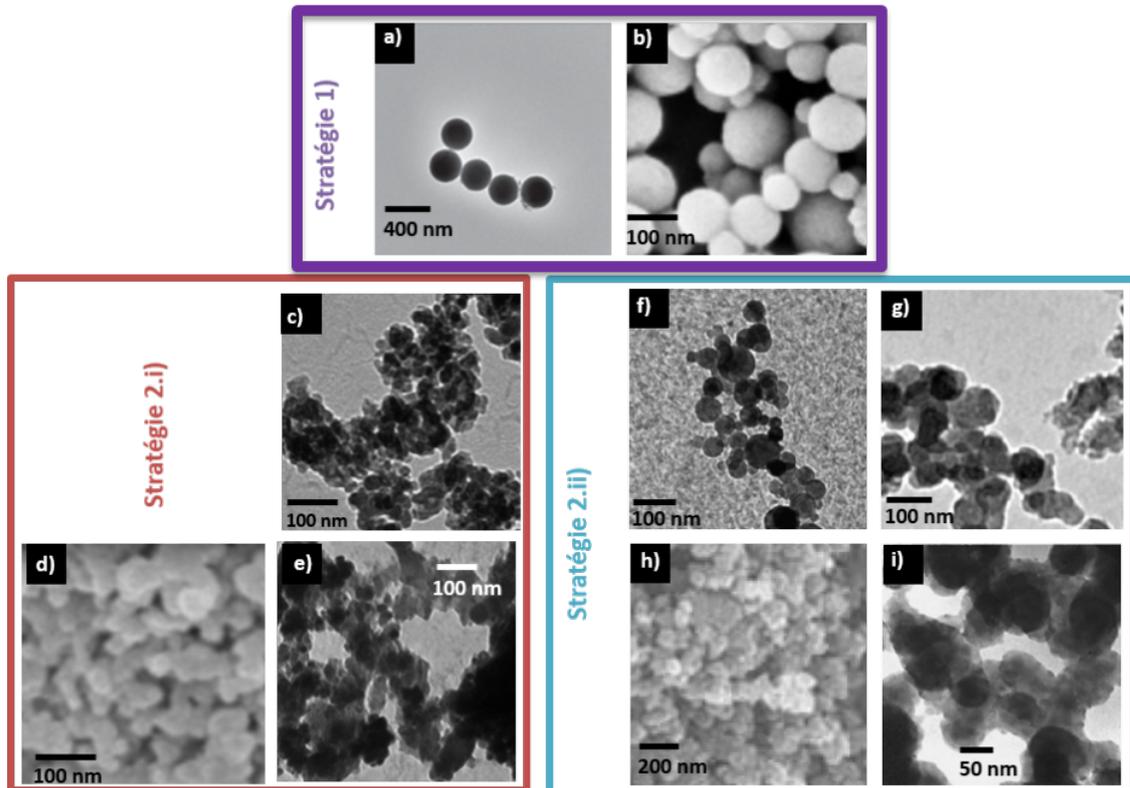


Figure 2.3 : images MET et MEB des nanoparticules de verre bioactif élaborées par différents groupes de recherche : a) Tsigkou *et al.*¹⁶, b) Lukowiak *et al.*¹⁷, c) Fan *et al.*¹⁸, d) Luz et Mano,¹⁹ e) Ajita *et al.*²⁰, f) El-kady *et al.*²¹, g) El-Kady *et al.*²², h) Delben *et al.*²³, i) Xia et Chang.²⁴

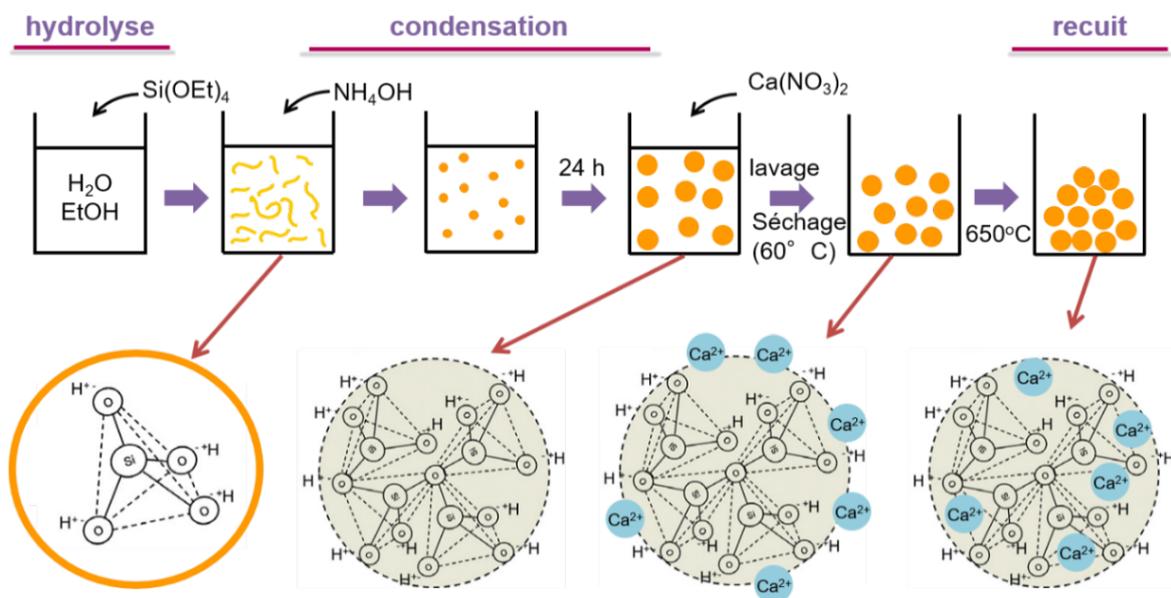


Figure 2.4 : Protocole de synthèse des nanoparticules bioactives (SiO₂-CaO).

2.4. Protocole de synthèse

Brièvement, deux solutions sont préparées séparément à température ambiante. La solution 1 est obtenue en ajoutant 2,34 mL de TEOS dans un bécher contenant 20 mL d'éthanol absolu (EtOH_{abs}) et la solution 2 en mélangeant 11,7 mL d'eau déionisée, 17,5 mL d'EtOH_{abs} et un volume V d'hydroxyde d'ammonium compris entre 0,75 et 3 mL (C = 0,14 – 0,57 M). Après avoir maintenu ces solutions sous agitation pendant 30 min, la solution 1 est versée rapidement dans la solution 2 puis la solution résultante est laissée sous agitation. Après H heures d'agitation, une certaine quantité de nitrate de calcium dissout dans 1 mL d'eau, correspondant à un ratio molaire Ca/Si compris entre 0,75 et 3,5, est ajouté au milieu puis le tout est laissé sous agitation pendant (24-H) heures. Un précipité blanchâtre est récupéré après centrifugation (6297g / 20 min) puis lavé plusieurs fois à l'éthanol et à l'eau déionisée afin d'éliminer les réactifs qui n'ont pas réagi. Le solide blanc obtenu est ensuite séché à 60°C et traité thermiquement à 650°C pendant 3h dans un four à moufle.

3. Variation des paramètres de synthèse

3.1. Variation de la concentration d'ammoniaque

L'impact de la concentration en ammoniaque a été évalué en maintenant constants tous les autres paramètres de synthèse. Le ratio Ca/Si initial a été fixé à 0,2 et le sel de calcium a été ajouté dans la solution après 24h de réaction comme indiqué sur la Figure 2.4. Puis les particules ont été récupérées et lavées.

3.1.1. Caractérisation morphologique des particules

Les images MEB mettent en évidence la morphologie, la taille et la distribution en taille des particules élaborées (Figure 2.5). La distribution de taille des particules a été déterminée en mesurant plus de 200 particules à partir des images MEB à l'aide du logiciel Image J. Le diamètre moyen et la distribution en taille ont été obtenus en ajustant l'histogramme avec une loi de distribution log-normale définie comme suit :

$$P(d) = \frac{1}{\sqrt{2\pi} d_m \sigma_d} e^{\left(-\frac{(\ln(d)-\mu)}{2 \sigma_d^2}\right)}$$

Le diamètre moyen et la largeur de distribution ont été calculés respectivement à partir des formules suivantes :

$$d_m = e^{\left(\mu + \frac{\sigma_d^2}{2}\right)} \text{ et } \sigma = \sqrt{\exp((\sigma_d^2) - 1) \cdot d_m^2}$$

On remarque que le diamètre moyen des particules augmente de 71 à 452 nm à mesure que la concentration en ammoniacque augmente (de 0,14 M à 0,57 M). Néanmoins, la dispersion en taille reste faible (entre 18 et 6%). Un autre indicateur de la dispersion en taille est l'indice de polydispersité (PDI) mesuré par diffusion dynamique de la lumière (DDL) et défini par la relation : $PDI = (\sigma/d_m)^2$ où d_m est le diamètre moyen des particules et σ , la largeur de distribution de d_m . Comme on peut le constater dans le Tableau 2.1, les valeurs de PDI sont comprises entre 0 et 0,1, un intervalle qui caractérise des systèmes de très faible polydispersité en taille.²⁵ Par ailleurs, les diamètres moyens mesurés par DDL (de 87 à 485 nm) sont légèrement plus élevés que ceux obtenus par MEB. Ceci est tout à fait cohérent, car la DDL donne accès au diamètre hydrodynamique des particules (taille de la particule et de sa couche d'hydratation).

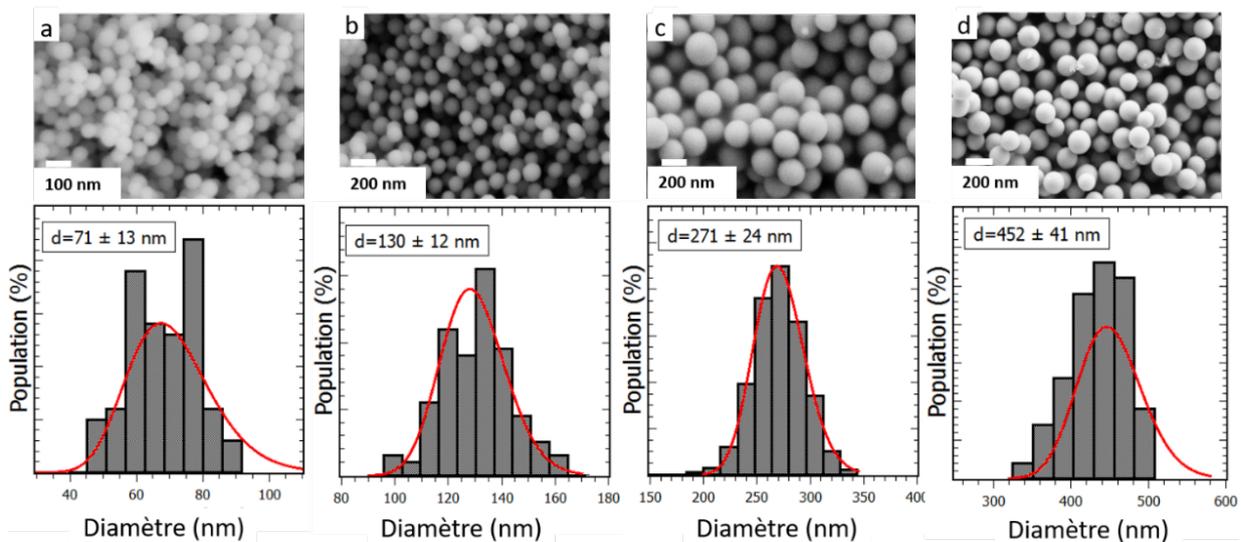


Figure 2.5 : images MEB et histogrammes de taille des nanoparticules de verre bioactif obtenues avec différentes concentrations de NH_4OH : a) 0,14 M, b) 0,21 M, c) 0,33 M et d) 0,57 M.

L'évolution de la taille en fonction de la concentration en ammoniacque peut être expliquée par le mécanisme de formation des particules de silice. En milieu basique, les réactions d'hydrolyse et de polycondensation du TEOS conduisent à la formation de particules primaires qui s'agrègent pour former les particules secondaires. Puis le mûrissement d'Oswald induit une homogénéisation de leur taille.²⁶ En outre, dû à un pH fortement basique induit par la présence de NH_4OH (au-delà du point isoélectrique de l'acide silicique), les particules de silice fraîchement formées restent bien dispersées et sont très stables grâce à leur potentiel de surface négatif.¹¹ En

conséquence, augmenter la concentration de NH_4OH favorise la formation de particules primaires larges, ce qui induit l'obtention de particules de silice secondaires de plus en plus larges, très stables en milieu aqueux. La charge négative de surface des particules bioactives finales a été vérifiée *via* la mesure de leur potentiel zêta afin de s'assurer de leur bonne dispersibilité en solution (Tableau 2.2).

Échantillons	TEM		DDL		Surface spécifique (m^2/g)	
	d_m (nm)	Dispersion en taille	d_m (nm)	PDI	S_{BET}	S_{th}
C = 0,14 M	71 ± 1	18%	87	0,1	45	39
C = 0,21 M	130 ± 12	9%	145	0,042	21	21
C = 0,33 M	271 ± 24	9%	276	0,084	11	10
C = 0,57 M	452 ± 41	9%	485	0,035	7	6

Tableau 2.1 : Diamètres, dispersions en taille et surfaces spécifiques des nanoparticules bioactives synthétisées avec différentes concentrations de NH_4OH .

Les différentes tailles obtenues sont en accord avec les résultats de Greasley *et al.*²⁷ et ce, bien que leur protocole de synthèse diffère après l'étape de la formation des particules de silice. Cela souligne le fait que la taille des particules bioactives est déterminée durant la première étape de synthèse (formation des particules de silice), quelle que soit la manière dont les ions Ca^{2+} sont incorporés dans la matrice vitreuse par la suite.

Concentration en NH_4OH (M)	Potentiel zêta (mV)
0,14	-14 ± 4
0,21	-18 ± 4
0,33	-20 ± 5
0,57	-14 ± 4

Tableau 2.2 : Potentiel zêta des nanoparticules bioactives obtenues à différentes concentrations de NH_4OH .

3.1.2. Détermination de la surface spécifique et état d'agglomération des particules

La surface spécifique des nanoparticules bioactives a été évaluée par adsorption d'azote à basse température. Les valeurs ont été calculées en appliquant l'équation de Brunauer-Emmett-Teller (BET) sur l'isotherme d'adsorption. Ce paramètre physique impacte la vitesse de dissolution des verres bioactifs, donc leur bioactivité, car il caractérise la surface active du verre qui interagit directement avec le milieu environnant (milieu physiologique).²⁸ Les isothermes d'adsorption-désorption des particules obtenues sont de type III (Figure 2.6), caractéristiques de matériaux non poreux selon la classification IUPAC. La surface BET (S_{BET}) décroît de 45 à 7 m²/g à mesure que la taille des particules bioactives croît (Tableau 2.1). Ces valeurs sont supérieures à celles des particules de bioverre 45S5 de taille micrométrique (0,15 – 2,7 m²/g)²⁹ élaborées par fusion et sont en accord avec d'autres valeurs de surface spécifique reportées dans la littérature pour des nanoparticules de verre bioactif obtenues par le procédé sol-gel.^{17,30}

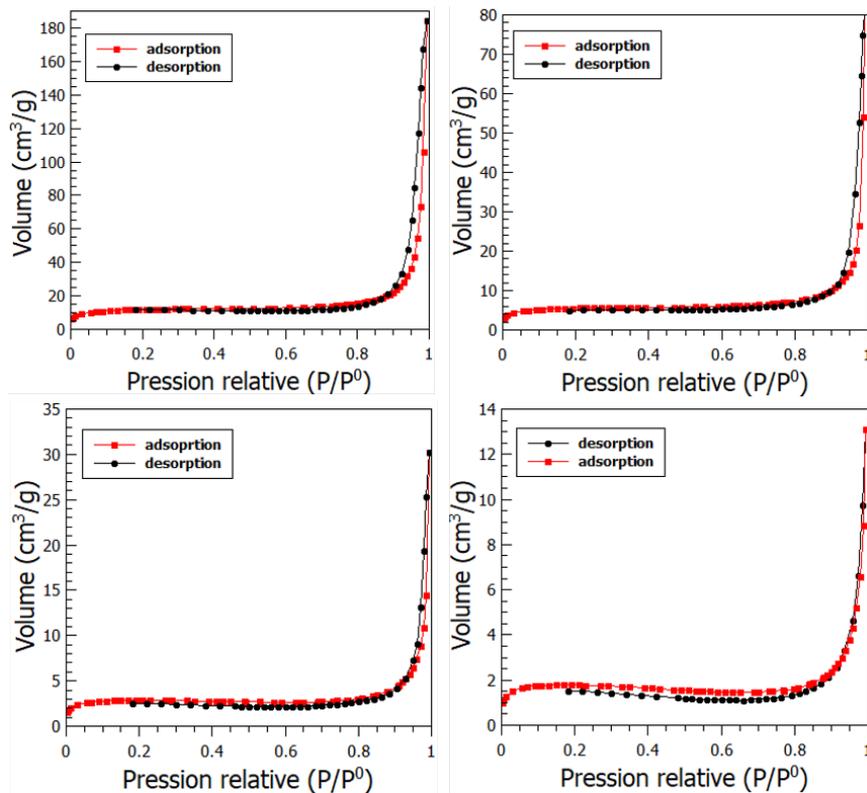


Figure 2.6 : isothermes d'adsorption-désorption des nanoparticules bioactives obtenues à différentes concentrations de NH_4OH : a) 0,14 M, b) 0,21 M, c) 0,33 M et d) 0,57 M.

En utilisant l'histogramme de taille des particules établi à partir des images MEB, il est possible d'évaluer la surface spécifique théorique (S_{th}) des particules bioactives. En effet, sachant que chaque barre constituant l'histogramme correspond à un nombre précis de particules avec un certain diamètre moyen, la surface spécifique associée à l'ensemble des barres (S_{th}) s'exprime selon la relation suivante :

$$S_{th} = \sum_{i=1}^j \frac{x_i}{y} S_i$$

Où i représente la barre considérée, x le nombre de particules associées à la barre i , y le nombre total de particules dénombrées et S la surface spécifique des particules de la barre i .

À titre illustratif, le Tableau 2.3 dressé à partir de l'histogramme de taille des nanoparticules obtenue avec une concentration d'ammoniaque de 0,57 M permet de montrer que :

$$S_{th} = \left(\frac{3}{332}\right)S_1 + \left(\frac{12}{332}\right)S_2 + \dots + \left(\frac{2}{332}\right)S_9$$

$$S_{th} = 11 \text{ m}^2/\text{g}$$

Pour les calculs, la densité a été considérée égale à 2,2 g/cm³. Cette valeur est légèrement supérieure à celle de particules de silice pures élaborées par le procédé Stöber,³¹ car les particules bioactives sont denses, non poreuses et contiennent du calcium, un élément chimique plus lourd que le silicium. On peut voir dans le Tableau 2.1 que S_{BET} et S_{th} sont quasi identiques ce qui prouve bien que les nanoparticules sont denses et non agglomérées.

Barre	d_m (cm)	Nombre de particule	Surface (cm ²)	Volume (cm ³)	Densité	Nombre de particules dans 1g	Surface spécifique (S_{Barre} m ² /g)
1	2,08E-07	3	1,36E-13	4,71E-15	2,2	9,65E+13	1,31E+01
2	2,24E-07	12	1,58E-13	5,88E-15	2,2	7,73E+13	1,22E+01
3	2,40E-07	39	1,81E-13	7,23E-15	2,2	6,28E+13	1,14E+01
4	2,56E-07	76	2,06E-13	8,78E-15	2,2	5,18E+13	1,07E+01
5	2,72E-07	90	2,32E-13	1,05E-14	2,2	4,32E+13	1,00E+01
6	2,88E-07	66	2,60E-13	1,25E-14	2,2	3,64E+13	9,47E+00
7	3,04E-07	34	2,90E-13	1,47E-14	2,2	3,09E+13	8,97E+00
8	3,20E-07	10	3,22E-13	1,71E-14	2,2	2,65E+13	8,52E+00
9	3,36E-07	2	3,54E-13	1,99E-14	2,2	2,29E+13	8,12E+00
		Total = 332					

Tableau 2.3 : détails du calcul de la surface spécifique théorique des nanoparticules bioactives obtenues avec une concentration d'ammoniaque $C = 0,57$ M.

Cette information est d'autant plus importante qu'il a été reporté dans la littérature que la présence des ions Ca^{2+} à la surface de particules de silice change leur chimie de surface induisant généralement leur agglomération.³² Ici, l'ajout du sel de calcium se faisant 24h après le début du procédé sol-gel, les particules de silice préformées sont très bien dispersées dans le milieu réactionnel, si bien que l'impact de l'ajout du calcium en solution sur leur état d'agglomération semble négligeable.

Par ailleurs, il est important de mentionner qu'en dessous d'une concentration en ammoniacque de 0,14 M, les particules bioactives élaborées étaient très agglomérées, sans doute à cause d'une trop faible répulsion électrostatique (pH pas assez basique).

3.1.3. Caractérisation structurale des particules

Après les étapes de lavages, seuls les ions Ca^{2+} liés électrostatiquement aux groupements O^- présents à la surface des particules de silice restent adsorbés et s'incorporent dans le réseau silicate lors du recuit à 650°C . Comme il a été précisé dans la littérature, une telle température n'est pas nécessaire pour favoriser la diffusion des ions Ca^{2+} mais l'est pour éliminer les ions nitrates potentiellement présents en surface.³³

La Figure 2.7 montre les diffractogrammes des particules bioactives élaborées avec différentes concentrations en ammoniacque. Aucun pic de diffraction n'est observé, confirmant leur nature amorphe.

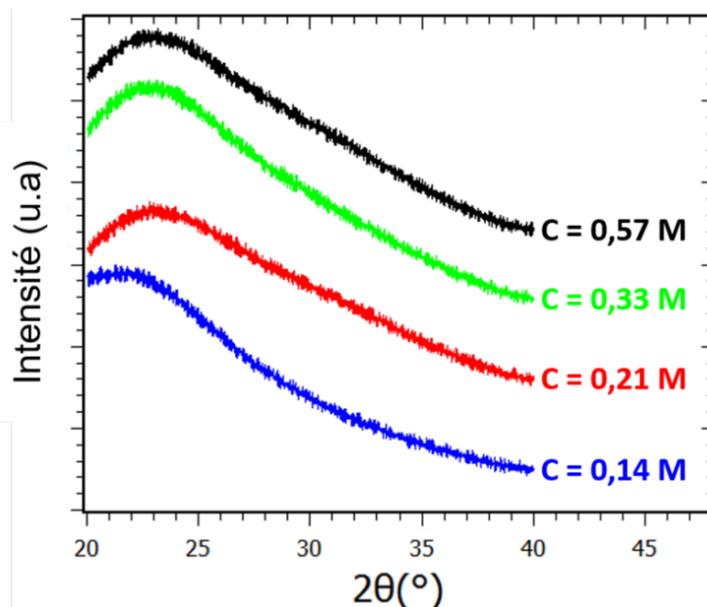


Figure 2.7 : diffractogrammes des nanoparticules bioactives élaborées avec différentes concentrations de NH_4OH .

En résumé, nous avons montré que la concentration d'hydroxyde d'ammonium influence considérablement la taille des nanoparticules de verre bioactif. En effet, une légère augmentation de cette concentration génère une augmentation significative de leur taille tout en maintenant une morphologie sphérique et une faible dispersion en taille. Des particules de taille très petites (70 nm) ont notamment pu être élaborées par ce procédé Stöber modifié. Cependant, la concentration en ammoniacque doit être maintenue au-dessus d'une valeur critique afin d'éviter la réduction de l'épaisseur de la double couche électrique des particules de silice qui peut favoriser le phénomène d'agglomération.³⁴

3.2. Variation du moment d'ajout du précurseur de calcium

L'impact du moment d'ajout du nitrate de calcium a été étudié en gardant tous les autres paramètres constants. La concentration de NH_4OH et le ratio Ca/Si initial ont été fixés respectivement à 0,21 M et 0,2. L'addition de CaNO_3 a été effectuée entre $H = 30 \text{ min}$ et 6h après le début de la réaction sol-gel (Figure 2.8). Dans la suite, les échantillons seront nommés nVB+30min, nVB+1h... nVB+6h.

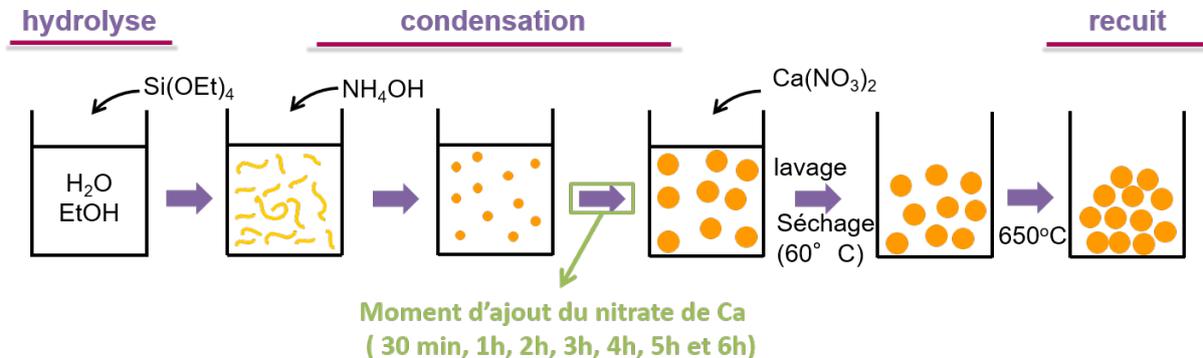


Figure 2.8 : schéma représentatif du protocole de synthèse montrant la variation du moment d'ajout du sel de calcium.

3.2.1. Caractérisation morphologique et état d'agglomération des particules

Les images des nanoparticules bioactives obtenues respectivement à $H = 30 \text{ min}$ (nVB+30min) et à $H = 1 \text{ h}$ (nVB+1h) (Figure 2.9) ont été réalisées par microscopie électronique en transmission (MET, modèle Hitachi H-7650 fonctionnant à 80 kV). On observe que les nanoparticules nVB+30min ont une morphologie irrégulière et sont fortement agglomérées. Par contre, les

nanoparticules nVB+1h présentent une morphologie sphérique, mais demeurent agglomérées.

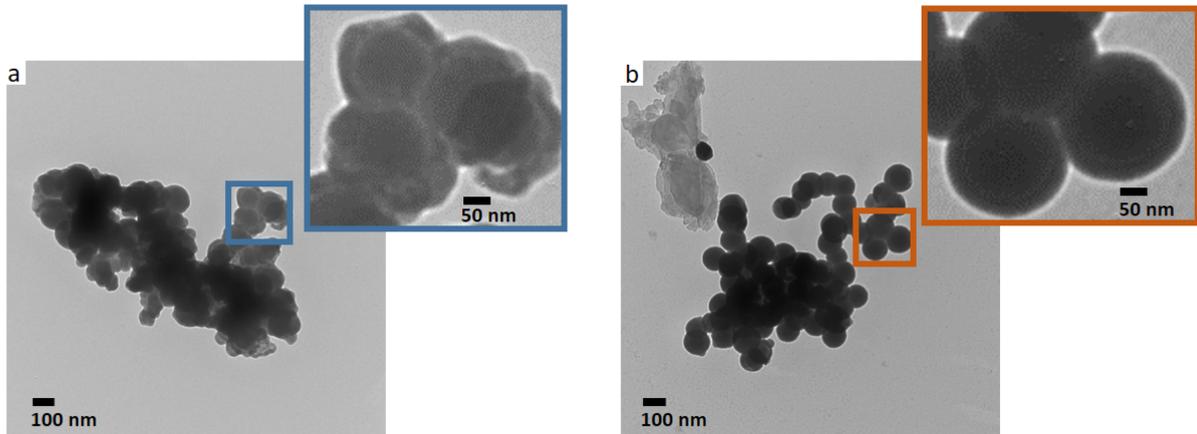


Figure 2.9 : images MET de a) nVB+30min et b) nVB+1h.

La Figure 2.10 montre les images MEB des nanoparticules nVB+2h, nVB+3h, nVB+4h, nVB+5h et nVB+6h. Toutes sont non agglomérées et présentent une morphologie sphérique. Le diamètre moyen et la distribution de taille des particules évalués par ajustement des histogrammes de taille à l'aide d'une fonction log-normale sont respectivement de 154 ± 18 nm, 158 ± 13 nm, 150 ± 15 nm, 184 ± 22 nm et 173 ± 19 nm. On remarque également qu'elles sont toutes monodisperses en taille (déviations standard autour de 11 %) et que le moment d'ajout du sel de calcium (pour $H \geq 2h$) ne semble pas avoir d'impact sur le diamètre des particules.

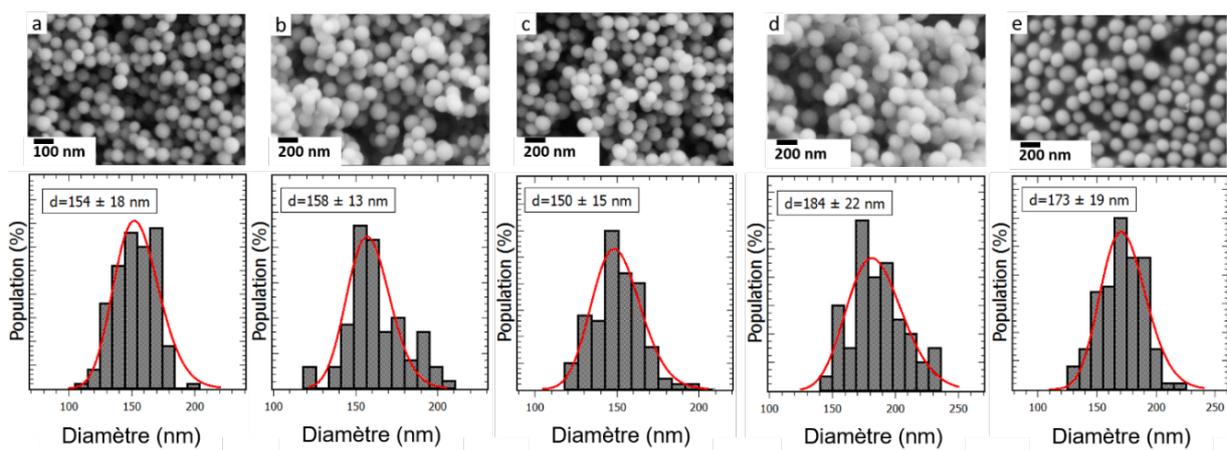


Figure 2.10 : images MEB et histogrammes de taille des nanoparticules de verre bioactif obtenues pour différents moments d'ajout de sel de calcium a) nVB+2h, b) nVB+3h, c) nVB+4h, d) nVB+5h, e) nVB+6h.

Il est bien connu que l'addition d'un électrolyte dans la solution en cours de synthèse sol-gel peut influencer la structure finale des particules obtenues, car elle impacte leur stabilité colloïdale.³⁴ 30 min après le début des réactions d'hydrolyse et de condensation du TEOS, les particules de silice sont encore très petites et donc très réactives. Lorsque le sel de calcium est ajouté, les ions Ca^{2+} sont rapidement adsorbés en surface et jouent le rôle d'agents pontants entre les particules de silice. Les nanoparticules nVB+30min (voir l'encadré Figure 2.10a) sont par conséquent fortement agglomérées. Ce résultat est en parfait accord avec celui de Zheng *et al.*³⁵

Dans le cas de nVB+1h, les particules de silice sont un peu moins réactives, les nanoparticules bioactives résultantes sont donc un peu moins agrégées. On peut également noter qu'elles présentent une morphologie sphérique uniforme (voir l'encadré Figure 2.10b), signe que les réactions d'hydrolyse et de condensation sont terminées. Au-delà d'1h, la stabilité colloïdale des particules de silice est assez bonne pour qu'elle ne soit plus impactée par les interactions électrostatiques attractives induites par l'addition du sel de calcium. Ainsi, les nanoparticules bioactives résultantes sont non agglomérées, présentent une morphologie sphérique uniforme et sont monodisperses en taille.

Dans l'étude de Zheng *et al.*³⁵ le moment d'ajout du sel de calcium à partir duquel il est possible d'obtenir des particules non agglomérées a été estimé à $H = 30$ min. Cette différence avec notre étude pourrait être expliquée par des conditions de synthèse différentes, à savoir un ratio Ca/Si initial et une concentration d'ammoniaque plus importante (Ca/Si = 0,614, C = 1 mol.L⁻¹).

La variation du moment d'ajout du sel de calcium n'a que peu d'impact sur la taille des nanoparticules de verres bioactifs, mais influence fortement leur morphologie et leur état d'agglomération. Une addition précoce du sel de calcium dans le milieu réactionnel déstabilise irréversiblement la stabilité colloïdale des particules de silice à cause des fortes interactions électrostatiques attractives entre leur surface chargée négativement et les ions Ca^{2+} , résultant en leur agglomération. Le précurseur de calcium doit par conséquent être ajouté au moins 2h après le début du procédé sol-gel.

3.2.2. Caractérisation structurale des particules

Toutes les nanoparticules bioactives élaborées sont amorphes comme on peut l'observer sur la Figure 2.11.

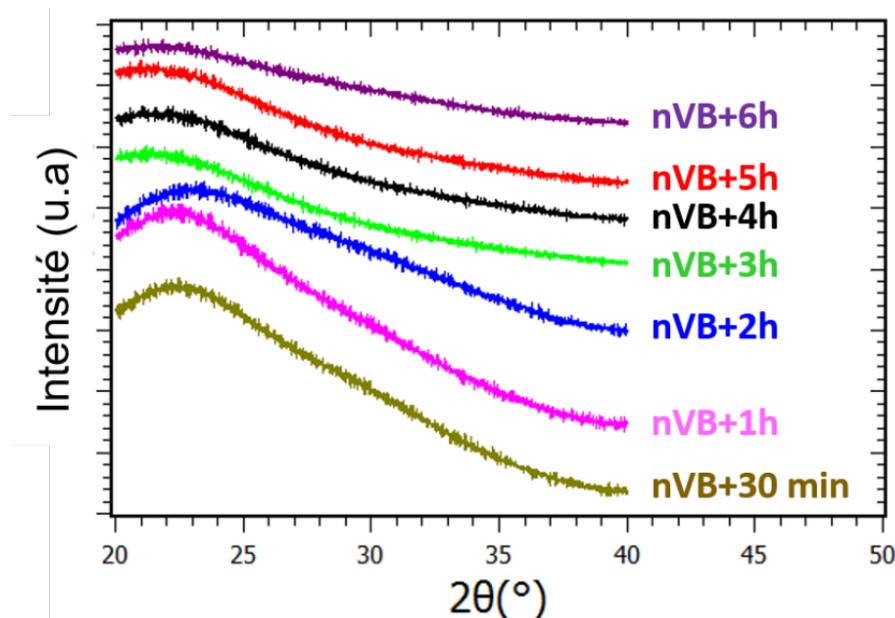


Figure 2.11 : diffractogrammes des nanoparticules bioactives obtenues pour différents moments d'ajout du sel de calcium.

3.2.3. Détermination de la composition des particules

La composition des différentes nanoparticules bioactives synthétisées a été analysée par Spectroscopie X en Dispersion d'Énergie (EDS) afin de mettre en lumière l'influence du moment d'ajout du sel de calcium sur la quantité de calcium effectivement insérée dans la matrice de silice. Avant d'effectuer les mesures, une calibration de l'instrument a été effectuée en analysant la composition de plusieurs poudres céramiques dont les teneurs en Ca et Si étaient connues. Les valeurs expérimentales du ratio atomique Ca/Si ont été calculées en divisant le pourcentage atomique du calcium mesuré par celui du silicium. Les barres d'erreurs sur les valeurs correspondantes ont été obtenues selon la relation :

$$\Delta(\text{Ca/Si}) = \text{Ca/Si} \cdot \left[\frac{\Delta\text{Ca}}{\text{Ca}} + \frac{\Delta\text{Si}}{\text{Si}} \right]$$

où ΔCa et ΔSi sont les erreurs absolues respectives des pourcentages atomiques de Ca et Si. Les résultats obtenus sont présentés en Figure 2.12.

Lorsque le sel de calcium est ajouté tôt dans le milieu réactionnel, c'est-à-dire à $H = 30 \text{ min}$ et $H = 1 \text{ h}$, respectivement 100% et 90% de la quantité initiale a été incorporée. À $H = 2 \text{ h}$ et $H = 3 \text{ h}$, une réduction de cette quantité peut être observée (37% d'insertion) et une baisse significative peut être observée à $H = 4 \text{ h}$, 5 h et 6 h (jusqu'à 16% d'insertion).

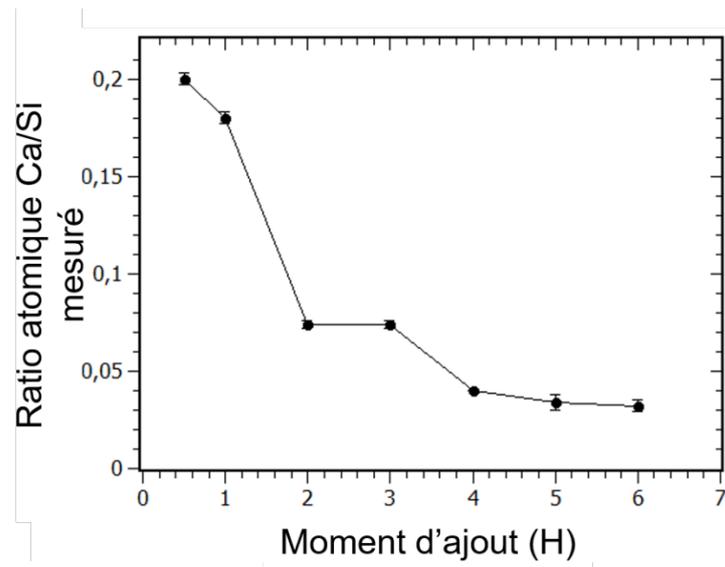


Figure 2.9 : évolution du ratio Ca/Si mesuré par EDS en fonction du moment d'ajout H du sel de calcium (ratio Ca/Si initial de 0,2).

Une telle déviation entre la composition nominale et la composition effective des nanoparticules bioactives a déjà été reportée dans la littérature. La cause principale est la phase de lavage post-synthèse, qui élimine les ions calciums qui ne sont pas adsorbés en surface des particules de silice. Cependant cette étape de lavage est obligatoire à cause de la présence dans le milieu réactionnel de contre-ions et de réactifs résiduels qui peuvent, lors de l'étape de séchage, former des impuretés ou favoriser l'agglomération des particules.¹⁶ La quantité de calcium insérée étant liée à celle de calcium adsorbée à la surface des particules, l'étape de lavage n'est pas directement la cause de la déviation en composition. Il faut plutôt se pencher sur la réactivité de surface des particules de silice au moment de l'ajout des ions calcium.

La réactivité des particules de silice est étroitement liée à leur surface qui est recouverte de groupements silanols.¹¹ Le pH de la solution étant supérieur au point isoélectrique de l'acide silicique (pH = 2,2), les groupements silanols sont déprotonnés, induisant ainsi une charge négative de surface comme mentionné auparavant. Il est donc évident que la proportion de groupements silanols se trouvant en surface des particules de silice lorsque le nitrate de calcium est ajouté dans le milieu réactionnel influence fortement la composition réelle des nanoparticules bioactives. En effet, à H = 30 min et H = 1h, les réactions d'hydrolyse et de condensation étant toujours en cours, un maximum de sites actifs (groupements Si-O⁻) est disponible afin de créer des interactions électrostatiques attractives fortes avec les ions Ca²⁺. Ainsi, tout (ou presque tout) le calcium ajouté est adsorbé à la surface des particules de silice, conduisant à une insertion quasi-totale des ions Ca²⁺

dans la matrice vitreuse après les étapes de lavage et de calcination. Au fil de la réaction, la densité de charges négatives en surface diminue, notamment à cause du mûrissement d'Oswald qui favorise la formation de particules de silice plus grandes. Par conséquent, le nombre de sites actifs disponibles pour interagir avec les ions Ca^{2+} est réduit, résultant en un gap entre la composition nominale et effective des nanoparticules bioactives tel qu'observé pour les échantillons obtenus à $H = 2\text{h}, 3\text{h}, 4\text{h}, 5\text{h}$ et 6h .

Ces résultats sont en parfait accord avec ceux de Zheng *et al.*³⁵ qui ont montré pour la première fois que le moment d'ajout du précurseur de calcium a un impact considérable sur la composition finale des particules de verre bioactif. Dans leur étude, le ratio Ca/Si initial et le ratio Ca/Si effectif des échantillons étaient respectivement de 0,614 et 0,1, soit 16% d'incorporation de calcium à $H = 30\text{ min}$, et 0,03, soit 5% d'incorporation de calcium à $H = 1\text{h}$ après le début de la réaction sol-gel. Dans l'idée de maximiser la teneur en calcium, Kozon *et al.*³⁶ et El-Rashidy *et al.*³⁷ ont également élaboré des nanoparticules de verre bioactif monodisperses en taille selon une modification du procédé Stöber en ajoutant le sel de calcium dans la solution de synthèse à $H = 30\text{ min}$. Pour ces deux études, le ratio initial était respectivement de 0,4 et 1 menant à une composition effective respectivement de 0,03 (7,5% d'insertion) et 0,07 (7% d'insertion).

En comparaison avec nos résultats, on remarque que la quantité de calcium insérée pour ces 3 études est bien inférieure (Figure 2.13). Cette différence peut être expliquée par l'utilisation d'une concentration élevée en NH_4OH (1 mol.L^{-1}) qui résulte en l'obtention de particules de plus grand diamètre (environ 400 nm), donc avec un rapport surface/volume plus faible.

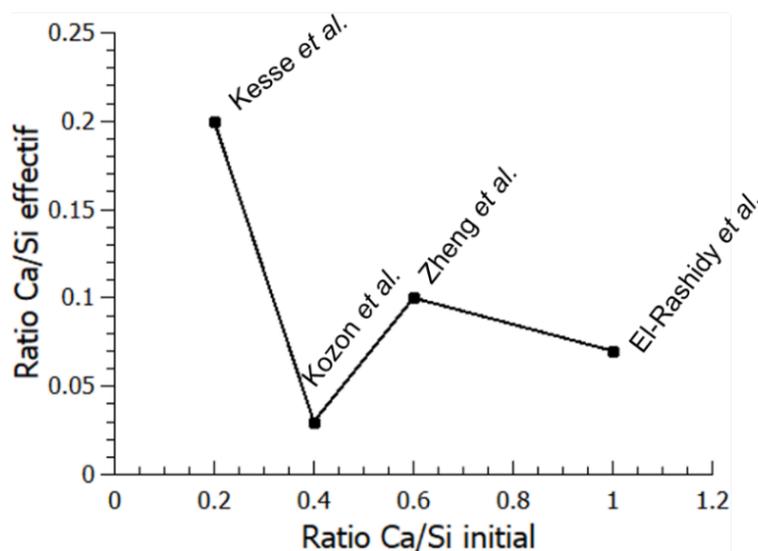


Figure 2.10 : ratio Ca/Si effectif en fonction du ratio Ca/Si initial lorsque $H = 30\text{ min}$: comparaison avec 3 études de la littérature.

Il est intéressant de mentionner que l'on peut adapter le protocole de synthèse en fonction de l'application envisagée. Si les particules doivent être utilisées en tant que ciment osseux (fabrication d'une pâte par mélange des nanoparticules bioactives avec le sang du patient, qui pourra être pressée dans le défaut osseux), le fait que les particules soient un peu agglomérées n'est pas nécessairement un inconvénient. Dans ce cas, un ajout précoce du sel de calcium dans la solution favorisera l'obtention d'un matériau hautement bioactif grâce à une très forte teneur en calcium. Par contre, si des nanoparticules de verre bioactif avec une forme sphérique homogène, une faible distribution en taille et une très bonne dispersibilité sont souhaitées (pour l'élaboration de nanocomposites bioactifs par dispersion des nanoparticules dans une matrice polymérique par exemple), nVB+2h ou nVB+3h seront les meilleures options.

3.3. Variation du ratio Ca/Si initial

Dans la section précédente, nous avons montré que des nanoparticules bioactives sphériques monodisperses en taille et non agglomérées, avec une teneur en calcium importante pouvaient être synthétisées en ajoutant le sel de calcium dans le milieu réactionnel 2h ou 3h après le début de la réaction sol-gel. Un autre paramètre, le ratio initial entre le calcium et le silicium (Ca/Si) pourrait également impacter la composition finale et les propriétés physiques des nanoparticules bioactives. Il a donc été varié entre 0,2 et 3,5 dans une série de synthèses, tandis que les autres paramètres ont été maintenus constants. La concentration de NH_4OH a été fixée à 0,21 M ($V = 1,12 \text{ mL}$) et le sel de calcium a été ajouté 3h après le début de la réaction sol-gel. Le protocole de synthèse est présenté en Figure 2.14.

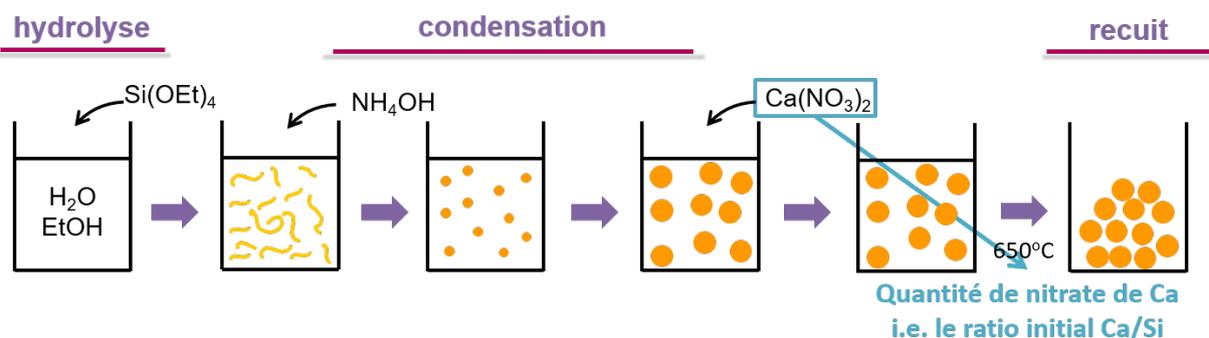


Figure 2.11 : Schéma représentatif du protocole de synthèse montrant la variation de la quantité initiale du nitrate de calcium.

3.3.1. Caractérisation morphologique et état d'agglomération des particules

Les particules obtenues sont toutes non agglomérées avec un diamètre moyen autour de 180 nm et une déviation standard de 10% (cf. Figure 2.15). Ceci prouve que la quantité initiale de calcium n'impacte ni la taille des particules ni leur dispersion en taille.

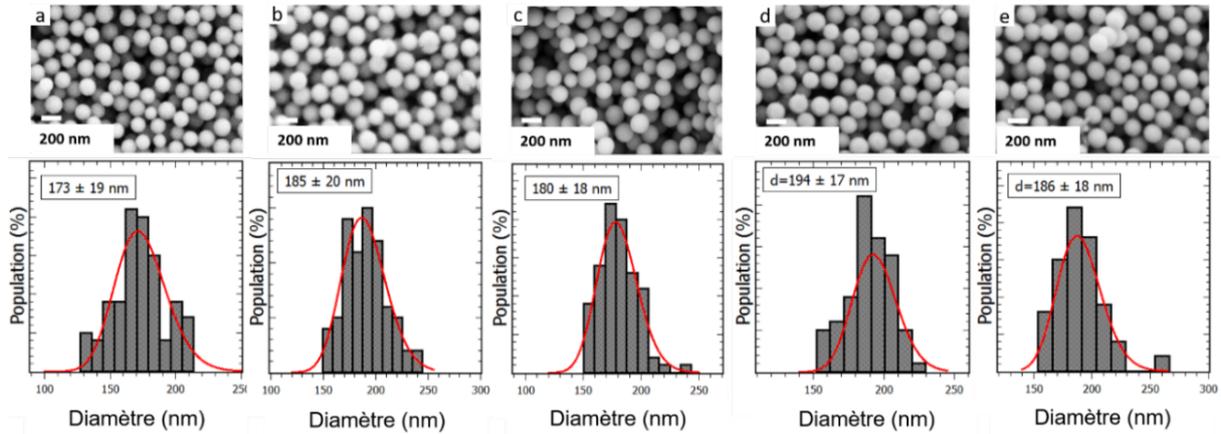


Figure 2.12 : images MEB et histogrammes de taille des nanoparticules de verre bioactif synthétisées avec différents ratio Ca/Si initiaux: a) 0,75, b) 1,3, c) 2, d) 2,6 et e) 3,5.

3.3.2. Caractérisation structurale des particules

Comme observé dans les cas précédents, les diffractogrammes correspondants aux différents échantillons synthétisés ne présentent aucun pic de diffraction, preuve que les particules sont bien amorphes (Figure 2.16).

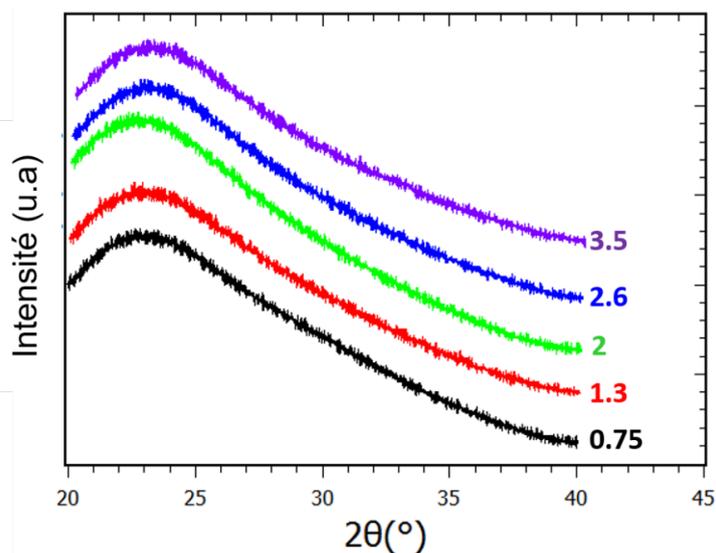


Figure 2.16 : diffractogrammes des nanoparticules bioactives obtenues pour différents ratio Ca/Si initiaux.

3.3.3. Détermination de la composition des particules

L'analyse de la composition par EDS montre que la quantité de calcium insérée dans les nanoparticules bioactives augmente avec le ratio Ca/Si initial jusqu'à atteindre un plateau pour $(\text{Ca/Si})_{\text{initial}} = 2$ (Ca/Si effectif = 0,1) (Figure 2.17). Cette saturation peut être expliquée par le nombre limité de groupements Si-O⁻ disponibles à la surface des particules de silice pour l'adsorption des ions Ca²⁺. Aucune augmentation supplémentaire n'est observée au-delà de cette valeur due à l'étape de lavage qui retire tous les ions Ca²⁺ non adsorbés. Cependant, il importe de mentionner que pour un tel ratio, seulement 5% des ions calcium ont été insérés dans les particules de silice, ce qui est loin d'être efficace et rentable. En comparaison avec l'étude de Greasley *et al.*²⁷ la quantité de calcium insérée est ici beaucoup plus élevée malgré le fait que les nanoparticules synthétisées dans leur cas soient plus petites (100 nm) et donc avec une plus grande surface spécifique. Leur méthode, consistant à effectuer le lavage des particules après recuit, ne paraît donc pas la plus adaptée pour maximiser l'incorporation du calcium.

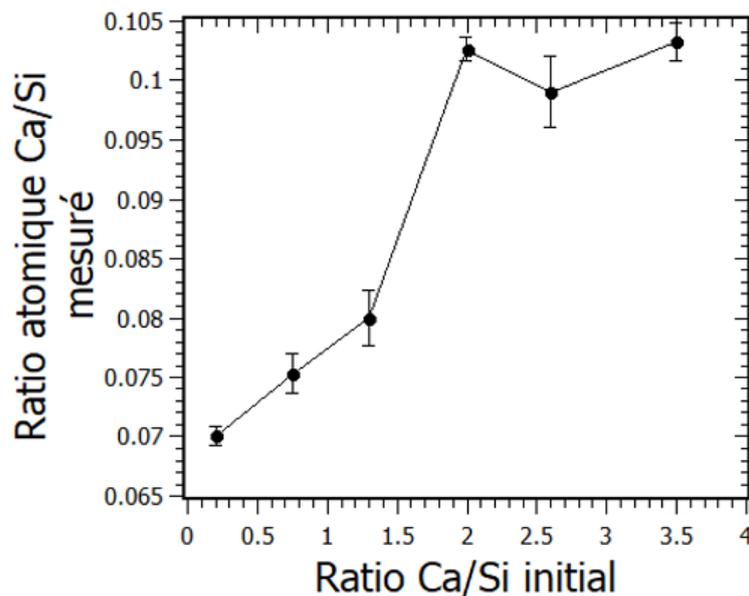


Figure 2.17 : évolution du ratio Ca/Si mesuré en fonction du ratio Ca/Si initial.

4. Conclusion

Dans cette étude, des nanoparticules de verre bioactif binaire ($\text{SiO}_2\text{-CaO}$) monodisperses en taille ont été élaborées par un procédé Stöber modifié. L'influence des paramètres de synthèse, à savoir la concentration d'ammoniaque, le moment d'ajout du nitrate de calcium et sa quantité (ratio Ca/Si initial) sur la morphologie, la taille, la dispersion en taille, l'état d'agglomération et la composition des particules a été étudié.

Les résultats ont montré qu'une augmentation de la concentration d'ammoniaque induit une augmentation de la taille des nanoparticules de verre bioactif alors que l'ajout de nitrate de calcium, quelle qu'en soit la quantité, à un temps $H \geq 2\text{h}$ après le début de la réaction sol-gel n'a aucune influence sur celle-ci. Toutes les nanoparticules élaborées sont monodisperses en taille et non agglomérées à l'exception de celles obtenues en ajoutant le sel de calcium à $H \leq 1\text{h}$ après le début de la réaction sol-gel.

Au regard de la composition des particules, les résultats ont montré que le moment d'ajout H du sel de calcium et le ratio Ca/Si initial ont un impact considérable. En effet, les échantillons obtenus à $H \leq 1\text{h}$ présentent une teneur en calcium quasi maximale, mais sont fortement agglomérés. Cependant pour $H > 1\text{h}$, la quantité de calcium insérée dans la matrice de silice diminue considérablement. Il apparaît alors que le moment d'ajout optimal permettant l'obtention de nanoparticules non agglomérées avec une quantité de calcium inséré raisonnable est 2-3h après le début de la réaction sol-gel.

La variation du ratio Ca/Si initial de 0,2 à 3,5 est suivie d'une augmentation de la quantité de calcium insérée jusqu'à ce qu'un plateau soit atteint pour un ratio Ca/Si = 2. Il est donc également possible d'insérer plus de calcium dans les particules de silice en jouant sur ce paramètre, tout en étant conscient que seule une faible proportion du sel de calcium sera effectivement utile.

À la lumière de ces résultats, nous pouvons dire qu'il est maintenant clair et facile de comprendre les effets des paramètres principaux de synthèse sur la morphologie, la taille et la composition des particules de verres bioactifs élaborées par voie sol-gel.

5. Références

- (1) Lei, B.; Chen, X.; Han, X.; Zhou, J. Versatile Fabrication of Nanoscale Sol–Gel Bioactive Glass Particles for Efficient Bone Tissue Regeneration. *Journal of Materials Chemistry* **2012**, 22 (33), 16906.
- (2) Mozafari, M.; Rabiee, M.; Azami, M.; Maleknia, S. Biomimetic Formation of Apatite on the Surface of Porous Gelatin/Bioactive Glass Nanocomposite Scaffolds. *Applied Surface Science* **2010**, 257 (5), 1740–1749.
- (3) Roohani-Esfahani, S. I.; Nouri-Khorasani, S.; Lu, Z. F.; Appleyard, R. C.; Zreiqat, H. Effects of Bioactive Glass Nanoparticles on the Mechanical and Biological Behavior of Composite Coated Scaffolds. *Acta Biomaterialia* **2011**, 7 (3), 1307–1318.
- (4) Wang, C.; Shen, H.; Tian, Y.; Xie, Y.; Li, A.; Ji, L.; Niu, Z.; Wu, D.; Qiu, D. Bioactive Nanoparticle–Gelatin Composite Scaffold with Mechanical Performance Comparable to Cancellous Bones. *ACS Applied Materials & Interfaces* **2014**, 6 (15), 13061–13068.
- (5) Pereira, M. M.; Clark, A. E.; Hench, L. L. Effect of Texture on the Rate of Hydroxyapatite Formation on Gel-Silica Surface. *Journal of the American Ceramic Society* 78 (9), 2463–2468.
- (6) Wu, C.; Fan, W.; Chang, J. Functional Mesoporous Bioactive Glass Nanospheres: Synthesis, High Loading Efficiency, Controllable Delivery of Doxorubicin and Inhibitory Effect on Bone Cancer Cells. *J. Mater. Chem. B* **2013**, 1 (21), 2710–2718.
- (7) Oliveira, A. A. R. de; Souza, D. A. de; Dias, L. L. S.; Carvalho, S. M. de; Mansur, H. S.; Pereira, M. de M. Synthesis, Characterization and Cytocompatibility of Spherical Bioactive Glass Nanoparticles for Potential Hard Tissue Engineering Applications. *Biomed. Mater.* **2013**, 8 (2), 025011.
- (8) Labbaf, S.; Tsigkou, O.; Müller, K. H.; Stevens, M. M.; Porter, A. E.; Jones, J. R. Spherical Bioactive Glass Particles and Their Interaction with Human Mesenchymal Stem Cells in Vitro. *Biomaterials* **2011**, 32 (4), 1010–1018.
- (9) Maeno, S.; Niki, Y.; Matsumoto, H.; Morioka, H.; Yatabe, T.; Funayama, A.; Toyama, Y.; Taguchi, T.; Tanaka, J. The Effect of Calcium Ion Concentration on Osteoblast Viability, Proliferation and Differentiation in Monolayer and 3D Culture. *Biomaterials* **2005**, 26 (23), 4847–4855.
- (10) Marie, P. J. The Calcium-Sensing Receptor in Bone Cells: A Potential Therapeutic Target in Osteoporosis. *Bone* **2010**, 46 (3), 571–576.
- (11) Brinker, C. J.; Scherer, G. W. *The Physics and Chemistry of Sol-Gel Processing*; Academic Press: Boston, **1990**.

- (12) Bogush, G. H.; Zukoski, C. F. Uniform Silica Particle Precipitation: An Aggregative Growth Model. *Journal of colloid and interface science* **1991**, *142* (1), 19–34.
- (13) Yu, B.; Turdean-Ionescu, C. A.; Martin, R. A.; Newport, R. J.; Hanna, J. V.; Smith, M. E.; Jones, J. R. Effect of Calcium Source on Structure and Properties of Sol–Gel Derived Bioactive Glasses. *Langmuir* **2012**, *28* (50), 17465–17476.
- (14) Rámila, A.; Balas, F.; Vallet-Regí, M. Synthesis Routes for Bioactive Sol–Gel Glasses: Alkoxides versus Nitrates. *Chemistry of Materials* **2002**, *14* (2), 542–548.
- (15) Vichery, C.; Nedelec, J.-M. Bioactive Glass Nanoparticles: From Synthesis to Materials Design for Biomedical Applications. *Materials* **2016**.
- (16) Tsigkou, O.; Labbaf, S.; Stevens, M. M.; Porter, A. E.; Jones, J. R. Monodispersed Bioactive Glass Submicron Particles and Their Effect on Bone Marrow and Adipose Tissue-Derived Stem Cells. *Advanced Healthcare Materials* **2014**, *3* (1), 115–125.
- (17) Lukowiak, A.; Lao, J.; Lacroix, J.; Nedelec, J.-M. Bioactive Glass Nanoparticles Obtained through Sol–Gel Chemistry. *Chem. Commun.* **2013**, *49* (59), 6620–6622.
- (18) Fan, J. P.; Kalia, P.; Di Silvio, L.; Huang, J. In Vitro Response of Human Osteoblasts to Multi-Step Sol–Gel Derived Bioactive Glass Nanoparticles for Bone Tissue Engineering. *Materials Science and Engineering: C* **2014**, *36*, 206–214.
- (19) Luz, G. M.; Mano, J. F. Nanoengineering of Bioactive Glasses: Hollow and Dense Nanospheres. *Journal of Nanoparticle Research* **2013**, *15* (2).
- (20) Ajita, J.; Saravanan, S.; Selvamurugan, N. Effect of Size of Bioactive Glass Nanoparticles on Mesenchymal Stem Cell Proliferation for Dental and Orthopedic Applications. *Materials Science and Engineering: C* **2015**, *53*, 142–149.
- (21) El-Kady, A. M.; Ali, A. F.; Farag, M. M. Development, Characterization, and in Vitro Bioactivity Studies of Sol–Gel Bioactive Glass/Poly(l-Lactide) Nanocomposite Scaffolds. *Materials Science and Engineering: C* **2010**, *30* (1), 120–131.
- (22) El-Kady, A. M.; Ali, A. F.; Rizk, R. A.; Ahmed, M. M. Synthesis, Characterization and Microbiological Response of Silver Doped Bioactive Glass Nanoparticles. *Ceramics International* **2012**, *38* (1), 177–188.
- (23) Delben, J. R. J.; Pimentel, O. M.; Coelho, M. B.; Candelario, P. D.; Furini, L. N.; Alencar dos Santos, F.; de Vicente, F. S.; Delben, A. A. S. T. Synthesis and Thermal Properties of Nanoparticles of Bioactive Glasses Containing Silver. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry* **2009**, *97* (2), 433–436.

- (24) Xia, W.; Chang, J. Preparation and Characterization of Nano-Bioactive-Glasses (NBG) by a Quick Alkali-Mediated Sol-Gel Method. *Materials Letters* **2007**, *61* (14–15), 3251–3253.
- (25) Hughes, J. M.; Budd, P. M.; Grieve, A.; Dutta, P.; Tiede, K.; Lewis, J. Highly Monodisperse, Lanthanide-Containing Polystyrene Nanoparticles as Potential Standard Reference Materials for Environmental “Nano” Fate Analysis. *Journal of Applied Polymer Science* **2015**, *132* (24), n/a-n/a.
- (26) Jones, J. R. Reprint of: Review of Bioactive Glass: From Hench to Hybrids. *Acta Biomaterialia* **2015**, *23*, Supplement, S53–S82.
- (27) Greasley, S. L.; Page, S. J.; Sirovica, S.; Chen, S.; Martin, R. A.; Riveiro, A.; Hanna, J. V.; Porter, A. E.; Jones, J. R. Controlling Particle Size in the Stöber Process and Incorporation of Calcium. *Journal of Colloid and Interface Science* **2016**, *469*, 213–223.
- (28) Sepulveda, P.; Jones, J. R.; Hench, L. L. In Vitro Dissolution of Melt-Derived 45S5 and Sol-Gel Derived 58S Bioactive Glasses. *Journal of Biomedical Materials Research* **2002**, *61* (2), 301–311.
- (29) Sepulveda, P.; Jones, J. R.; Hench, L. L. Characterization of Melt-Derived 45S5 and Sol-Gel-Derived 58S Bioactive Glasses. *Journal of Biomedical Materials Research* **2001**, *58* (6), 734–740.
- (30) Zheng, K.; Dai, X.; Lu, M.; Hüser, N.; Taccardi, N.; Boccaccini, Aldo. R. Synthesis of Copper-Containing Bioactive Glass Nanoparticles Using a Modified Stöber Method for Biomedical Applications. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2017**, *150*, 159–167.
- (31) Bell, N. C.; Minelli, C.; Tompkins, J.; Stevens, M. M.; Shard, A. G. Emerging Techniques for Submicrometer Particle Sizing Applied to Stöber Silica. *Langmuir* **2012**, *28* (29), 10860–10872.
- (32) Zheng, K.; Boccaccini, A. R. Sol-Gel Processing of Bioactive Glass Nanoparticles: A Review. *Advances in Colloid and Interface Science* **2017**.
- (33) Lin, S.; Ionescu, C.; Pike, K. J.; Smith, M. E.; Jones, J. R. Nanostructure Evolution and Calcium Distribution in Sol-Gel Derived Bioactive Glass. *J. Mater. Chem.* **2009**, *19* (9), 1276–1282.
- (34) Van Blaaderen, A.; Van Geest, J.; Vrij, A. Monodisperse Colloidal Silica Spheres from Tetraalkoxysilanes: Particle Formation and Growth Mechanism. *Journal of colloid and interface science* **1992**, *154* (2), 481–501.
- (35) Zheng, K.; Taccardi, N.; Beltrán, A. M.; Sui, B.; Zhou, T.; Marthala, V. R. R.; Hartmann, M.; Boccaccini, Aldo. R. Timing of Calcium Nitrate Addition Affects Morphology, Dispersity and Composition of Bioactive Glass Nanoparticles. *RSC Adv.* **2016**, *6* (97), 95101–95111.
- (36) Kozon, D.; Zheng, K.; Boccardi, E.; Liu, Y.; Liverani, L.; Boccaccini, A. Synthesis of Monodispersed Ag-Doped Bioactive Glass Nanoparticles via Surface Modification. *Materials* **2016**, *9* (4), 225.

- (37) El-Rashidy, A. A.; Waly, G.; Gad, A.; Hashem, A. A.; Balasubramanian, P.; Kaya, S.; Boccaccini, A. R.; Sami, I. Preparation and in Vitro Characterization of Silver-Doped Bioactive Glass Nanoparticles Fabricated Using a Sol-Gel Process and Modified Stöber Method. *Journal of Non-Crystalline Solids*.

Chapitre 3 :

**Effet de la quantité de calcium insérée sur
la bioactivité de nanoparticules de verre
bioactif**

1. Introduction

La formation d'hydroxyapatite (HAp) à la surface des verres bioactifs lorsqu'ils sont immergés en milieu biologique ou dans un milieu mimant les fluides biologiques (comme le SBF), est un prérequis à leur fixation biologique avec les tissus osseux.¹ Dès lors, de nombreuses études se sont focalisées sur les paramètres impactant la vitesse de formation de l'hydroxyapatite lors d'études *in vitro*. Dans la suite, cette vitesse de minéralisation sera appelée bioactivité.

Parmi ces paramètres, il semblerait que la bioactivité soit grandement affectée par la surface spécifique et la composition du verre, d'où une course à l'augmentation de la teneur en calcium dans la matrice vitreuse et de la surface spécifique du matériau. À ce titre, El Rashidy *et al.*² ont montré dans leur étude qu'une forte teneur en calcium et une surface spécifique élevée conduisent à une cristallisation rapide de l'hydroxyapatite (accélération de la vitesse de dissolution du verre et de la libération des ions dans le SBF). Saravanapavan *et al.*³ ont étudié les mêmes paramètres et souligné la difficulté de séparer l'effet de la composition de celui des propriétés texturales sur la vitesse de formation de l'hydroxyapatite.

Dans une autre étude, Lei et ses collaborateurs ont étudié l'influence de la taille des particules de verre bioactif sur la bioactivité.⁴ Il en ressort que le processus de minéralisation est accéléré par l'augmentation de la surface spécifique. Dans une série d'étude menée sur diverses compositions de verre bioactif binaire dans (SiO₂-CaO), Martinez *et al.*⁵ ont montré que la bioactivité est plutôt liée à la composition du verre. Selon les auteurs, l'insertion d'une grande quantité de calcium au sein des particules induit à la fois une libération rapide d'ions Ca²⁺ dans le milieu et une formation importante de groupements silanols (Si-OH) à la surface du verre, entraînant une croissance rapide de la couche d'apatite. De la même manière, Li *et al.*⁶ ont reporté que la bioactivité de verres tertiaires (SiO₂-CaO-P₂O₅) est principalement impactée par leur composition.

À partir de ses résultats répertoriés dans le Tableau 3.1, l'on remarque que l'échantillon dont la surface spécifique est la plus élevée est parfois celui présente la meilleure bioactivité (malgré une faible teneur en calcium) ou à contrario, que c'est l'échantillon caractérisé par une forte teneur en calcium (malgré une faible surface spécifique) qui favorise la formation la plus rapide d'HAp à sa surface. Par ailleurs, il est difficile d'être parfaitement en accord avec toutes ces conclusions, car de nombreux paramètres ont été variés simultanément et/ou parce que la composition réelle du verre à l'issue de la synthèse n'est pas déterminée précisément. On peut notamment voir dans

l'étude de De Oliveira *et al.*⁷ que la composition réelle des verres diffère grandement de leur composition nominale.

Par conséquent, l'objectif de ce chapitre est d'étudier l'impact du ratio Ca/Si effectif (quantité de calcium réellement insérée) sur la bioactivité des verres en élaborant des nanoparticules de verre bioactif binaire de différentes compositions, mais avec une surface spécifique similaire grâce au procédé Stöber.

Références	Composition nominale Si:Ca(:P) (mol)	Composition réelle Si:Ca(:P) (mol)	Ratio Ca/Si effectif	Surface spécifique (m ² /g)
Martinez <i>et al.</i> ⁵	0,5 : 0,5 0,7 : 0,3 0,9 : 0,1	?	?	30 126 184
El-Rashidy <i>et al.</i> ²	0,6 : 0,36 : 0,04 0,48 : 0,52	0,58 : 0,4 : 0,02 0,94 : 0,06	0,69 0,06	92 13
Lei <i>et al.</i> ⁴	0,6 : 0,36 : 0,04 0,6 : 0,36 : 0,04 0,6 : 0,36 : 0,04	?	?	86 20 2
Saravanapavan <i>et al.</i> ³	0,5 : 0,5 0,7 : 0,3 0,9 : 0,1	?	?	43 136 185
Oliveira <i>et al.</i> ⁷	0,6 : 0,38 : 0,02 0,6 : 0,38 : 0,02	0,57 : 0,39 : 0,04 0,81 : 0,18 : 0,01	0,68 0,22	76 533
Li <i>et al.</i> ⁶	0,55 : 0,41 : 0,04 0,6 : 0,36 : 0,04 0,8 : 0,16 : 0,04	?	?	213 289 431

Tableau 3.1 : paramètres principaux influençant la bioactivité des verres bioactifs obtenus par voie sol-gel selon la littérature. En gras, l'échantillon de l'étude pour lequel la croissance d'hydroxyapatite a été la plus rapide.

2. Protocole de synthèse

Dans le chapitre précédent, des nanoparticules bioactives ont été élaborées par modification du procédé Stöber. En se basant sur les résultats obtenus, des nanoparticules présentant des tailles similaires et différents ratios Ca/Si effectifs ont été synthétisées. Le ratio Ca/Si initial a été fixé à 0,2 et le moment d'ajout du sel de calcium dans le milieu réactionnel a été modulé (entre H = 1h et H = 3h après le début de la réaction sol-gel).

3. Caractérisations

3.1. Caractérisation morphologique et état d'agglomération des particules

La Figure 3.1 présente les images MET des nanoparticules bioactives élaborées respectivement avec H = 1, 2 et 3h (SiCa-1, SiCa-2 et SiCa-3). Toutes présentent une morphologie sphérique régulière. Par contre, on remarque que les particules SiCa-2 et SiCa-3 sont bien séparées les unes des autres alors que pour SiCa-1, il semble y avoir un état d'agglomération plus important. Ces observations sont en parfait accord avec celles du chapitre 2 et peuvent être expliquées par le mécanisme de formation des particules de silice (cf. paragraphe 3.2.1). L'ajustement des histogrammes de taille par une fonction log-normale montre que le diamètre moyen des particules SiCa-1, SiCa-2 et SiCa-3 est respectivement de 156 ± 23 nm, 179 ± 25 nm et 175 ± 21 nm. La dispersion en taille est pour les 3 échantillons d'environ 15%, ce qui prouve que les nanoparticules obtenues sont monodisperses en taille.

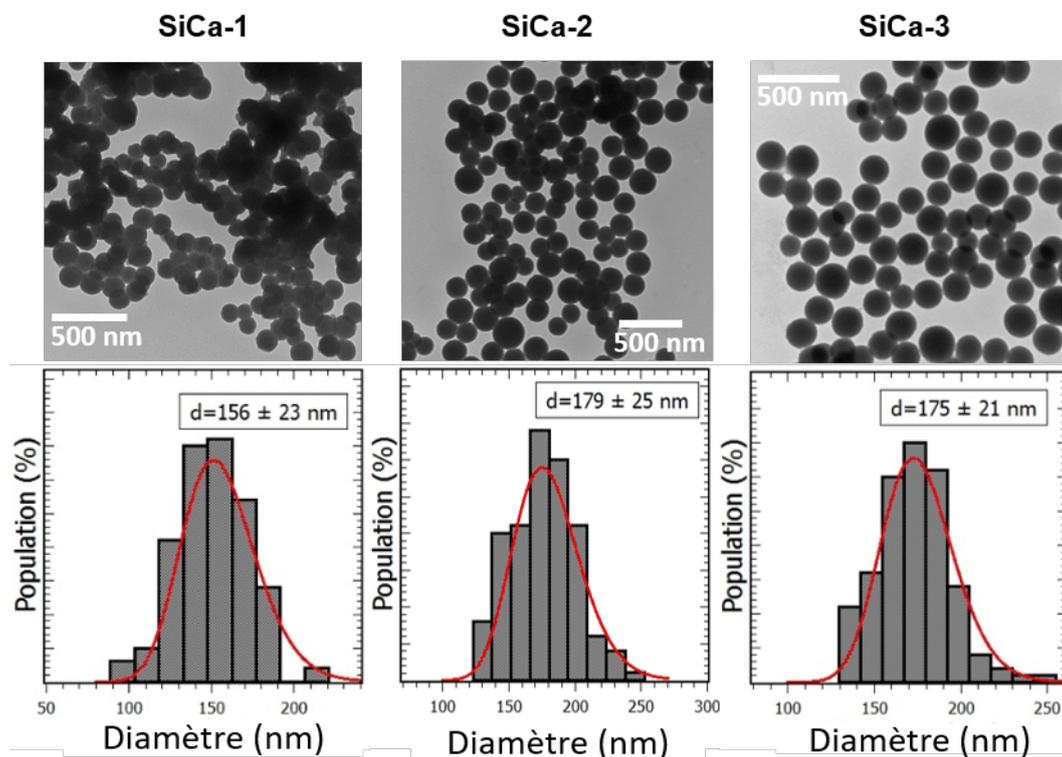


Figure 3.1 : images MET et histogrammes de taille des nanoparticules bioactives élaborées.

3.2. Détermination de la surface spécifique des particules

Les isothermes d'adsorption-désorption des échantillons (Figure 3.2) sont de type III, caractéristique de matériaux non poreux. La surface spécifique S_{BET} associée à SiCa-1, SiCa-2 et SiCa-3 est respectivement de 18, 20 et 19 m^2/g , valeurs cohérentes avec celles obtenues dans le chapitre précédent. On aurait pu s'attendre à une valeur plus importante pour l'échantillon SiCa-1 due à une taille plus petite des particules, mais ces dernières étant agrégées, la surface spécifique en est par conséquent diminuée. En conclusion, ces trois échantillons présentent bien une surface spécifique similaire.

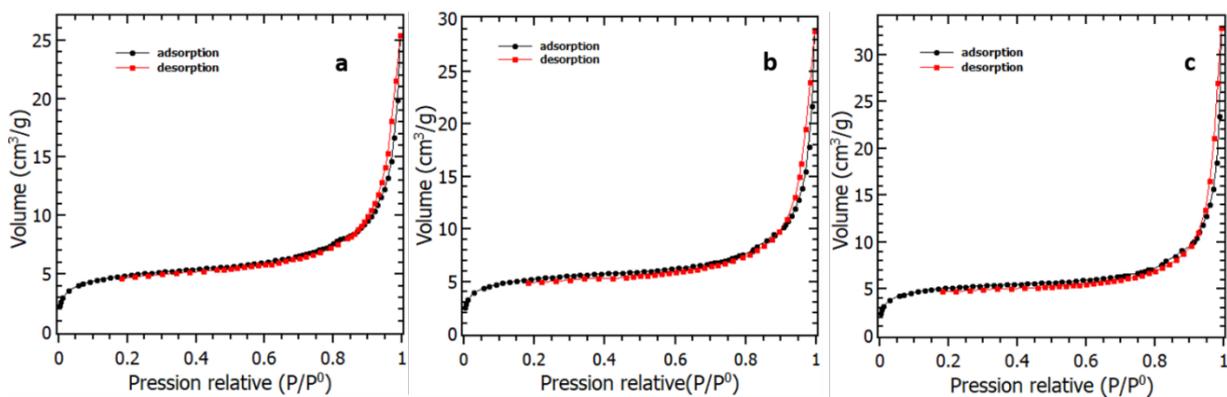


Figure 3.2 : isothermes d'adsorption-désorption de: a) SiCa-1, b) SiCa-2, c) SiCa-3.

3.3. Composition des particules

L'élaboration d'un système bioactif passe par le contrôle du ratio Ca/Si effectif *i.e.* la quantité de calcium effectivement contenue dans le système, de par le rôle de ce modificateur de réseau sur la bioactivité. Depuis la découverte du bioverre 45S5, la gamme de composition dans laquelle le verre présente une propriété bioactive a été élargie, essentiellement grâce au développement du procédé sol-gel. Cependant, dans de nombreuses études, le ratio Ca/Si effectif n'est pas déterminé (seule la quantité de calcium initialement utilisée pour la réaction est connue) ce qui rend impossible toute comparaison et toute conclusion quant au protocole permettant l'élaboration de particules aux propriétés bioactives optimisées.

Ici, la composition des nanoparticules bioactives a été précisément déterminée par spectroscopie d'émission optique à plasma à couplage inductif. Les valeurs obtenues (Tableau 3.2) montrent que la quantité de calcium insérée dans le réseau vitreux décroît lorsque le moment d'ajout du sel de calcium est retardé par rapport au début de la réaction sol-gel. En effet, aux temps $H = 1h, 2h$ et $3h$ respectivement 91% ($Ca/Si = 0,182$), 58.5% ($Ca/Si = 0,117$) et 37% ($Ca/Si = 0,074$) de la quantité de calcium

initialement dans le milieu a été incorporée dans les particules de silice. Ces résultats montrent la reproductibilité de notre protocole de synthèse puisqu'ils sont parfaitement en accord avec ceux obtenus dans le chapitre 2 où l'on a observé cette même tendance (diminution de 90 à 37% d'insertion du calcium lorsque le nitrate de calcium est ajouté dans le milieu réactionnel entre 1h et 3h après le début de la réaction sol-gel).

Échantillons	Ratio Ca/Si initial	SiO ₂ (%mol)	CaO (%mol)	Ratio Ca/Si effectif
SiCa-1	0,2	84,6 ± 0.8	15,4 ± 0.1	0,182 ± 0,002
SiCa-2	0,2	89,4 ± 0.9	10,6 ± 0.1	0,117 ± 0,002
SiCa-3	0,2	93,1 ± 0.9	6,9 ± 0.1	0,074 ± 0,001

Tableau 3.2 : composition effective des nanoparticules bioactives déterminée par ICP- AES.

3.4. Structure des particules

Comme mentionné dans le chapitre 2, les ions Ca²⁺ réduisent la connectivité du réseau silicate par création d'oxygènes non-pontants. L'environnement local des ions Si⁴⁺, formateurs de réseau (tétraèdre SiO₄) se trouve modifié. Il est donc possible de suivre par spectroscopie RMN du silicium à l'état solide (RMN ²⁹Si) ce changement d'ordre local *via* la détermination de la distribution des blocs structuraux Q_n en fonction de la quantité d'ions Ca²⁺ incorporée. Pour rappel, Q représente le tétraèdre formateur de réseau et n (0 ≤ n ≤ 4), le nombre d'atomes d'oxygène pontant par tétraèdre. À titre d'exemple, les Figures 3.3a et 3.3b présentent respectivement les spectres RMN de nanoparticules de silice pure (100Si, obtenue par le procédé Stöber) et celui de SiCa-2.

À partir des spectres enregistrés, il est possible d'identifier les espèces Q_n et leur proportion relative par déconvolution du signal à l'aide de fonctions gaussiennes. Les résultats obtenus (Figure 3.4), mettent en évidence la présence des unités Q₃ (bleu) et Q₄ (rouge) dont les déplacements chimiques sont compris respectivement entre [-100 ppm; -102 ppm] et [-109 ppm; -112 ppm].⁸

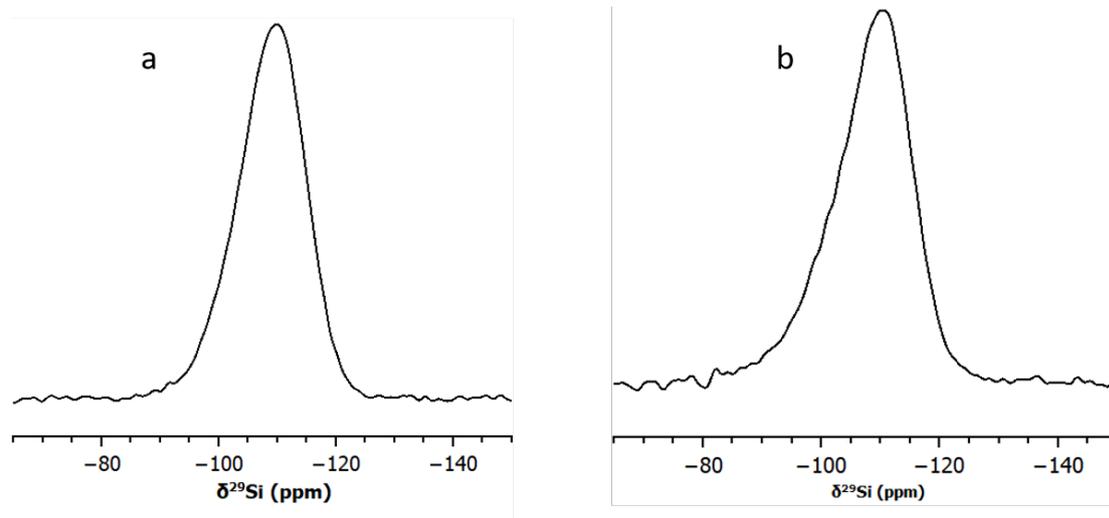


Figure 3.3 : spectres RMN ^{29}Si de a) 100Si et b) SiCa-2.

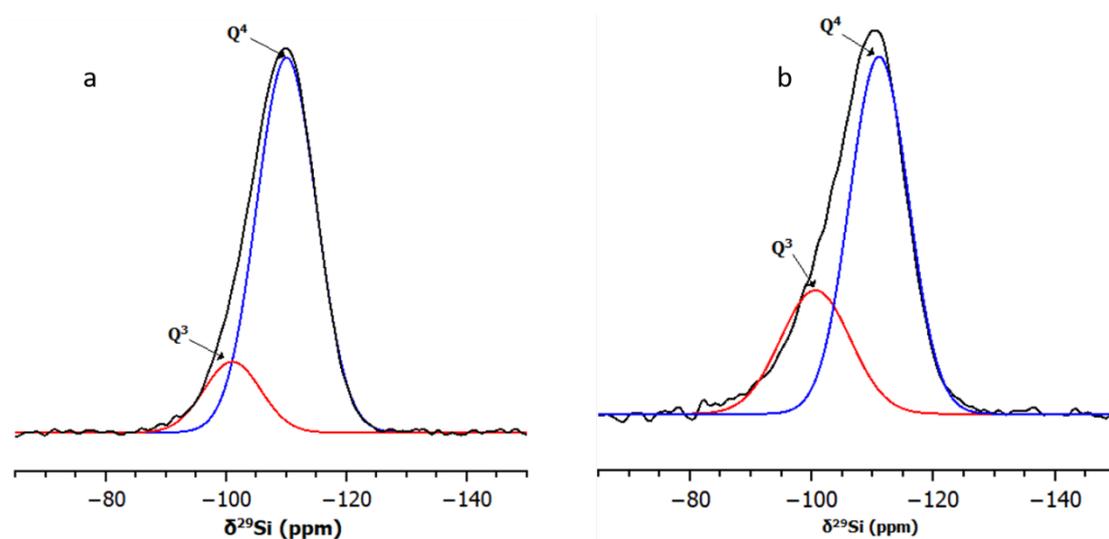


Figure 3.4 : spectres ^{29}Si RMN de: a) 100Si et b) SiCa-2, déconvolués avec des fonctions gaussiennes correspondant aux unités Q_4 (bleu) et Q_3 (rouge).

Les populations relatives des espèces Q_3 et Q_4 ainsi que le nombre de coordination (NC) de chaque échantillon, calculé à partir de la relation ci-dessous, sont répertoriés dans le Tableau 3.3.

$$NC = \frac{4 \%Q_4 + 3 \%Q_3 + 2 \%Q_2 + \%Q_1}{100}$$

Échantillons	Q ⁴		Q ³		NC
	δ (ppm)	Population (%)	δ (ppm)	Population (%)	
100Si	-109,85 ± 0.08	85 ± 2	-101,4 ± 0,01	15 ± 1	3,85 ± 0,03
SiCa-3	-110,34 ± 0.07	73 ± 1	-100,5 ± 0,6	27 ± 1	3,73 ± 0,04
SiCa-2	-111,02 ± 0.01	71 ± 1	-100,57 ± 0,03	29 ± 1	3,71 ± 0,03
SiCa-1	-111,91 ± 0.04	62 ± 1	-100,57 ± 0,07	38 ± 2	3,68 ± 0,02

Tableau 3.3 : déplacements chimiques, populations relatives des unités Q₄ et Q₃ et nombre de coordination (NC) de 100Si et des nanoparticules bioactives synthétisées.

En comparaison avec les particules de silice pure, le nombre de coordination des nanoparticules bioactives diminue, et ce de manière significative, lorsque le sel de calcium est ajouté rapidement après le début de la réaction sol-gel. Un tel résultat était attendu et peut facilement s'expliquer au regard du ratio Ca/Si effectif des échantillons. En effet, l'incorporation du calcium dans la matrice de silice lors du traitement thermique induit une ouverture du réseau vitreux (rôle de modificateur de réseau des ions Ca²⁺)⁹ réduisant ainsi la proportion des unités Q₄, caractéristiques d'un réseau vitreux complètement dense. À l'inverse, celles qui caractérisent la réduction de la connectivité, à savoir les espèces Q_n avec n<4 (Q₃ dans notre cas), voient leur proportion relative augmenter. En conséquence, une incorporation plus importante du calcium va générer une diminution de plus en plus importante de la connectivité du réseau vitreux, d'où la baisse significative du nombre de coordination des particules bioactives élaborées par rapport à celui de la silice pure (cf. Tableau 3.3).

La Figure 3.5a présente la superposition des spectres IR des échantillons. On observe principalement 3 bandes d'absorption entre 400 - 1250 cm⁻¹, caractéristiques de la matrice de silice. En effet, les bandes localisées à 475 cm⁻¹ et à 805 cm⁻¹ peuvent être associées à des vibrations de déformation des liaisons Si-O-Si, respectivement de rotation ($\beta_{Si-O-Si}$)^{10,11} et de flexion ($\delta_{Si-O-Si}$).¹² Et celle située entre 1000 et 1250 cm⁻¹ correspond à la vibration d'élongation asymétrique de la liaison Si-O-Si ($\nu_{Si-O-Si}$).¹³ En outre, une bande à 875 cm⁻¹, dont l'intensité augmente quand H diminue, surtout visible pour SiCa-2 et SiCa-1, peut être attribuée à la flexion symétrique de la liaison O-C-O (δ_{O-C-O}) du carbonate de calcium (CaCO₃). Sa formation est

une conséquence du processus de carbonatation entre le CO_2 et les ions Ca^{2+} pendant la synthèse ou lors des lavages et du traitement thermique.^{14,15}

Par ailleurs, la nature amorphe des échantillons a été confirmée par DRX, comme observé en Figure 3.5b.

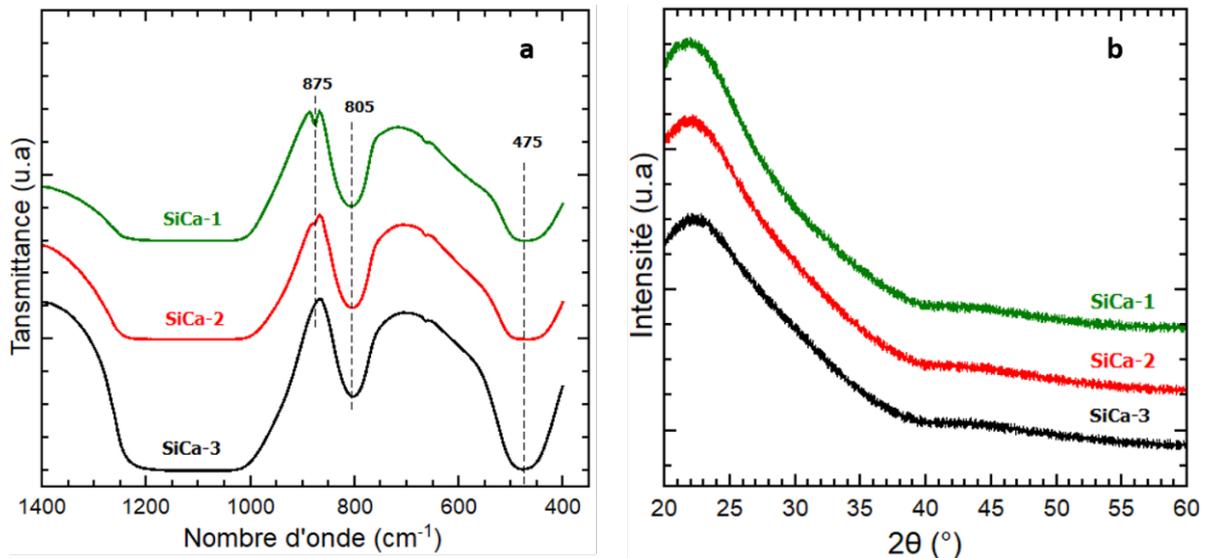


Figure 3.5 : a) spectres IR et b) diffractogrammes des nanoparticules bioactives.

Des nanoparticules bioactives de surface spécifique similaire, mais de ratio Ca/Si effectif différent ont été élaborées *via* la variation du moment d'ajout du nitrate de calcium dans le milieu réactionnel pendant la réaction sol-gel, selon le protocole établi dans le chapitre 2. De cette manière, toute différence de propriété bioactive au cours de tests *in vitro* sera uniquement attribuable à la différence de composition des particules (quantité de Ca insérée).

4. Évaluation de la bioactivité des échantillons

La vitesse de formation de l'hydroxyapatite à la surface des nanoparticules élaborées a été évaluée après différents temps d'immersion (de 16h à 17 jours) dans du SBF. La poudre et le SBF (1mg/mL) ont été mis dans un bécher hermétiquement fermé à l'aide de parafilm, et ce dernier étant placé dans un agitateur orbital chauffant à 37°C. Après immersion, les échantillons ont été lavés, séchés et caractérisés par DRX et FTIR. La Figure 3.6 et le Tableau 3.4 montrent respectivement le protocole expérimental d'évaluation *in vitro* de la bioactivité effectué en laboratoire et les concentrations ioniques nominales du SBF synthétisé par rapport à celle du plasma sanguin.

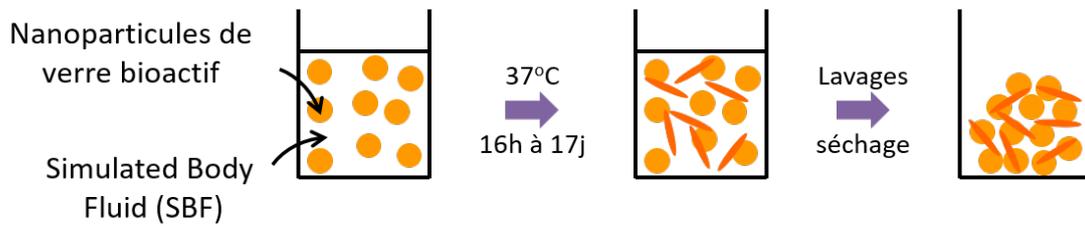


Figure 3.6 : protocole d'évaluation de la bioactivité des échantillons.

Ion	Concentration (mM)	
	Plasma sanguin	SBF
Na ⁺	142,0	142,0
K ⁺	5,0	5,0
Mg ²⁺	1,5	1,5
Ca ²⁺	2,5	2,5
Cl ⁻	103,0	147,8
HCO ₃ ⁻	27,0	4,2
HPO ₄ ²⁻	1,0	1,0
SO ₄ ²⁻	0,5	0,5
pH	7,2-7,4	7,4

Tableau 3.4 : comparaison entre les concentrations nominales ioniques du SBF et du plasma humain.¹

À titre d'exemple, La Figure 3.7 montre les images MET des échantillons obtenus après 7 jours d'immersion dans le SBF. On peut voir qu'ils sont couverts de cristaux sous forme d'aiguille.

Les diffractogrammes des échantillons montrent l'apparition de pics de diffraction correspondant aux familles de plan réticulaire (002), (210), (211), (300), (202), (310), (222), (213) et (004) de l'hydroxyapatite (JCPDS 09-0432) (Figure 3.8b). En outre, les spectres IR (Figure 3.8a) montrent l'apparition de 2 nouvelles bandes d'absorption, respectivement à 564 cm⁻¹ et 604 cm⁻¹, attribuables aux vibrations de déformation de la liaison O-P-O (δ_{O-P-O}) des groupements phosphates de l'hydroxyapatite.¹⁶ Le caractère bioactif des échantillons est ainsi confirmé.

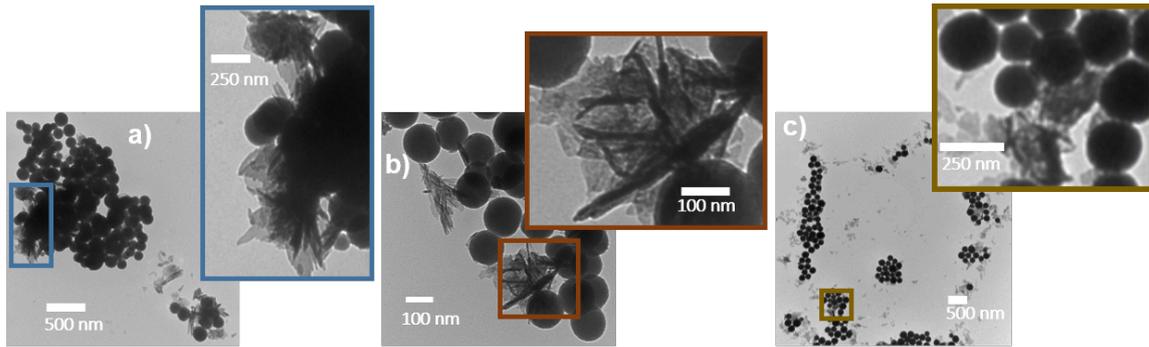


Figure 3.7 : images MET de a) SiCa-1 b) SiCa-2 et c) SiCa-3 après 7 jours d'immersion dans du SBF montrant la formation de cristaux à leur surface.

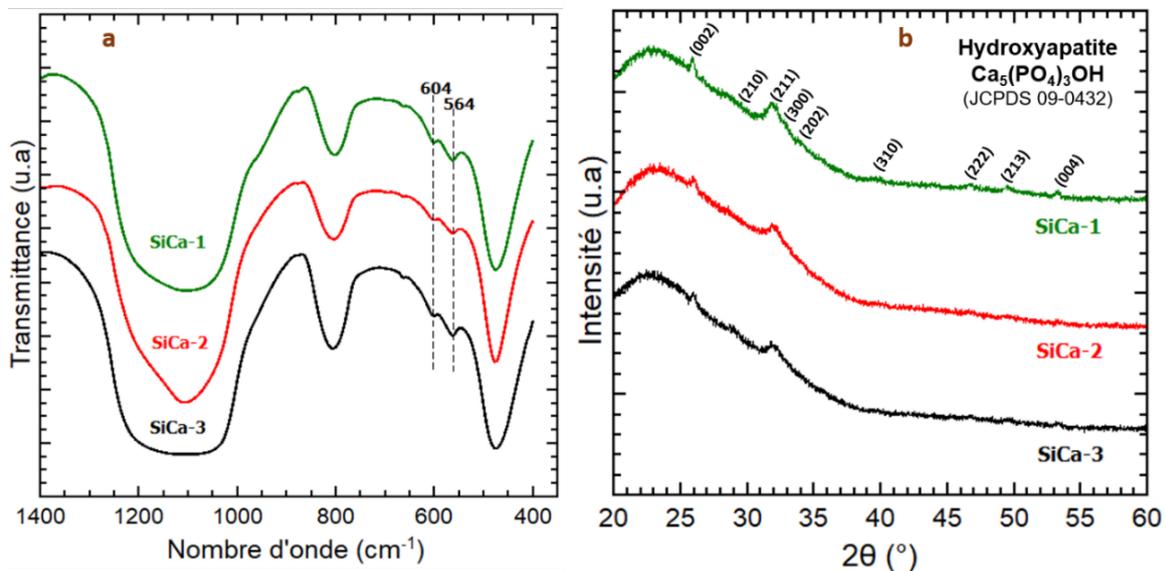


Figure 3.8 : a) spectres IR et b) diffractogrammes des échantillons obtenus après 7 jours d'immersion dans du SBF.

Par ailleurs, afin de comparer la proportion d'HAp formée à la surface des échantillons, le rapport « r » de l'aire sous les bandes P-O-P (A_{P-O-P}) sur l'aire totale (A_T) du spectre entre 402 et 863 cm^{-1} a été calculé (voir Figure 3.9). A noter que pour chaque composition, 5 pastilles ont été réalisées et analysées afin d'estimer la barre d'erreur sur les valeurs de r. Les résultats ont montré que le rapport $r = A_{P-O-P} / A_T$ pour SiCa-3, SiCa-2 et SiCa-1 est respectivement de $0,04 \pm 0,02$, $0,04 \pm 0,03$ et $0,05 \pm 0,02$. Il y n'a donc pas d'évolution significative de la proportion d'HAp formée lorsque la quantité de Ca dans le verre bioactif augmente. On peut ainsi considérer que la bioactivité des 3 échantillons est similaire après 7 jours d'immersion dans le SBF.

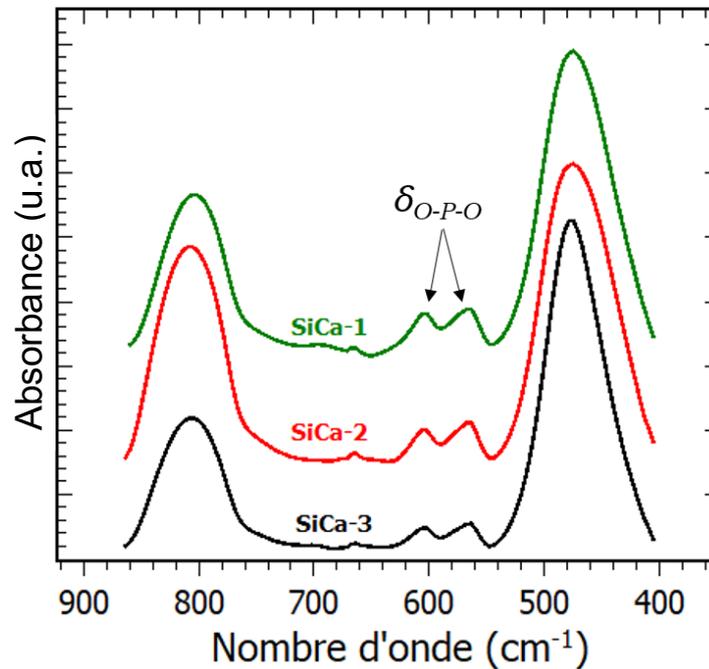


Figure 3.9 : superposition des spectres IR de SiCa-1, SiCa-2, SiCa-3 après retrait de la ligne de base.

Il est tout de même important d'évaluer la cinétique de formation de l'HAp afin de comprendre plus finement l'impact de la composition sur la bioactivité. Au regard des spectres IR et des diffractogrammes obtenus après différentes durées d'immersion des échantillons dans le SBF (voir Figure 3.10), on remarque que la cinétique de formation de l'HAp dépend de la quantité de calcium insérée dans le réseau vitreux. En effet, de faibles pics caractéristiques de l'HAp sont présents sur les diffractogrammes de SiCa-1 et SiCa-2 après 3 jours d'immersion, tandis que ceux-ci ne sont visibles sur le diffractogramme de l'échantillon SiCa-3 qu'après 7 jours. Pour des temps plus longs, on observe l'apparition d'un plus grand nombre de pics de diffraction, et l'augmentation de leur intensité et une légère diminution de leur largeur à mi-hauteur. Cela montre à la fois l'amélioration de la cristallinité des particules d'HAp formées, et l'augmentation de la quantité d'HAp dans les échantillons. Ces résultats sont en parfait accord avec ceux obtenus par IR. On voit l'apparition et l'évolution de l'intensité des bandes caractéristiques de l'HAp (bandes d'absorption à 564 et 604 cm^{-1}) après des temps d'immersion similaires. De ces analyses, on en conclut que le verre SiCa-1 présente une meilleure bioactivité que SiCa-2 qui à son tour est plus bioactif que SiCa-3.

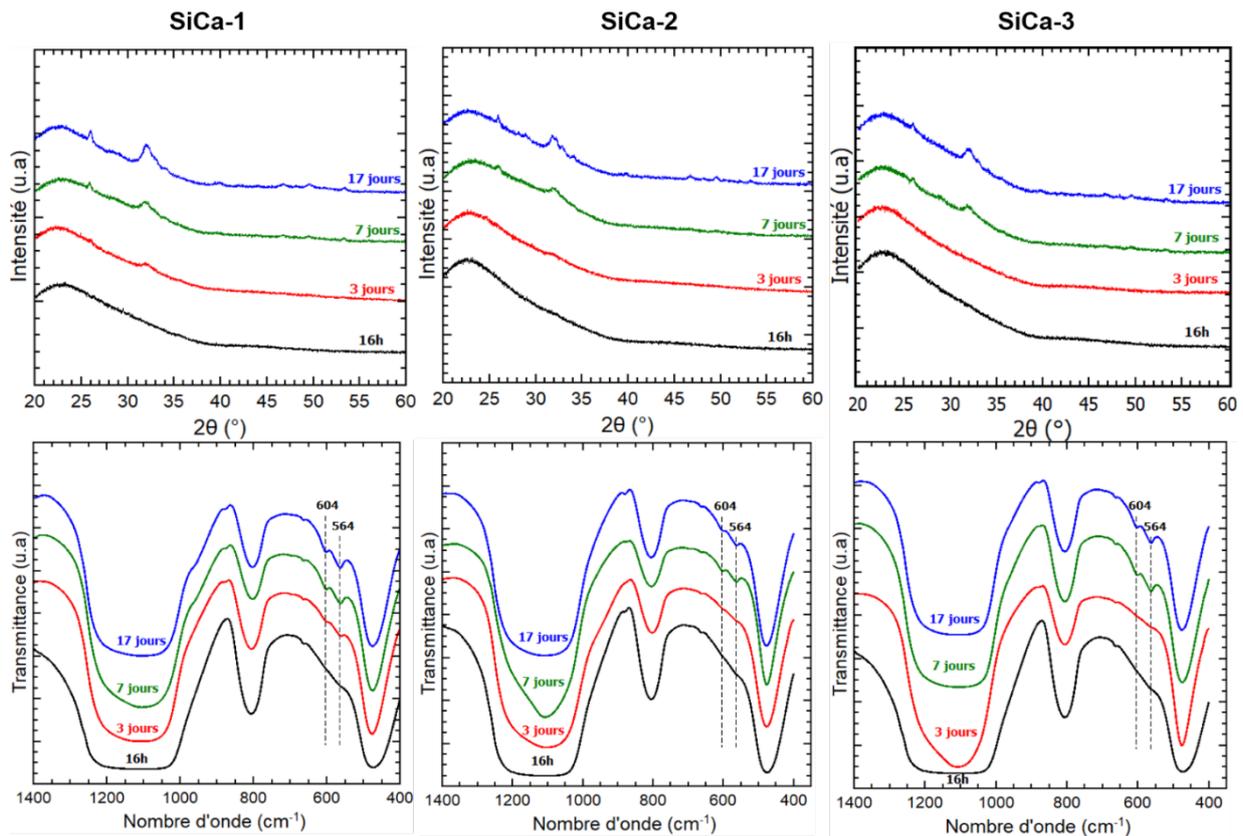


Figure 3.10 : spectres IR et diffractogrammes de SiCa-1, SiCa-2 et SiCa-3 après immersion dans le SBF durant 16 h, 3 jours, 7 jours et 17 jours.

Une telle conclusion est logique puisque l'augmentation du ratio Ca/Si effectif réduit la connectivité du réseau vitreux (cf. paragraphe 2.3) qui induit une dissolution plus rapide du verre dans le SBF ce qui accélère la formation des cristaux d'apatite.^{17,18}

Malgré le fait que SiCa-1 semble être le meilleur matériau pour la régénération osseuse parmi les 3 synthétisés, la différence de bioactivité avec les échantillons SiCa-2 et SiCa-3 est très peu significative. Ceci nous laisse penser que ce paramètre n'est sans doute pas le plus important (dans la gamme de composition étudiée, 7-15 %mol CaO) si l'on veut vraiment impacter la vitesse de minéralisation et donc la bioactivité.

5. Cytotoxicité des particules

L'évaluation de la cytotoxicité d'un matériau en milieu *in vitro* est un prérequis indispensable avant d'envisager toute application biomédicale. D'une manière générale, ce test basé sur l'interaction matériau - cellules, permet d'évaluer l'impact d'un matériau sur la vitalité de cellules dans des conditions de culture proches du milieu *in vivo*. Pour avoir une bonne statistique et une bonne reproductibilité des conditions, l'expérience doit être

répliquée plusieurs fois. Dans notre cas, des cellules souches mésenchymateuses (CSM) prélevées sur des patients lors d'opérations chirurgicales (arthroplasties de hanche) ont été utilisées. Les procédures de prélèvement et de culture cellulaire sont détaillées en Annexe 2.

Pour les tests de cytotoxicité, les nanoparticules bioactives ont tout d'abord été stérilisées dans une étuve (180°C/2h). Elles ont ensuite été déposées au fond des puits d'une plaque de 24 puits où des CSM ont ensuite étéensemencées (5x10⁴ cellules/puits). La concentration en particules dans chaque puits est de 1 mg/mL. Le tout a ensuite été incubé pendant un certain temps à 37°C. Des CSMensemencées dans des puits sans nanoparticules ont servi de témoin. Les tests ont été faits en triplicata. La vitalité des cellules a ensuite été évaluée par l'analyse de leur activité mitochondriale grâce à l'addition d'un sel de tetrazolium, le MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide).¹⁹ Le principe de cette méthode repose sur la réduction du sel de tetrazolium de coloration jaunâtre en un produit de couleur intense bleu-violet (formazan) par une enzyme mitochondriale, la succinate-déshydrogénase, uniquement relarguée par les mitochondries des cellules vivantes^{20,21} (mécanisme de réaction schématisé en Figure 3.10).

Après clivage du réactif MTT, la densité optique de la solution contenant les sels de formazan est mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre afin de quantifier la proportion de cellules vivantes. Le protocole détaillé des tests MTT est décrit en Annexe 2.

Cette procédure est également appliquée au témoin (cellules non exposées aux nanoparticules), puis des tests statistiques sont effectués afin de vérifier s'il existe une différence significative entre le témoin et les cellules exposées. La méthode non paramétrique de Mann-Whitney avec la correction de Bonferroni a été utilisée. Par convention, le seuil de signification (p) est fixé à 5%. En d'autres termes, ceci implique que si :

- $p > 0,05$: les différences sont statistiquement non significatives
- $p < 0,05$: les différences sont statistiquement significatives

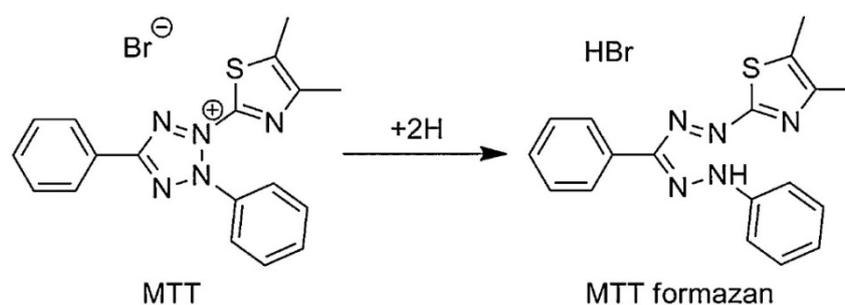


Figure 3.10 : Réduction du MTT en formazan.¹⁹

Dans cette étude, la cytotoxicité de l'échantillon SiCa-1 (échantillon présentant les meilleures propriétés bioactives parmi les 3 échantillons élaborés) a été évaluée en présence de CSM avec un contact de 3 jours et 7 jours. La cinétique de formation de la couche apatitique à la surface des verres bioactifs étant rapide, le pH du milieu de culture pourrait augmenter au-delà d'une valeur critique (pH = 7.4), ce qui pourrait induire une certaine toxicité.²² Par conséquent, les tests biologiques ont été effectués sur l'échantillon brut (SiCa-1) et pré-conditionné dans le SBF (SBF-SiCa-1).

En comparaison avec le contrôle (voir Figure 3.11), l'activité mitochondriale des CSM en présence des nanoparticules SiCa-1 et SBF-SiCa-1 ne montre aucun changement significatif ($p > 0,05$). On peut donc affirmer que les 2 échantillons sont non cytotoxiques pour les deux temps d'incubation testés.

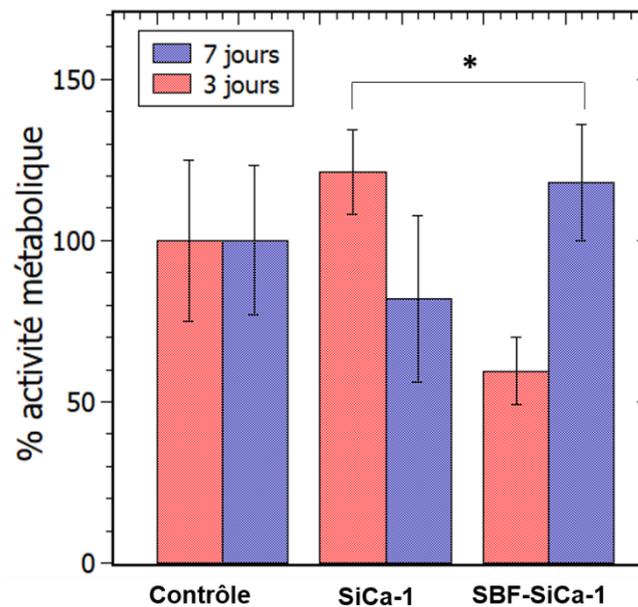


Figure 3.11 : résultats MTT des échantillons obtenus après incubation durant 3 jours et 7 jours avec des CSM, $n = 3$, $*p > 0,05$.

6. Conclusion

La quantité de calcium et la surface spécifique sont les paramètres majeurs impactant le mécanisme de bioactivité des verres bioactifs. Jusqu'à présent, il était difficile d'identifier exclusivement le rôle de chaque paramètre, car ils variaient simultanément dans de nombreuses études. Dans le but d'étudier le seul effet de la composition, des nanoparticules de verre bioactif caractérisées par une surface spécifique identique, mais avec différents ratios Ca/Si effectifs ont été synthétisées. Il a été possible de varier leur composition en oxyde de calcium (CaO) entre 6,9 et 15,4 %mol par variation du moment d'ajout du sel de calcium dans le milieu réactionnel, selon un protocole établi dans le chapitre 2 (modification du procédé Stöber). Les tests *in vitro* effectués dans le SBF ont montré que l'augmentation du ratio effectif Ca/Si accélère la précipitation de l'HAp. Néanmoins, cet effet est plutôt peu significatif dans le domaine de composition étudié, ce qui suggère que la bioactivité n'est pas principalement impactée par la teneur en calcium. En outre, les essais préliminaires de biocompatibilité effectués sur SiCa-1 (particules brutes et pré-conditionnées dans du SBF) n'ont montré aucune cytotoxicité significative en présence de cellules souches mésenchymateuses, et ce jusqu'à 7 jours d'incubation. Cet échantillon est par conséquent très prometteur pour une application dans le domaine de la régénération osseuse.

7. Références

- (1) Kokubo, T.; Takadama, H. How Useful Is SBF in Predicting in Vivo Bone Bioactivity? *Biomaterials* **2006**, 27 (15), 2907–2915.
- (2) El-Rashidy, A. A.; Waly, G.; Gad, A.; Hashem, A. A.; Balasubramanian, P.; Kaya, S.; Boccaccini, A. R.; Sami, I. Preparation and in Vitro Characterization of Silver-Doped Bioactive Glass Nanoparticles Fabricated Using a Sol-Gel Process and Modified Stöber Method. *Journal of Non-Crystalline Solids*.
- (3) Saravanapavan, P.; Hench, L. L. Low-Temperature Synthesis, Structure, and Bioactivity of Gel-Derived Glasses in the Binary CaO-SiO₂ System. *Journal of Biomedical Materials Research* **2001**, 54 (4), 608–618.
- (4) Lei, B.; Chen, X.; Han, X.; Zhou, J. Versatile Fabrication of Nanoscale Sol-Gel Bioactive Glass Particles for Efficient Bone Tissue Regeneration. *Journal of Materials Chemistry* **2012**, 22 (33), 16906.
- (5) Martínez, A.; Izquierdo-Barba, I.; Vallet-Regí, M. Bioactivity of a CaO-SiO₂ Binary Glasses System. *Chemistry of Materials* **2000**, 12 (10), 3080–3088.

- (6) Li, R.; Clark, A. E.; Hench, L. L. An Investigation of Bioactive Glass Powders by Sol-Gel Processing. *J. App. Biomater.* **1991**, 2 (4), 231–239.
- (7) Oliveira, A. A. R. de; Souza, D. A. de; Dias, L. L. S.; Carvalho, S. M. de; Mansur, H. S.; Pereira, M. de M. Synthesis, Characterization and Cytocompatibility of Spherical Bioactive Glass Nanoparticles for Potential Hard Tissue Engineering Applications. *Biomed. Mater.* **2013**, 8 (2), 025011.
- (8) Leonova, E.; Izquierdo-Barba, I.; Arcos, D.; López-Noriega, A.; Hedin, N.; Vallet-Regí, M.; Edén, M. Multinuclear Solid-State NMR Studies of Ordered Mesoporous Bioactive Glasses. *J. Phys. Chem. C* **2008**, 112 (14), 5552–5562.
- (9) Lin, S.; Ionescu, C.; Pike, K. J.; Smith, M. E.; Jones, J. R. Nanostructure Evolution and Calcium Distribution in Sol-Gel Derived Bioactive Glass. *J. Mater. Chem.* **2009**, 19 (9), 1276–1282.
- (10) Roman, J.; Padilla, S.; Vallet-Regi, M. Sol- Gel Glasses as Precursors of Bioactive Glass Ceramics. *Chemistry of materials* **2003**, 15 (3), 798–806.
- (11) Aguiar, H.; Serra, J.; González, P.; León, B. Structural Study of Sol-Gel Silicate Glasses by IR and Raman Spectroscopies. *Journal of Non-Crystalline Solids* **2009**, 355 (8), 475–480.
- (12) Salinas, A. J.; Vallet-Regi, M.; Izquierdo-Barba, I. Biomimetic Apatite Deposition on Calcium Silicate Gel Glasses. *Journal of Sol-Gel Science and Technology* **2001**, 21 (1), 13–25.
- (13) Glock, K.; Hirsch, O.; Rehak, P.; Thomas, B.; Jäger, C. Novel Opportunities for Studying the Short and Medium Range Order of Glasses by MAS NMR, ^{29}Si Double Quantum NMR and IR Spectroscopies. *Journal of Non-Crystalline Solids* **1998**, 232–234, 113–118.
- (14) Hayashi, T.; Saito, H. Preparation of CaO-SiO₂ Glasses by the Gel Method. *J Mater Sci* **1980**, 15 (8), 1971–1977.
- (15) Meiszterics, A.; Rosta, L.; Peterlik, H.; Rohonczy, J.; Kubuki, S.; Henits, P.; Sinkó, K. Structural Characterization of Gel-Derived Calcium Silicate Systems. *J. Phys. Chem. A* **2010**, 114 (38), 10403–10411.
- (16) Zheng, K.; Solodovnyk, A.; Li, W.; Goudouri, O.-M.; Stähli, C.; Nazhat, S. N.; Boccaccini, A. R. Aging Time and Temperature Effects on the Structure and Bioactivity of Gel-Derived 45S5 Glass-Ceramics. *J. Am. Ceram. Soc.* **2015**, 98 (1), 30–38.
- (17) Clark, A. E.; Pantano, C. G.; Hench, L. L. Auger Spectroscopic Analysis of Bioglass Corrosion Films. *Journal of the American Ceramic Society* **1976**, 59 (1–2), 37–39.
- (18) Hench, L. L. Bioceramics: From Concept to Clinic. *Journal of the American Ceramic Society* **1991**, 74 (7), 1487–1510.

- (19) Grela, E.; Kozłowska, J.; Grabowiecka, A. Current Methodology of MTT Assay in Bacteria – A Review. *Acta Histochemica* **2018**, 120 (4), 303–311.
- (20) Burdon, R. H.; Gill, V.; Rice-evans, C. Reduction of a Tetrazolium Salt and Superoxide Generation in Human Tumor Cells (HeLa). *Free Radical Research Communications* **1993**, 18 (6), 369–380.
- (21) Slater, T. F.; Sawyer, B.; Strauli, U. Reductase Systems III. Points of Coupling of Four Different Tetrazolium Salts. *Biochim. Biophys. Acta* 11.
- (22) Ciraldo, F. E.; Boccardi, E.; Melli, V.; Westhauser, F.; Boccaccini, A. R. Tackling Bioactive Glass Excessive in Vitro Bioreactivity: Preconditioning Approaches for Cell Culture Tests. *Acta Biomaterialia* **2018**, 75, 3–10.

Chapitre 4 :

**Élaboration de nanoparticules magnétiques
et bioactives ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3@ \text{SiO}_2\text{-CaO}$)**

1. Introduction

L'hyperthermie magnétique est une thérapie très prometteuse qui consiste en la destruction de cellules cancéreuses grâce à la chaleur produite par une source magnétique sous champ magnétique alternatif.^{1,2}

Ces dernières années, de nouveaux matériaux céramiques multifonctionnels comprenant une source magnétique et une partie bioactive, ont été développés. En effet, de tels matériaux pourraient être très utiles pour le traitement de tumeurs difficilement atteignables par les méthodes usuelles, comme certaines métastases osseuses,³ et ils permettraient également la réparation osseuse dans le défaut créé par les lésions. De plus, les particules magnétiques resteraient potentiellement fixées à l'endroit considéré, permettant ainsi de traiter une éventuelle résurgence de la tumeur par hyperthermie sans nouvelle opération chirurgicale.

La Figure 4.1 présente la façon dont pourrait être utilisé un tel matériau :

- **Étape 1** : Exérèse de toute la masse tumorale par une intervention chirurgicale.
- **Étape 2** : Insertion du matériau multifonctionnel dans le défaut osseux.
- **Étape 3** : Traitement par hyperthermie magnétique pour s'assurer de la destruction complète des cellules cancéreuses. En cas de résurgence, un traitement supplémentaire pourra être effectué ultérieurement.
- **Étape 4** : Minéralisation dans le défaut osseux grâce à la propriété bioactive des particules.

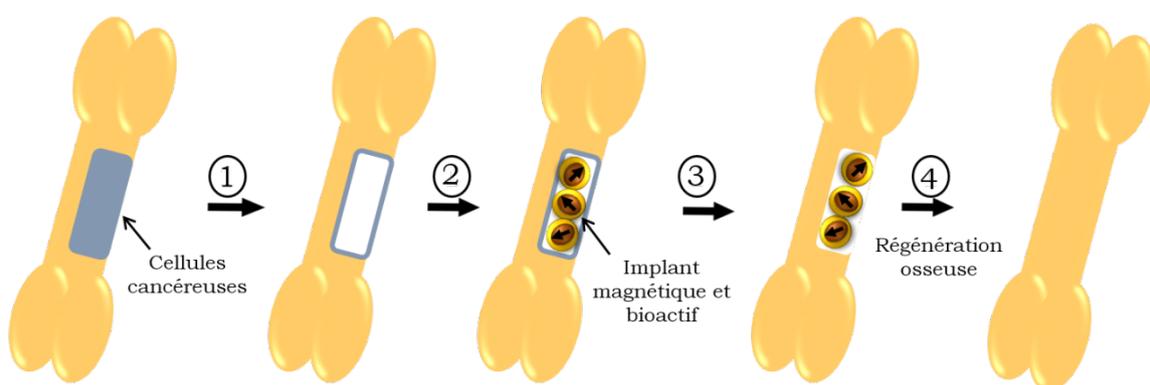


Figure 4.1: schéma représentatif du principe d'action de particules magnétiques et bioactives.

Dans la littérature, la majorité des céramiques bioactives et magnétiques présentées sont élaborées par fusion,⁴⁻⁷ une méthode qui ne permet pas le contrôle fin des propriétés bioactives, magnétiques, morphologiques et de

l'homogénéité chimique du matériau. Grâce à la versatilité du procédé sol-gel, il est possible aujourd'hui de contrôler l'ensemble des propriétés sus mentionnées.

Dans ce chapitre, la synthèse et la caractérisation de nanoparticules de céramiques bioactives et magnétiques constituées de nanoparticules superparamagnétiques de maghémite et de verre bioactif sont présentées.

2. Synthèse de nanoparticules multifonctionnelles

Dans le but de combiner les 2 propriétés (superparamagnétisme et bioactivité) au sein d'un même matériau, une structure cœur coquille a été choisie. L'élaboration se fait donc en 2 étapes principales : (i) *élaboration de nanoparticules de maghémite dans le régime superparamagnétique*, puis (ii) *formation d'une coquille bioactive autour des nanoparticules magnétiques*.

2.1. Synthèse et caractérisation des nanoparticules de maghémite

Notre choix de synthèse s'est porté sur la méthode développée par Massart⁸ conduisant à l'obtention de nanoparticules de magnétite par co-précipitation d'ions ferreux et ferriques en milieu basique, la maghémite étant finalement obtenue par oxydation de la magnétite. Par ailleurs, la simplicité, la rapidité et surtout la possibilité d'obtenir une grande quantité de particules magnétiques en un seul batch, ont guidé notre choix pour cette méthode de synthèse plutôt qu'une autre (microémulsion, polyol, hydrothermale, décomposition thermique de précurseurs organométalliques).⁹

Selon Jolivet *et al.*¹⁰ la formation de la structure spinelle s'effectue selon la théorie classique de nucléation et de croissance. Le chemin réactionnel qui en découle est représenté schématiquement en Figure 4.2.

Tout d'abord, la dissolution des sels de fer en solution génère la formation de précurseurs de charge nulle. À partir d'une concentration critique (C_0), des germes se forment de façon « explosive » en solution *via* la polycondensation (olation et oxolation) des précurseurs de charge nulle, et ce jusqu'à ce que leur concentration revienne au voisinage de C_0 . La vitesse de nucléation devient très faible et les germes croissent par diffusion du soluté à leur surface. Puis, une étape de vieillissement impliquant la restructuration des particules par les phénomènes de mûrissement d'Ostwald ou d'agrégation peut survenir.

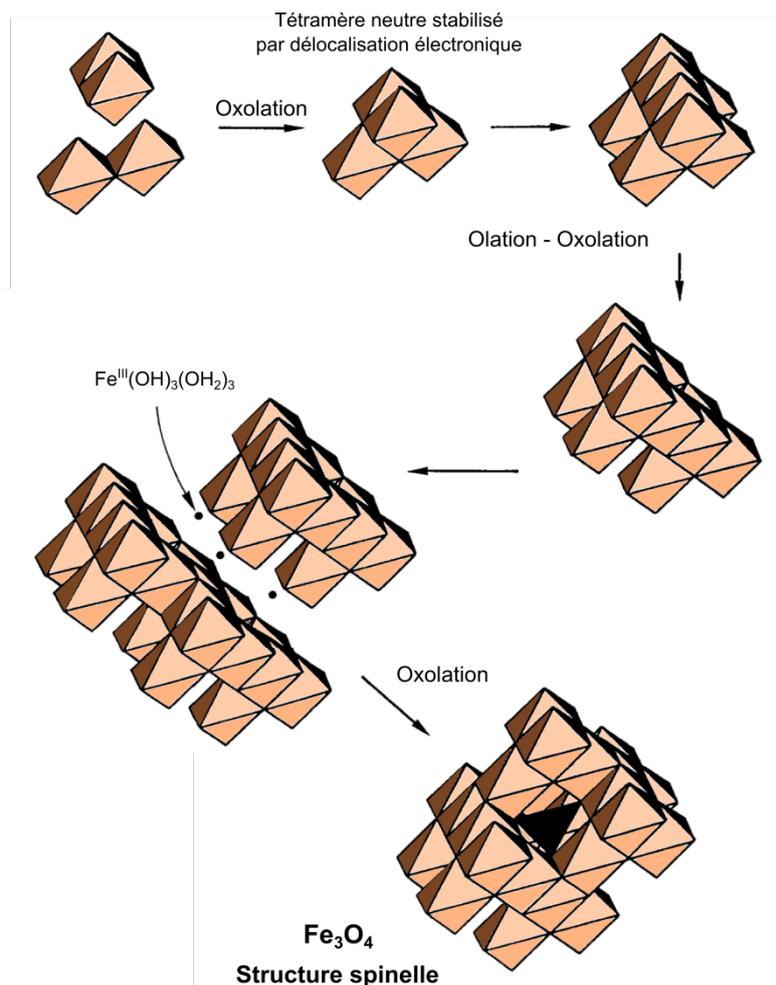


Figure 4.2 : mécanisme de formation de la superstructure spinelle de la magnétite.¹⁰

2.1.1. Protocole de synthèse

2.1.1.1. Formation de la magnétite

Des nanoparticules de magnétite ont été formées spontanément en milieu ammoniacal par ajout de 11,4 mL de NH_4OH concentré (14,8 M) à une solution aqueuse acide (pH = 0,06) contenant les chlorures de fer ($[\text{Fe}^{2+}] = [\text{Fe}^{3+}] = 0,54 \text{ M}$). La solution noirâtre obtenue a été laissée sous agitation pendant 30 min puis décantée grâce à un aimant et lavée 2 fois à l'eau déionisée. L'équation bilan résultant de cette réaction chimique s'écrit :



2.1.1.2. Oxydation de la magnétite en maghémite

Les particules de maghémite ont été obtenues par oxydation de la magnétite en 2 étapes. La première correspond à la dispersion des particules de magnétite dans 4,9 mL d'une solution aqueuse d'acide nitrique (2 M), ce qui

les deux oxydes de fer présentent des paramètres de maille différents, à savoir $a = 0,839$ nm (JCPDS 19-0629) pour la magnétite et $a = 0,835$ nm (JCPDS 39-1346) pour la maghémite.

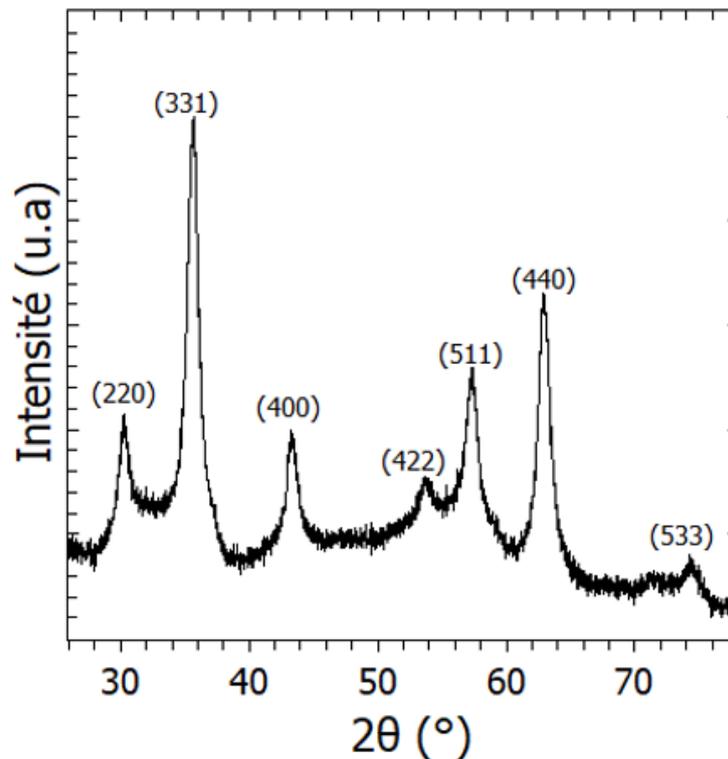


Figure 4.4 : diffractogramme des particules magnétiques élaborées par la méthode de co-précipitation.

Pour ce faire, une analyse par diffraction des rayons X sur poudre a été effectuée sur un mélange échantillon + standard (LaB_6) afin de pouvoir corriger précisément tout décalage des raies dû à un mauvais positionnement de l'échantillon en hauteur. La méthode de préparation utilisée ne menant à aucun décalage des raies de diffraction, le paramètre de maille a été affiné par la méthode d'affinement de profil avec contrainte de maille (cf. Figure 4.5) sur un diffractogramme de l'échantillon seul. La valeur du paramètre de maille obtenue est $a = 0,835$ nm ($\pm 0,001$), une valeur similaire à la valeur théorique de la maghémite, ce qui prouve que la ferrite élaborée est bien constituée purement de maghémite.

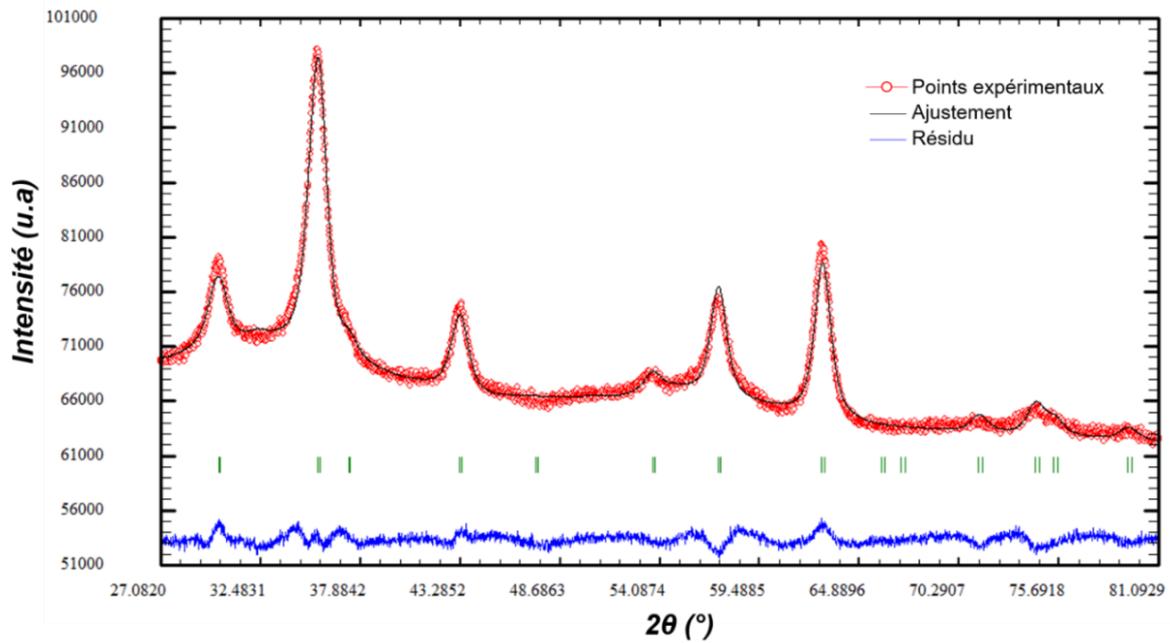


Figure 4.5 : diffractogramme expérimental des particules magnétiques (en rouge), résultat de l'ajustement de profil par contrainte de maille (en noir), différence entre le diagramme expérimental et le simulé (en bleu).

La nature de la phase magnétique a également été vérifiée par FTIR, notamment grâce à la position des bandes de vibration des liaisons Fe-O-Fe comprises entre 400 et 800 cm^{-1} (Figure 4.6). La présence des bandes d'absorption vers 630 et 576 cm^{-1} justifie la formation de maghémite avec une distribution désordonnée des lacunes cationiques.¹²

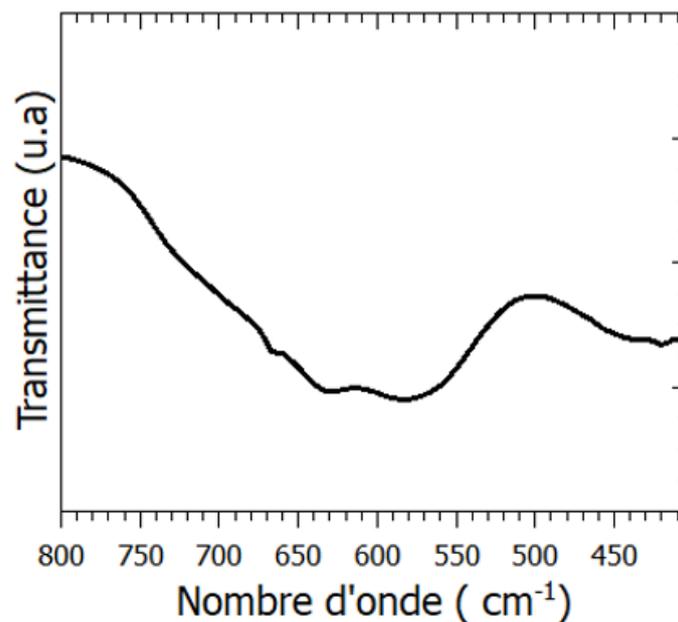


Figure 4.6 : spectre IR des particules de maghémite.

2.1.2.2 Caractérisation morphologique et état d'agglomération

L'observation des particules de maghémite par microscopie électronique à transmission (Figure 4.7) montre qu'elles sont de morphologie irrégulière, mais plutôt sphéroïdale. Le diamètre moyen évalué par ajustement de l'histogramme de taille à l'aide d'une fonction log-normale est estimé à 11 ± 4 nm. La dispersion en taille associée étant de 36 %, les nanoparticules de maghémite sont polydisperses en taille malgré l'étape de centrifugation effectuée en fin de synthèse. Cette polydispersité est caractéristique de la méthode de synthèse utilisée et est essentiellement due au chevauchement des phases de nucléation et de croissance durant le processus de formation des particules.

Il convient également de noter que les nanoparticules semblent être dans un état d'agglomération important. Ce n'est cependant qu'un effet de la préparation des grilles MET, car d'une part, des mesures de taille par diffusion dynamique de la lumière ont montré des particules uniques et d'autre part, le ferrofluide est parfaitement stable dans le temps (pas de floculation).

En outre, la visualisation des plans atomiques de diffraction par analyse MET haute résolution (voir Figure 4.8) montre que les nanoparticules de maghémite synthétisées présentent une très bonne cristallinité.¹³

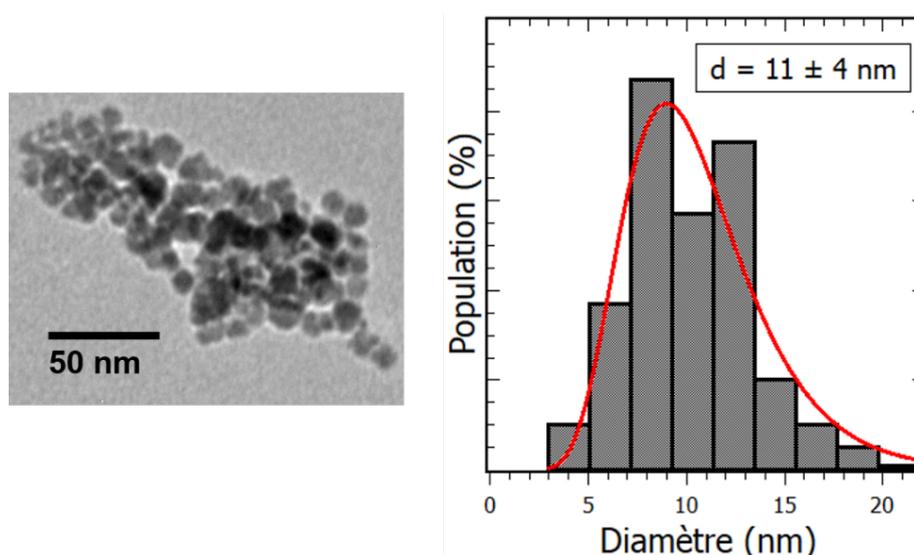


Figure 4.7 : image MET et histogramme de taille des nanoparticules de maghémite élaborées par la méthode de co-précipitation.

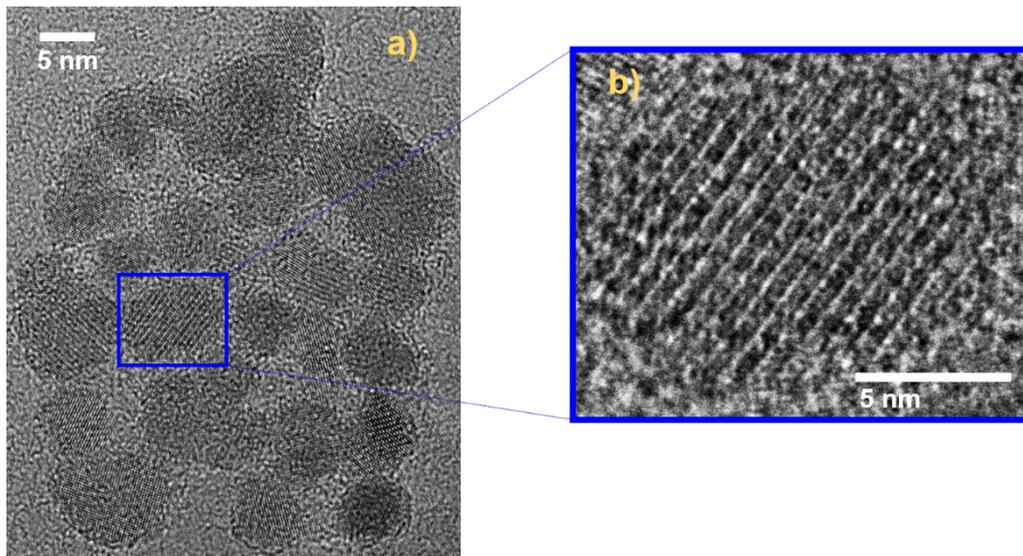


Figure 4.8 : a) image à haute résolution de nanoparticules de maghémite, b) vue élargie d'une nanoparticule.

Les particules magnétiques ont été synthétisées en solution par une variante de la méthode Massart. L'oxydation totale de la magnétite en maghémite a été prouvée par l'affinement du diffractogramme de l'échantillon. Le diamètre moyen des particules de 11 nm et leur dispersion en taille de 36% montrent qu'elles sont bien nanométriques avec une relativement faible polydispersité en taille.

2.2. Formation de la coquille bioactive

La formation d'une coquille bioactive autour des nanoparticules de maghémite a été effectuée par modification du procédé Stöber décrit dans le chapitre 2 (élaboration de nanoparticules bioactives). Comme pour ces dernières, la propriété bioactive est obtenue après insertion d'ions Ca^{2+} dans la couche de silice préformée après traitement thermique. La croissance de la coquille a été découplée de l'étape d'insertion de calcium afin d'éviter des effets indésirables sur les propriétés texturales du matériau.

2.2.1. Protocole de synthèse

2.2.1.1. Fonctionnalisation de la surface des nanoparticules de maghémite et peptisation

Une meilleure stabilisation en solution des nanoparticules magnétiques s'impose, car leur forte réactivité conduirait à un état d'agglomération très important dans le composite final.¹⁴ Ainsi, la surface des nanoparticules a été fonctionnalisée par l'acide citrique, un complexant organique qui va permettre d'augmenter leur charge de surface¹⁵ et ainsi améliorer leur

stabilité colloïdale par répulsion électrostatique dans un large domaine de pH.

Pour ce faire, 0,97 mL de ferrofluide (73 mg_{Fe₂O₃}/mL) ont été dispersés dans une solution aqueuse d'acide citrique (0,3 M). Ensuite le mélange a été mis sous agitation pendant 30 min. Après décantation et 3 lavages à l'acétone, les nanoparticules fonctionnalisées ont été stabilisées dans un mélange H₂O/NH₄OH (5 mL/0,5 mL). Cette solution correspond à la « solution 1 ».

2.2.1.2. Formation de la coquille de silice

La formation homogène d'une couche de silice à la surface des nanoparticules magnétique est une étape au contrôle difficile, car dépendant fortement de plusieurs paramètres de synthèse, à savoir la concentration du précurseur de silice (TEOS), de la base (NH₄OH) et du ratio volumique EtOH_{abs}/H₂O (V_E/V_H).

Selon les études de Deng *et al.*¹⁶, une trop faible concentration d'ammoniaque (inférieure à 0,09 M) induit une croissance non uniforme de la couche de silice autour des particules magnétiques tandis qu'une concentration trop élevée (supérieure à 0,2 M) favorise la croissance homogène de particules de silice en solution, en plus de l'obtention de particules cœur-coquille (croissance hétérogène). Cette séparation de phase a également été observée par les auteurs lorsque le ratio V_E/V_H est inférieur à 2. Il existe par ailleurs une concentration minimale de TEOS (0,009 M) à partir de laquelle les particules magnétiques sont totalement recouvertes.

Pour notre protocole de synthèse, nous avons choisi de fixer la concentration de NH₄OH et le ratio V_E/V_H respectivement à 0,09 M et 3. La quantité de TEOS requise pour la formation d'une coquille uniforme a été calculée en utilisant l'équation ci-dessous :

$$V_{TEOS} = N_{part} \left[\frac{(\rho_{SiO_2} \cdot M_{TEOS})}{(M_{SiO_2} \cdot \rho_{TEOS})} \right] V_{SiO_2} \quad \text{avec}$$

$$N_{part} = \frac{m_{\gamma-Fe_2O_3}}{\rho_{\gamma-Fe_2O_3} \cdot V_{\gamma-Fe_2O_3}} \quad \text{et}$$

$$V_{SiO_2} = \frac{4\pi}{3} \left[(r + e_{coquille})^3 - r^3 \right]$$

où ρ_{SiO_2} , M_{SiO_2} , V_{SiO_2} , sont respectivement la masse volumique, la masse molaire et le volume de la silice et ρ_{TEOS} , M_{TEOS} , V_{TEOS} , la masse volumique, la masse molaire et le volume de TEOS. N_{part} est le nombre de particules de maghémite.

Notre but étant de former une coquille de 10 nm d'épaisseur autour d'une particule de maghémite unique, le volume de TEOS à prélever calculé est de 6,1 mL.

En plus de la solution de particules magnétiques fonctionnalisées (« solution 1 »), deux autres solutions ont été préparées séparément à température ambiante :

- « solution 2 » : 6,1 mL (0.14 M) de TEOS dans 100 mL d'EtOH_{abs}.
- « solution 3 » : 2 mL de NH₄OH, 58,5 mL de H₂O déionisée et 87,5 mL de EtOH_{abs}.

Après avoir maintenu sous agitation les solutions 2 et 3 durant 10 min, la dispersion de nanoparticule de maghémite fonctionnalisée a été versée rapidement dans la solution 3. Puis, 10 min plus tard, la solution 2 a été ajoutée au mélange précédent et le tout a été laissé sous agitation pendant 3 heures.

2.2.1.3. Insertion du calcium dans la coquille de silice

Par la suite, 1,9 g de nitrate de calcium tétrahydraté (préalablement dissous dans 2 mL d'eau déionisée) ont été ajoutés dans la solution, puis le tout a été laissé sous agitation pendant 21h. Un précipité de couleur orange sombre a été récupéré après centrifugation (6297 g/10 min) puis lavé plusieurs fois à l'eau déionisée dans le but d'éliminer les réactifs n'ayant pas réagi. Le solide obtenu a ensuite été séché à 60°C dans une étuve et traité thermiquement à 650°C pendant 3h dans un four à moufle afin de permettre la diffusion du calcium dans le réseau vitreux.

Le protocole détaillé de la synthèse de ces hétérostructures est présenté en Annexe 3.

2.2.2. Caractérisations morphologique et structurale et composition des particules élaborées

2.2.2.1. Caractérisation morphologique et état d'agglomération

Une image MET des hétérostructures élaborées par modification du procédé Stöber est présentée en Figure 4.9. On observe qu'elles sont de morphologie relativement sphérique avec une structure multi cœur-coquille.

Un tel résultat peut être expliqué par l'étude de la stabilité colloïdale des nanoparticules de maghémite dans le milieu réactionnel.¹⁷ La fonctionnalisation de la maghémite par l'acide citrique permet de modifier son potentiel de surface, qui à pH constant évolue vers des valeurs plus négatives. L'ajout de l'ammoniaque au cours de la phase de peptisation

induit une déprotonation des groupements carboxyliques de surface si bien que la densité de charges négatives devient de plus en plus importante (pKa de l'acide citrique de 3,13, 4,76 et 6,40). Le bilan global des interactions électrostatiques dans la solution étant répulsif, une bonne dispersion des nanoparticules de maghémite peut être obtenue.

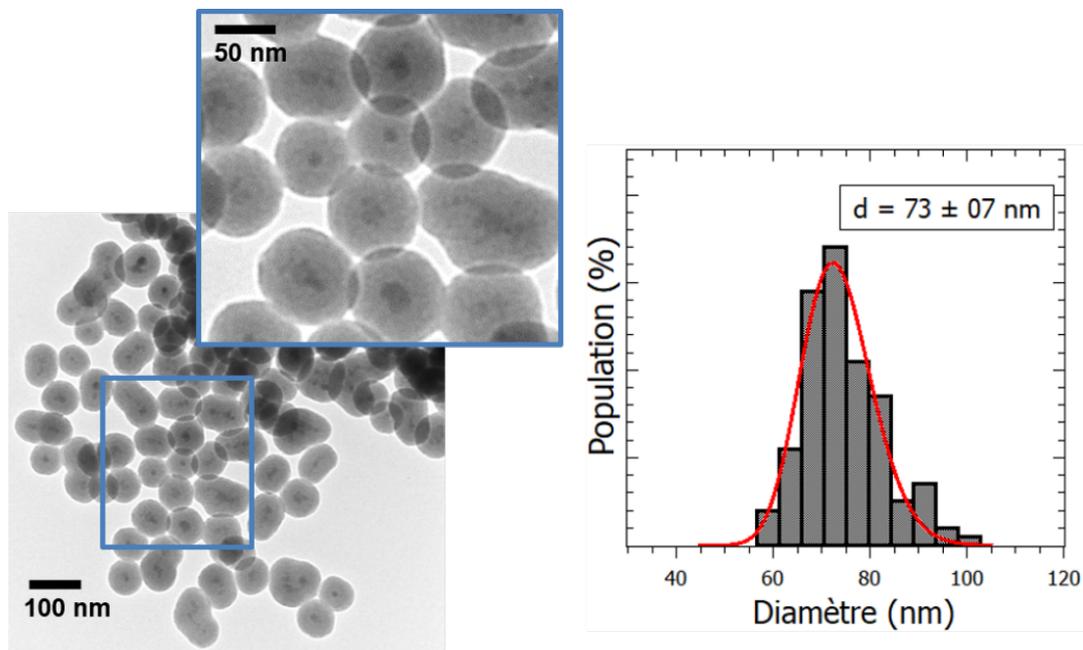


Figure 4.9 : image MET et histogramme de taille des hétérostructures.

À titre illustratif, la Figure 4.10 présente l'évolution du potentiel zêta des nanoparticules magnétiques, de l'étape de fonctionnalisation jusqu'à celle de peptisation.

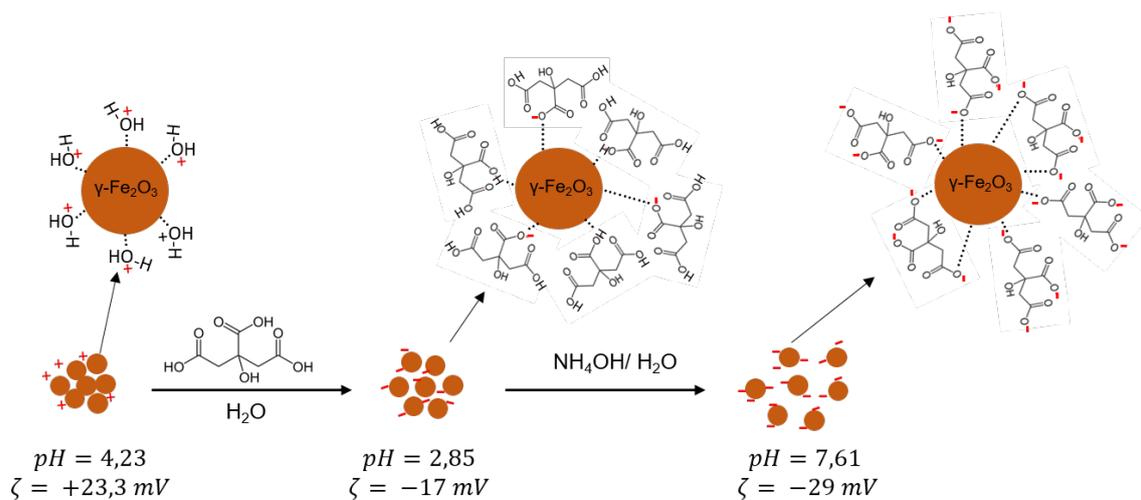


Figure 4.10 : évolution de la charge de surface des nanoparticules de maghémite en fonction du pH.

Les nanoparticules étant fortement chargées en surface, elles sont très bien dispersées dans le milieu réactionnel et elles présentent une affinité élevée pour une polymérisation uniforme de la silice due à une condensation préférentielle entre la surface très nucléophile des nanoparticules de maghémite fonctionnalisées (acidité élevée) et les espèces monomères (faible acidité).¹⁸ Il a été d'ailleurs proposé un schéma représentatif du mécanisme de formation de la coquille de silice (voir Figure 4.11).¹⁹

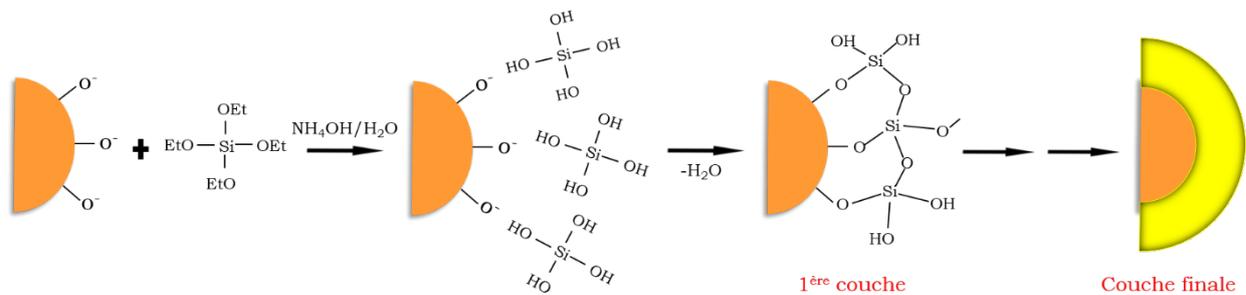


Figure 4.11 : mécanisme de formation d'une coquille de silice selon Srdić et al.¹⁹

Dans notre cas, malgré l'étape de stabilisation surfacique des nanoparticules de maghémite, la croissance de la coquille de silice s'est plutôt faite autour d'agrégats et non pas de particules uniques, on a donc obtenu des particules à structure multi cœur-coquille. Cela peut s'expliquer par une séparation insuffisante des particules en solution (concentration trop élevée ou charge de surface trop faible pour assurer une bonne répulsion électrostatique).

Le diamètre des particules évalué par ajustement de l'histogramme de taille à l'aide d'une fonction log-normale est de 73 ± 7 nm. On constate ainsi que les hétérostructures élaborées sont nanométriques avec une faible dispersion en taille (dispersion en taille d'environ 10%).

Par ailleurs, leur potentiel de surface final est de -15 mV, ce qui explique le fait qu'elles ne soient pas agglomérées et qu'elles présentent une relativement bonne stabilité colloïdale. Cette valeur confirme une fois de plus que les ions Ca^{2+} ont très peu d'impact sur l'état d'agglomération des particules lorsque le sel de calcium est ajouté à minima 2h après le début de la réaction sol-gel ($H \geq 2h$, cf. paragraphe 3.2.1 du chapitre 2). Il est également important de noter que les valeurs de concentration en NH_4OH et du ratio V_E/V_H choisies ont permis d'obtenir uniquement des hétérostructures, qu'il n'y a pas eu de séparation de phase lors de la synthèse.

2.2.2.2. Caractérisation structurale et composition

On retrouve dans le spectre IR des hétérostructures (voir Figure 4.12a) les bandes d'absorption caractéristiques du réseau vitreux déjà mises en évidence dans le cas des nanoparticules bioactives (cf. chapitre 3 paragraphe 2.3). En outre, on peut observer une faible bande d'absorption de la liaison Fe-O-Fe vers 640 cm^{-1} qui indique la présence d'oxyde de fer dans la matrice de silice.²⁰

La phase cristalline de l'échantillon a été analysée par diffraction des rayons X sur poudre. Tel qu'observé sur la Figure 4.12b, les pics de diffraction de la maghémite sont toujours visibles même si leur intensité est relativement faible à cause de leur faible proportion dans la poudre et de la présence de la bande amorphe de la coquille bioactive. Aucune autre phase cristalline n'est présente sur le diffractogramme ce qui confirme la pureté chimique de l'échantillon synthétisé (pas de cristallisation de silicates de calcium par exemple).

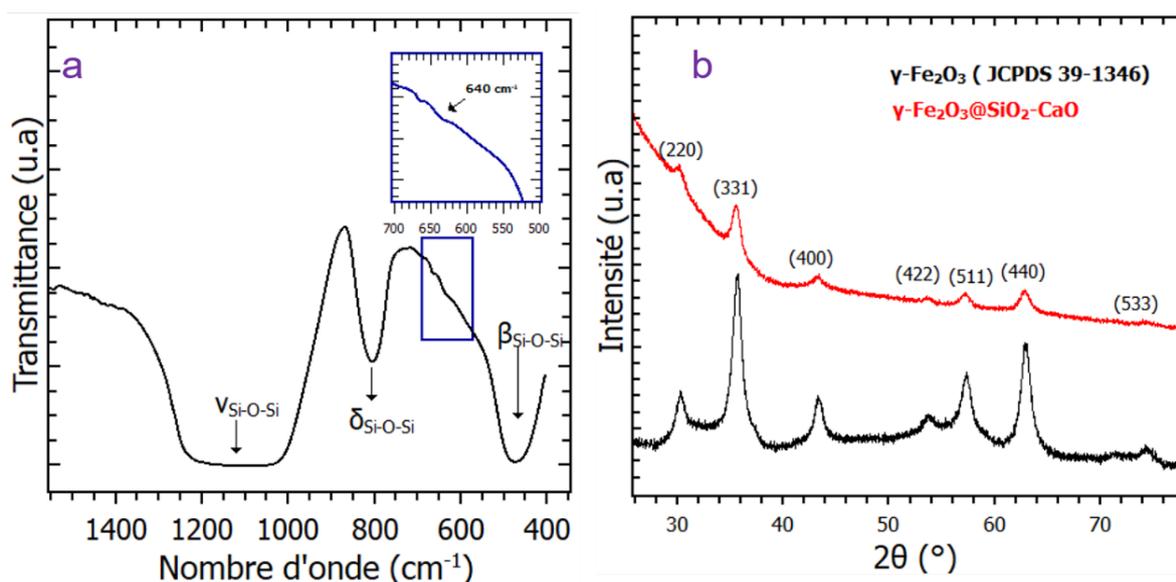


Figure 4.12 : a) spectre IR et b) diffractogramme des hétérostructures nanométriques.

La composition fine de l'échantillon a été déterminée par spectrométrie à plasma à couplage inductif (voir Tableau 4.1). Environ 57 % de la quantité de calcium initialement dans le milieu réactionnel a été insérée dans la coquille de silice, ce qui est en accord avec les résultats obtenus dans les chapitres 2 et 3. À noter qu'une grande quantité de maghémite (71%) a bien été encapsulée dans la matrice bioactive.

	SiO ₂	CaO	Fe ₂ O ₃
Composition nominale (%molaire)	76,2	22,4	1,4
Composition réelle (%molaire)	86,2 ± 0,7	12,8 ± 0,1	1,02 ± 0,01

Tableau 4.1 : composition nominale et réelle des hétérostructures élaborées.

Des nanoparticules à structure multi cœur-coquille (γ -Fe₂O₃@SiO₂-CaO) monodisperses en taille et non agglomérées ont été synthétisées par modification du procédé Stöber. La formation de la couche de silice autour des nanoparticules de maghémite est l'étape cruciale à contrôler. Il faut travailler à forte dilution et avec un ratio $V_E/V_H > 2$ afin de favoriser une croissance hétérogène de la silice autour des nanoparticules de maghémite et fonctionnaliser la surface des particules magnétiques avec de l'acide citrique afin d'améliorer leur dispersion en milieu ammoniacal.

3. Étude des propriétés magnétiques et d'hyperthermie

3.1. Propriétés magnétiques

3.1.1. Courbes d'aimantation $M(H)$ à 10 K et à 300 K

Des courbes d'aimantation en fonction du champ magnétique $M(H)$ ont été enregistrées respectivement à 10 K et à 300 K pour les nanoparticules de maghémite brute et les hétérostructures à l'aide d'un magnétomètre à SQUID. Les valeurs d'aimantation ainsi mesurées ont été normalisées par rapport à la masse d'oxyde de fer contenue dans chaque échantillon.

Il peut être observé sur la Figure 4.13 que le comportement magnétique des 2 échantillons est identique. Leurs courbes $M(H)$ à 10 K présentent une très faible coercivité (Tableau 4.2) alors que celles enregistrées à 300 K ne présentent aucune boucle d'hystérésis. Un tel comportement magnétique à température ambiante est caractéristique du régime superparamagnétique. Il convient également de mentionner que les valeurs d'aimantation à saturation (M_s) obtenues à 300 K répertoriées dans le Tableau 4.2 sont inférieures à celle de la maghémite à l'état massif ($M_s = 75$ emu/g). Cette diminution systématiquement observée dans la littérature est à attribuer à la taille nanométrique des particules magnétiques, dont le très fort ratio

surface/volume exacerbe l'effet délétère du désordre des spins de surface (spin canting) sur l'aimantation à saturation.¹³

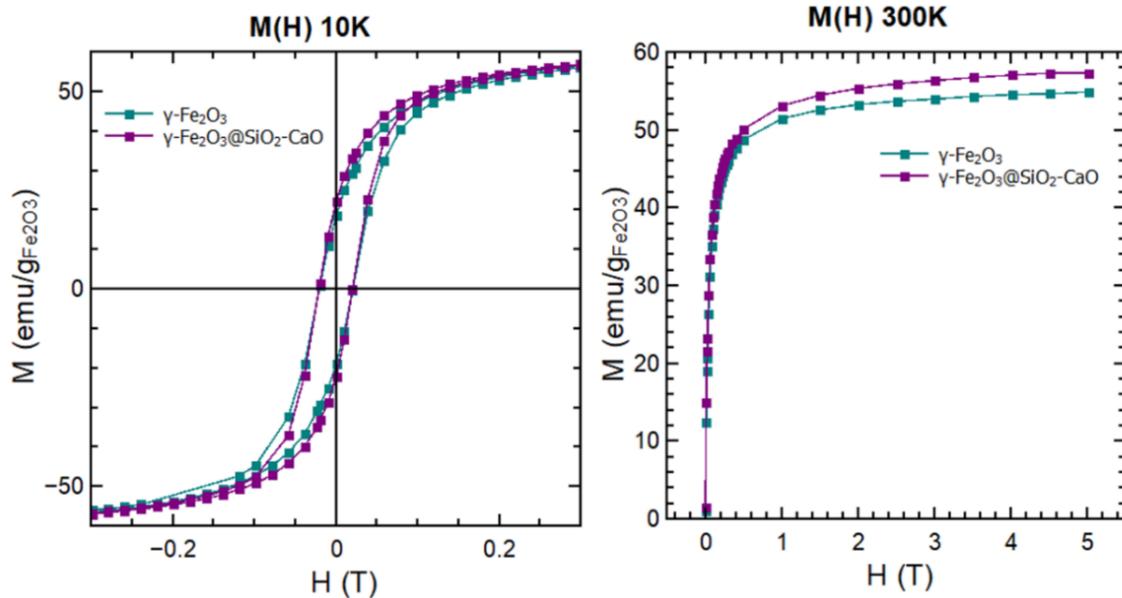


Figure 4.13 : courbes d'aimantation $M(H)$ des nanoparticules brutes de maghémite et des hétérostructures nanométriques enregistrées à 10 K et à 300 K.

Échantillons	M_s (300 K) (emu/g $_{Fe_2O_3}$)	$\mu_0 H_c$ (10 K) (G)
$\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$	55 ± 2	210
$\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3@\text{SiO}_2\text{-CaO}$	57 ± 1	210

Tableau 4.2 : valeur de l'aimantation à saturation (M_s) et du champ coercitif ($\mu_0 H_c$) des échantillons mesurés respectivement à 300 K et à 10 K.

3.1.2. Mesures ZFC-FC

Les courbes Zero Field Cooled-Field Cooled sous 25G (ZFC-FC) des 2 échantillons ont été enregistrées afin d'évaluer leur température de blocage T_B , température à partir de laquelle l'énergie thermique permet d'induire le retournement de l'aimantation sur l'axe de facile aimantation.

De façon pratique, la branche ZFC s'obtient par refroidissement de l'échantillon de la température ambiante à la plus basse température atteignable par le magnétomètre, sous champ magnétique nul. Puis un faible champ magnétique de 25 G est appliqué et l'évolution de l'aimantation est suivie lors du réchauffement de l'échantillon. La branche FC quant à elle, s'obtient après refroidissement sous champ magnétique (25 G) de

l'échantillon. De la même manière que pour la ZFC, l'aimantation est mesurée lors de la remontée en température, sous champ magnétique.

L'allure de la branche ZFC dépend de la distribution de température de blocage des nanoparticules magnétiques (dépendante de leur anisotropie et de leur volume). Lorsque les particules sont monodisperses en taille, la température de blocage correspond à un maximum piqué T_{max} de la branche ZFC. Pour une assemblée de particules polydisperses en taille, la température de blocage ne peut être assimilée à cette température maximale de la ZFC.²¹ Cependant, il est toujours possible de comparer des échantillons si la dispersion en taille est similaire.

Il est intéressant de noter que la température maximale de la ZFC est différente pour les particules de maghémite brutes ($T_{max} = 205$ K) et pour les hétérostructures ($T_{max} = 93$ K) (Figure 4.14) alors que les particules utilisées sont les mêmes (elles ont la même distribution de taille). Ceci peut-être expliqué par des interactions dipolaires magnétiques beaucoup moins importantes dans le cas des hétérostructures, dues à l'espacement plus important des particules magnétiques induit par la coquille bioactive. Cet effet des interactions dipolaires magnétiques est souvent reporté dans la littérature.^{22,23} L'augmentation de la force des interactions dipolaires entraîne une augmentation de la constante d'anisotropie effective (K) et donc de l'énergie de la barrière (KV) séparant les 2 états d'aimantation. Il en résulte que le temps de relaxation magnétique augmente, ce qui a pour conséquence un déplacement de T_B vers des températures élevées. C'est bien ce que l'on retrouve ici en Figure 4.14.

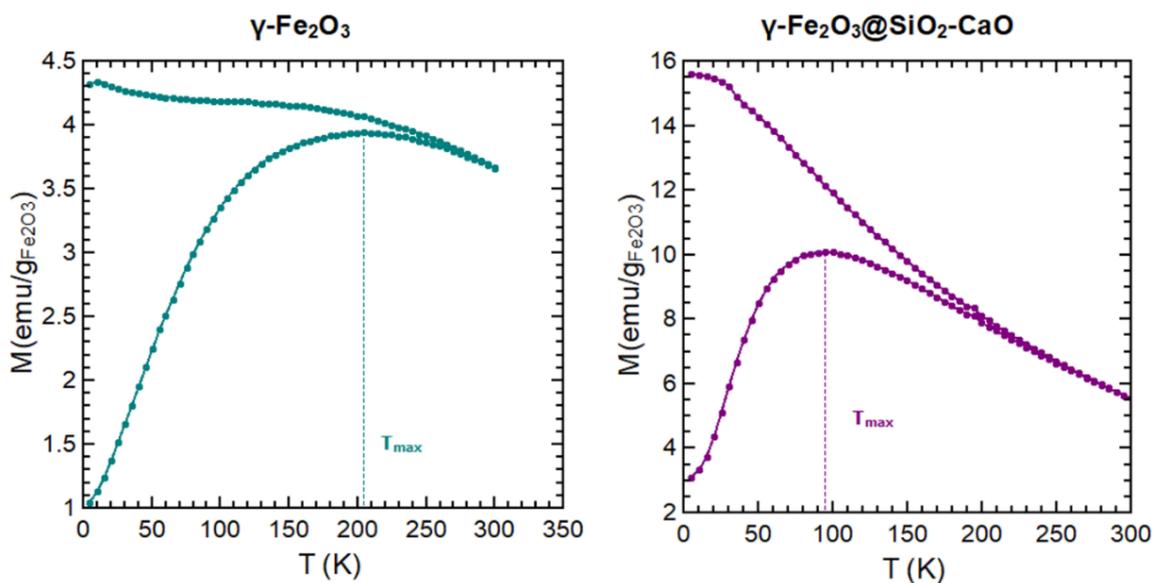


Figure 4.14 : courbes d'aimantation ZFC-FC sous 25 G des nanoparticules de maghémite pure et des hétérostructures.

L'effet des interactions dipolaires magnétiques est également visible sur les branches FC des 2 échantillons. L'évolution importante de l'aimantation dans le cas des hétérostructures montre que le système est constitué d'une assemblée de particules dans un état plutôt isolé (présence de faibles interactions dipolaires) tandis que la saturation de l'aimantation dans le cas des nanoparticules de maghémite est caractéristique d'une assemblée de particules interagissant de façon collective (présence de fortes interactions dipolaires).²⁴

Les courbes d'aimantation $M(H)$ et les courbes ZFC-FC des nanoparticules de maghémite et des hétérostructures ont montré qu'elles sont dans le régime superparamagnétique à température ambiante. Elles présentent une aimantation à saturation relativement importante ($\sim 55 \text{ emu/g}_{\text{Fe}_2\text{O}_3}$) ce qui confirme qu'elles pourront être utilisées pour des tests d'hyperthermie magnétique.

3.2. Propriétés d'hyperthermie

L'évaluation du pouvoir chauffant des nanoparticules de maghémite et des hétérostructures a été faite par la mesure calorimétrique du SAR sur des poudres dispersées dans de l'eau déionisée. Pour ce faire, une cellule contenant la dispersion des particules est placée au centre d'une bobine (ainsi le champ magnétique généré au sein de l'échantillon est homogène et intense).²⁵ Après application d'un champ magnétique alternatif, l'évolution thermique ΔT (due à l'équilibre entre la chaleur générée au sein de l'échantillon et celle interchangée avec son environnement) est mesurée en fonction du temps *via* une sonde immergée dans la solution. Le schéma représentatif du dispositif expérimental est présenté en Figure 4.15. Comme indiqué dans le paragraphe 5.1 du chapitre 1, l'expression du SAR est la suivante :

$$SAR = \frac{C_p}{m(Fe)} \frac{\Delta T}{\Delta t}$$

Le système n'étant pas parfaitement adiabatique (mauvaise isolation thermique de la cellule par exemple), des pertes thermiques subviennent ce qui entraîne après un certain temps une saturation de l'élévation de température (voir figure 4.16). Il y a donc souvent une sous-évaluation de la capacité chauffante des particules magnétiques.²⁶

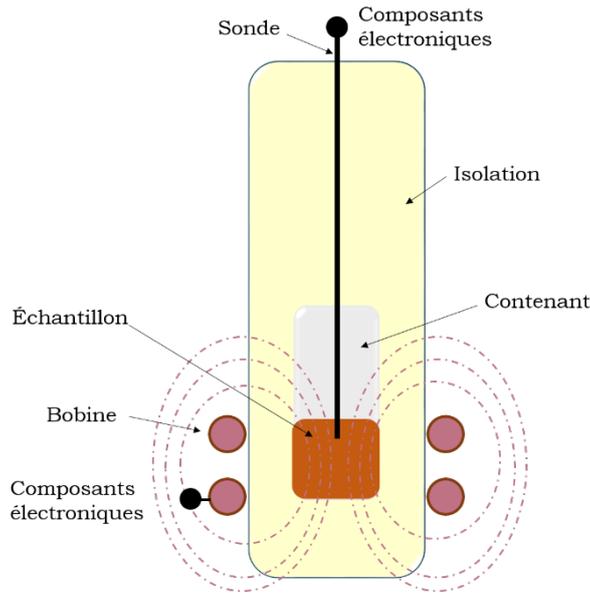


Figure 4.15 : montage expérimental de la mesure du SAR par calorimétrie.

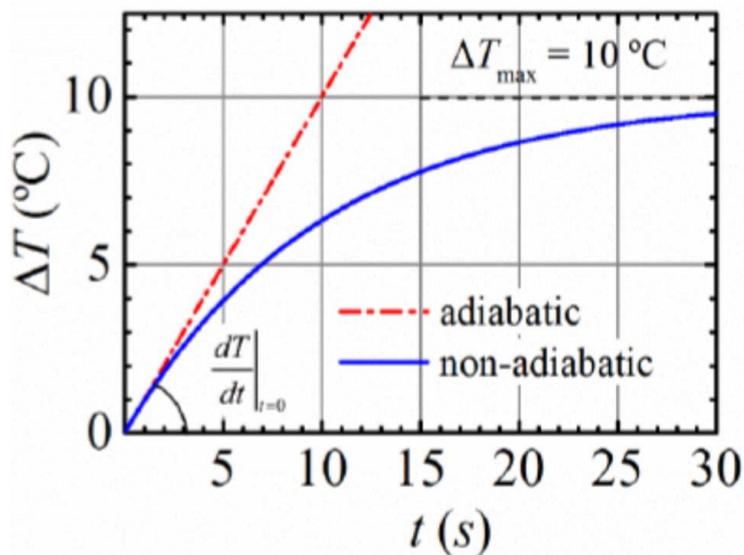


Figure 4.16 : évolution de la température en fonction du temps dans des conditions adiabatique et non adiabatique.²⁵

Pour quantifier la chaleur dissipée, la méthode de « la pente initiale », très prisée par de nombreux groupes de recherche a été utilisée.²⁷⁻³⁰ La principale hypothèse de cette méthode est que les pertes thermiques sont négligeables au début du processus de chauffage. Ainsi, la valeur maximale de $\frac{\Delta T}{\Delta t}$ est obtenue à $t = 0$ et correspond à la pente initiale (voir Figure 4.16) déterminée par ajustement de la courbe expérimentale à l'aide d'une fonction polynomiale de second degré:

$$y = a + b_1x + b_2x^2 \text{ où } a = 0 \text{ et } b_1 = \left(\frac{\Delta T}{\Delta t}\right)_{t=0}$$

NB: les mesures ont été effectuées dans l'eau ($C_p = 4.18 \text{ j.K}^{-1}.g^{-1}$) et la masse d'échantillon utilisée a été calculée afin d'obtenir une concentration en Fe de 1 mg/mL .

La Figure 4.17 présente les profils thermiques des échantillons soumis à un champ magnétique alternatif de 300 G d'amplitude et de 536,5 kHz de fréquence pendant 3 min. La valeur d'ILP des nanoparticules de maghémite répertoriée dans le Tableau 4.3 indique un pouvoir chauffant plus important que d'autres oxydes de fer répertoriés dans la littérature.³¹⁻³⁴ L'origine de ce phénomène est sans doute liée à la présence de fortes interactions dipolaires au sein de l'échantillon (auparavant mises en évidence par les mesures ZFC-FC). Sous champ magnétique, il est possible que celles-ci induisent un arrangement spatial favorable à l'augmentation de l'anisotropie effective du système, améliorant par conséquent la capacité chauffante du matériau. En effet, des études théoriques^{35,36} et expérimentales^{37,38} ont montré qu'une organisation des particules en forme de chainons augmente la production de chaleur grâce au couplage uniaxial des moments magnétiques des particules selon la direction du champ magnétique appliqué. Cependant, il semble qu'une telle géométrie soit plutôt rencontrée dans le cas de nanoparticules facettées.³⁹⁻⁴¹ Par ailleurs, la présence de fortes interactions dipolaires peut également générer sous champ magnétique la formation d'agrégats de taille contrôlée (type nanoflowers) au sein desquels l'orientation cristalline de chaque particule est similaire.^{27,32} L'effet coopératif qui en découlerait optimiserait la dynamique magnétique du système.

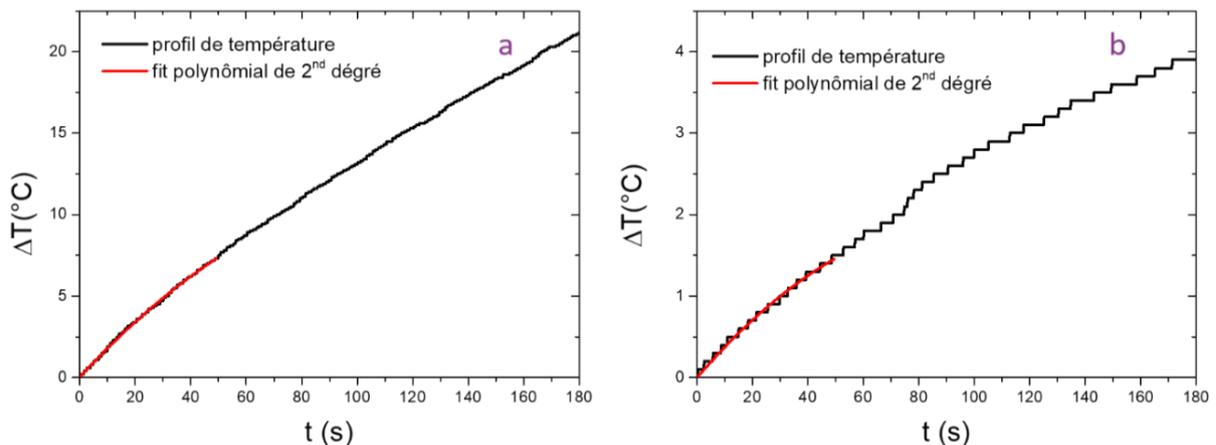


Figure 4.17 : évolution thermique d'une dispersion colloïdale de nanoparticule de :
a) maghémite et b) d'hétérostructures sous un champ magnétique alternatif
d'amplitude $H = 23,8 \text{ kA/m}$ et de fréquence $f = 536,5 \text{ kHz}$.

Dans le cas des hétérostructures, on observe une diminution de la valeur de l'ILP par rapport aux particules brutes. Il est probable que le confinement des nanoparticules sous forme d'agrégats (avec orientation aléatoire) dans la matrice de silice soit pour une part responsable de cette baisse d'efficacité thermique.⁴²⁻⁴⁵ En outre, un effet d'écrantage thermique due à la présence de la coquille amorphe autour des nanoparticules magnétiques pourrait également expliquer cette forte réduction de SAR.⁴¹ En effet, la capacité calorifique de la silice ($C_p = 0.35 \text{ j.K}^{-1}.\text{g}^{-1}$) étant fortement inférieure à celle de l'eau ($C_p = 4.18 \text{ j.K}^{-1}.\text{g}^{-1}$), la chaleur produite par les cœurs magnétiques n'est pas entièrement transmise au milieu.

Échantillons	b_1 (s^{-1})	SAR (W/g_{Fe})	ILP ($\text{nH.m}^2/\text{kg}$)
$\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ (dispersion)	0,181	757 ± 5	$2,49 \pm 0,01$
$\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3@\text{SiO}_2\text{-CaO}$ (dispersion)	0,03	159 ± 5	$0,52 \pm 0,01$
$\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3@\text{SiO}_2\text{-CaO}$ (pastille)	0,027	122 ± 5	$0,4 \pm 0,01$

Tableau 4.3 : valeurs de b_1 , du SAR et de l'ILP des hétérostructures (dispersion colloïdale et pastille) et des particules de maghémite (dispersion).

Les mesures d'hyperthermie ont également été effectuées pour les hétérostructures pressées sous forme de pastille, en vue de déterminer l'impact de leur immobilisation sur leur pouvoir chauffant. La Figure 4.18 présente le profil de température enregistré. A noter que le saut de température observé est dû à la position de la sonde, qui a un moment donné s'est trouvée très proche d'un morceau de pastille.

On observe une baisse du pouvoir chauffant lorsque les hétérostructures sont immobilisées. Ce résultat est facilement explicable, car pressé sous forme de pastille, la rotation physique des particules en solution est inhibée. Il n'y a donc pas de perte de chaleur *via* le mécanisme de relaxation de Brown.^{46,47} La production de chaleur est donc exclusivement liée à la relaxation de Néel alors que pour la dispersion colloïdale de ces mêmes particules, les deux mécanismes contribuaient à l'élévation de température.

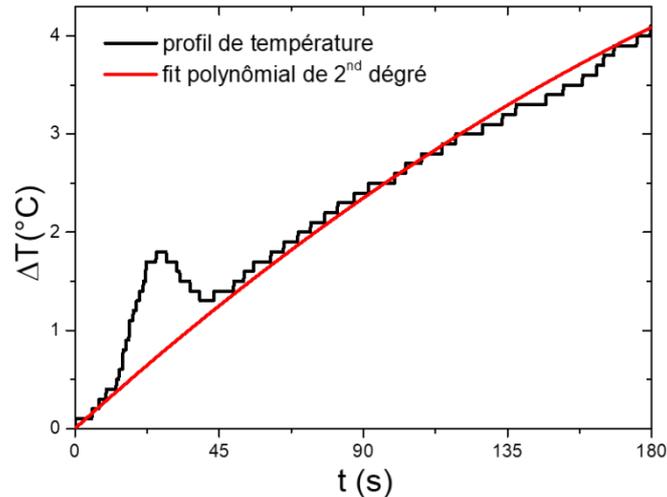


Figure 4.18 : évolution thermique des hétérostructures sous forme de pastille lorsqu'un champ magnétique alternatif ($H = 23,8$ kA/m, $f = 536,5$ kHz) est appliqué.

Une contribution plus importante de la relaxation brownienne à la production de chaleur est sans doute la troisième cause expliquant la grande différence de SAR observée entre les hétérostructures et les particules brutes de maghémite. En effet, elle ne représente qu'une faible proportion de la chaleur produite dans le cas des hétérostructures alors que pour une dispersion de nanoparticules de maghémite d'environ 10 nm de diamètre, elle peut être plus importante, et d'autant plus si la constante d'anisotropie effective (K) du système est augmentée (due à une organisation spatiale favorable des particules sous champ). Cet effet a été observé par Deatsch *et al.*⁴⁸ dans une étude menée sur des nanoparticules de magnétite de différentes tailles (de 13 à 20 nm) où il est montré que l'augmentation de l'anisotropie génère une augmentation de la contribution de la relaxation brownienne.

Malgré un ILP plus faible, les hétérostructures synthétisées présentent un pouvoir chauffant assez intéressant si on compare avec d'autres matériaux de la littérature répertoriés dans Tableau 4.4.^{29,38,49-52}

La production de la chaleur par les différents échantillons synthétisés a été mise en évidence grâce à une mesure calorimétrique sous champ magnétique alternatif. Le pouvoir chauffant des hétérostructures est divisé par 4,8 par rapport à celui des particules brutes de maghémite. Néanmoins, elles sont très prometteuses pour une application de traitement de cancer par hyperthermie magnétique, car leur ILP est compris entre 0,15 – 3,1 nH.m²/kg, intervalle correspondant à la chaleur produite par des nanoparticules magnétiques déjà commercialisées.⁵³

Matériaux	Taille (nm)	Amplitude (kA/m)	Fréquence (kHz)	H x f (A/m s)	SAR (W/g)	ILP (mH m ² /kg)	Solvant	Références
γ -Fe ₂ O ₃	11 ± 4	23,8	536,5	1,28 x 10 ¹⁰	757 ± 4	2,49 ± 0,01	H ₂ O	Notre étude
γ -Fe ₂ O ₃ @SiO ₂ -CaO (dispersion)	73 ± 7				159 ± 5	0,52 ± 0,01		
γ -Fe ₂ O ₃ @SiO ₂ -CaO (pastille)	/				122 ± 5	0,40 ± 0,01		
Nanocubes d'oxyde de Fer	20	23,8	765	1,82 x 10 ¹⁰	500	1,1	H ₂ O	Martinez-Boubeta <i>et al.</i> ³⁷
	40				205	0,5		
Fe ₃ O ₄	8	44,5	360	1,6 x 10 ¹⁰	280	0,39	H ₂ O	Chang <i>et al.</i> ⁴⁸
Fe ₃ O ₄ (nanooctopodes)	17	31,8	310	1,97 x 10 ¹⁰	185 ± 15	0,59 ± 0,04	H ₂ O	Nemati <i>et al.</i> ⁴⁹
Fe ₂ O ₃	13,5 ± 0,45	24	785	9,85 x 10 ⁹	472 ± 5	1,04 ± 0,01	H ₂ O	Garaio <i>et al.</i> ⁵⁰
CoFe ₂ O ₄ @DMSA	9	37,4	500	1,87 x 10 ¹⁰	443	0,6	H ₂ O	Lee <i>et al.</i> ²⁸
MnFe ₂ O ₄ @DMSA	15				411	0,6		
CoFe ₂ O ₄	3,9 ± 0,4	24,8	700	1,73 x 10 ¹⁰	40	0,09	H ₂ O	Fortin <i>et al.</i> ⁵¹
γ -Fe ₂ O ₃	5,3 ± 0,19				4	0,009		
	6,7 ± 0,2				14	0,03		
	8 ± 0,21				37	0,08		

Tableau 4.4 : valeurs de SAR et d'ILP reportées dans la littérature pour différents matériaux. DMSA (dimercaptosuccinic acid).

4. Évaluation de la bioactivité des hétérostructures

La bioactivité des hétérostructures élaborées a été évaluée par des tests *in vitro* dans le SBF selon le protocole établi dans le paragraphe 2.4 du chapitre 3. La Figure 4.19 présente l'image MET de l'échantillon obtenu après 3 jours d'immersion dans le SBF. Tout comme pour les nanoparticules de verre bioactif, on observe la formation hétérogène de cristaux à la surface des particules dont la nature apatitique a été confirmée par DRX et FTIR. En effet, les différents pics de diffraction caractéristiques de l'hydroxyapatite sont visibles sur le diffractogramme (Figure 4.20b). En spectroscopie Infrarouge (Figure 4.20a), en plus des bandes de vibration des groupements phosphate de l'hydroxyapatite (observées à 564 et 604 cm⁻¹), on remarque à 879 cm⁻¹, 1419 cm⁻¹ et 1458 cm⁻¹, la présence de trois nouvelles bandes de vibration correspondant respectivement à la déformation (δ) et à l'élongation (ν) de la liaison O-C-O du carbonate de calcium.^{54,55} Ceci suggère la cristallisation d'hydroxyapatite carbonatée (HAC), une phase minérale similaire à celle de l'os.⁵⁶ Ces résultats contrairement à ceux d'Ebisawa *et al.*⁵⁷ et d'Ohura *et al.*⁵⁸ montrent que la présence de la maghémite dans la matrice vitreuse n'inhibe pas la propriété bioactive de la céramique magnétique.

Par ailleurs, l'observation des pics de la maghémite sur le diffractogramme indique leur immobilisation au sein de l'HAC ou à l'intérieur des hétérostructures comme on peut l'observer sur l'image MET.

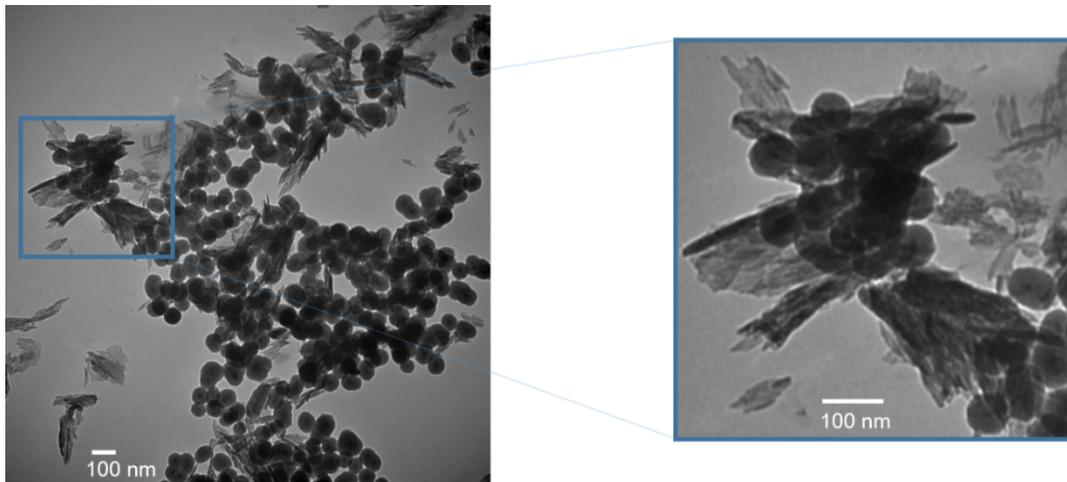


Figure 4.19 : image TEM des hétérostructures après 3 jours d'immersion dans Le SBF.

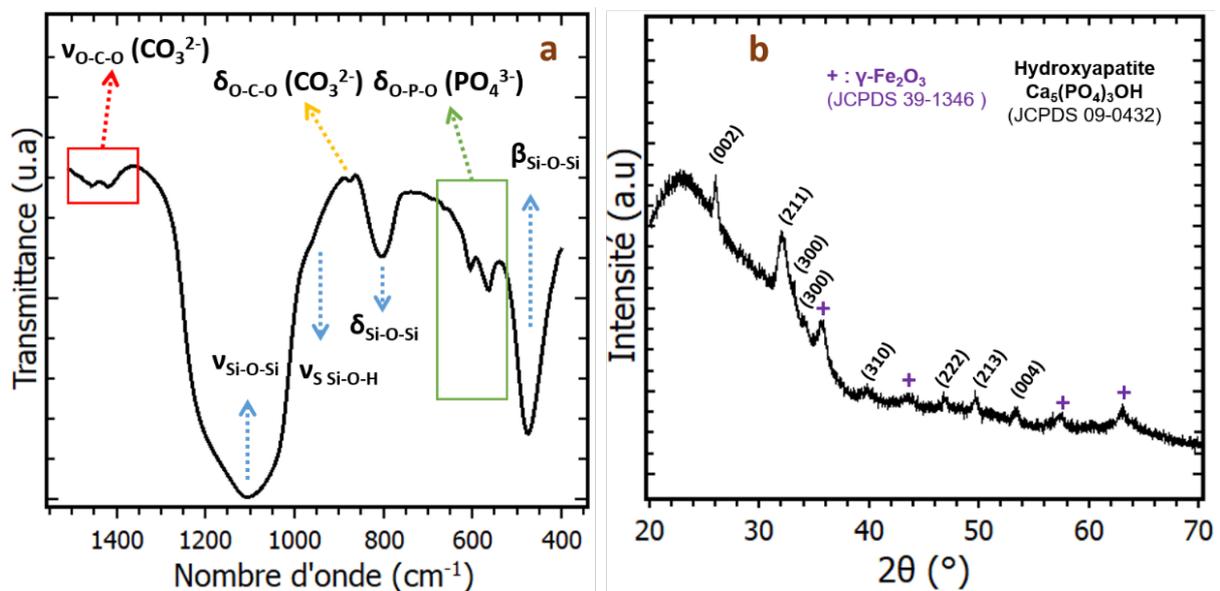


Figure 4.20 : a) spectre IR et b) diffractogramme des hétérostructures après 3 jours d'immersion dans le SBF.

Dans le but d'évaluer l'effet de la maghémite sur la bioactivité, nous avons comparé la bioactivité des hétérostructures à celle de nanoparticules de verre bioactif binaire ($\text{SiO}_2\text{-CaO}$) après immersion dans le SBF durant 3 jours. Les valeurs de surface spécifique et de la teneur en Ca sont reportées dans le Tableau 4.5. La quantité de Ca contenue dans les échantillons étant

très proche et comprise entre 7 et 15 %mol, leur bioactivité ne sera que très faiblement influencée par la composition en CaO (cf. Chapitre 3).

Échantillons	Surface spécifique (m ² /g)	Teneur en calcium (%mol)	Ratio Ca/Si effectif	$r = A_{P-O-P} / A_T$
$\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3@\text{SiO}_2\text{-CaO}$	28	12,8 ± 0,1	0,148 ± 0,002	0,21
SiCa-4	113	10,7 ± 0,1	0,124 ± 0,002	0,14

Tableau 4.5 : surfaces spécifiques, composition et valeurs de r des hétérostructures et de SiO₂-CaO.

Au regard des diffractogrammes superposés des 2 échantillons (Figure 4.21), il est possible de rendre compte de l'influence des nanoparticules de maghémite sur la bioactivité. En effet le diffractogramme des hétérostructures présente un plus grand nombre de pics caractéristiques de l'HAp par rapport à celui de SiCa-4. On observe également que l'intensité des pics est plus élevée et que leur largeur à mi-hauteur est plus faible dans le cas des hétérostructures.

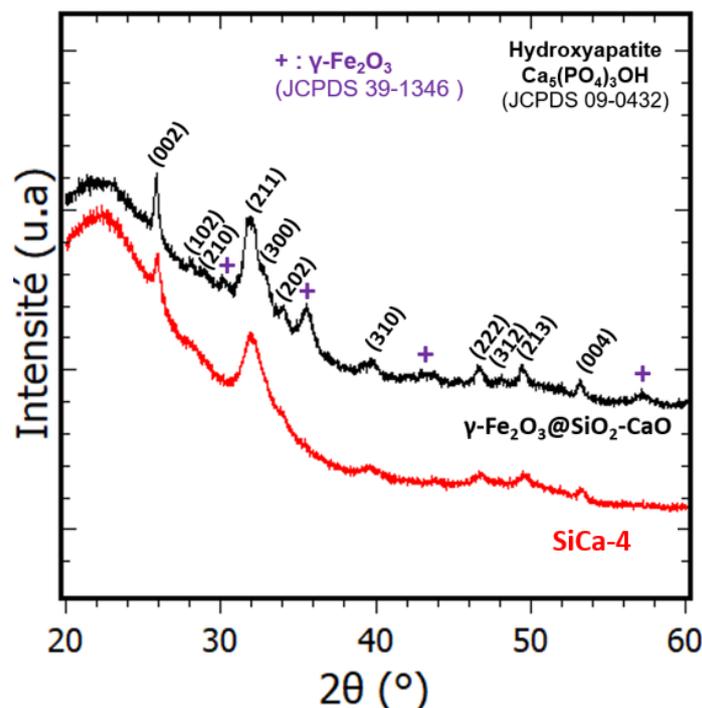


Figure 4.21 : diffractogramme des hétérostructures et de SiCa-4 après 3 jours d'immersion dans le SBF.

Ce résultat est d'ailleurs conforté par l'évolution du ratio de l'aire des bandes de vibration correspondant aux liaisons O-P-O de l'HAp sur l'aire des pics compris entre 400 et 862 cm^{-1} ($r = A_{\text{P-O-P}} / A_{\text{T}}$, cf. Figure 4.22). On peut voir dans le Tableau 4.5 que r est de 0,21 pour les hétérostructures alors qu'il n'est que de 0,14 pour les particules bioactives SiCa-4, ce qui montre bien une plus grande proportion d'HAp formée dans le cas des hétérostructures. On aurait pu s'attendre à ce que SiCa-4 présente une meilleure bioactivité due à la valeur très élevée de sa surface spécifique (plus de 4 fois supérieure à celle des hétérostructures). Il semble donc que la présence des nanoparticules de maghémite soit un facteur bien plus influent que la surface spécifique sur la vitesse de minéralisation dans le SBF. Notons également que la valeur de r de SiCa-4 est bien plus grande que celles de l'échantillon SiCa-2 de composition similaire (0,14 contre 0,04), ce qui s'explique par la multiplication par plus de 5 de la surface spécifique de SiCa-4 comparativement à SiCa-2.

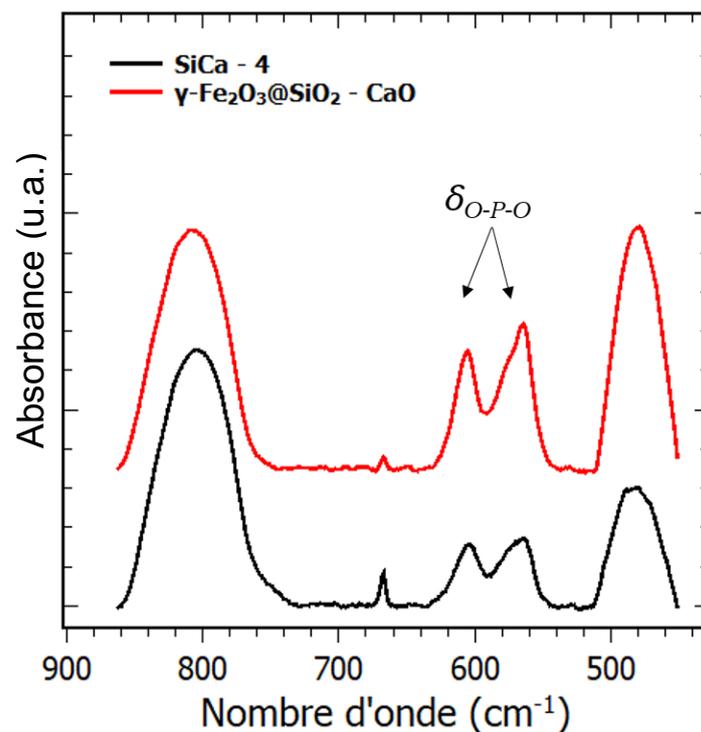


Figure 4.22 : superposition des spectres IR des hétérostructures et de SiCa-4 après retrait de la ligne de base.

5. Conclusion

Des nanoparticules à structure multi cœur-coquille ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3@\text{SiO}_2\text{-CaO}$) dans le régime superparamagnétique ont été élaborées. Des nanoparticules de maghémite ont tout d'abord été synthétisées par co-précipitation. Puis, une étape de fonctionnalisation par l'acide citrique a permis d'apporter une plus forte charge négative à leur surface afin de permettre une croissance uniforme d'une coquille de silice. La synthèse de cette dernière a été effectuée en milieu dilué ($V_E/V_H > 2$) pour éviter toute séparation de phase (précipitation homogène de nanoparticules de silice). En dernières étapes, l'ajout d'ions calcium en solution, des lavages et un traitement thermique à 650°C, ont permis d'obtenir une coquille de verre bioactif. En comparaison avec les nanoparticules brutes de maghémite, les mesures d'hyperthermie ont montré que la chaleur dissipée par les hétérostructures est plus faible. Cependant elle est suffisamment importante pour une application thérapeutique. En outre, les tests *in vitro* de bioactivité ont confirmé d'une part que le matériau multifonctionnel est bioactif (précipitation d'HAp après seulement 3 jours d'immersion dans le SBF) et d'autre part que la présence des nanoparticules de maghémite dans le réseau vitreux améliore significativement la bioactivité. Pour toutes ces raisons, elles sont très prometteuses pour le traitement du cancer couplé à la régénération osseuse.

6. Références

- (1) Harmon, B. V.; Corder, A. M.; Collins, R. J.; Gobé, G. C.; Allen, J.; Allan, D. J.; Kerr, J. F. Cell Death Induced in a Murine Mastocytoma by 42-47 Degrees C Heating in Vitro: Evidence That the Form of Death Changes from Apoptosis to Necrosis above a Critical Heat Load. *Int. J. Radiat. Biol.* **1990**, 58 (5), 845–858.
- (2) Robins, H. I.; D'Oleire, F.; Grosen, E.; Spriggs, D. Rationale and Clinical Status of 41.8 Degrees C Systemic Hyperthermia Tumor Necrosis Factor, and Melphalan for Neoplastic Disease. *Anticancer Res.* **1997**, 17 (4B), 2891–2894.
- (3) Matsumine, A.; Takegami, K.; Asanuma, K.; Matsubara, T.; Nakamura, T.; Uchida, A.; Sudo, A. A Novel Hyperthermia Treatment for Bone Metastases Using Magnetic Materials. *International Journal of Clinical Oncology* **2011**, 16 (2), 101–108.
- (4) Oh, S. H.; Choi, S. Y.; Lee, Y. K.; Kim, K. N. Research on Annihilation of Cancer Cells by Glass-Ceramics for Cancer Treatment with External Magnetic Field. I. Preparation and Cytotoxicity. *J. Biomed. Mater. Res.* **2001**, 54 (3), 360–365.
- (5) Lee, Y.-K.; Lee, S.-B.; Kim, Y.-U.; Kim, K.-N.; Choi, S.-Y.; Lee, K.-H.; Shim, I.-B.; Kim, C.-S. Effect of Ferrite Thermoseeds on Destruction of

- Carcinoma Cells under Alternating Magnetic Field. *Journal of Materials Science* **2003**, 38 (20), 4221–4233.
- (6) Lee, Y.-K.; Choi, S.-Y. Crystallization and Properties of Fe₂O₃—CaO—SiO₂ Glasses. *Journal of the American Ceramic Society* **1996**, 79 (4), 992–996.
 - (7) Wang, Y. Y.; Li, B.; Yu, Y. L.; Tang, P. S. Evaluating the Effects of Chemical Composition on Induction Heating Ability of Fe₂O₃-CaO-SiO₂ Glass Ceramics
<https://www.hindawi.com/journals/amse/2016/2539468/> (accessed Oct 23, 2018).
 - (8) Massart, R. Preparation of Aqueous Magnetic Liquids in Alkaline and Acidic Media. *IEEE Transactions on Magnetics* **1981**, 17 (2), 1247–1248.
 - (9) Nguyen, T. K. T. *MAGNETIC NANOPARTICLES From Fabrication to Clinical Applications*; CRC Press, **2012**.
 - (10) Jolivet, J.-P. *De La Solution à l'oxyde: Condensation Des Cations En Solution Aqueuse ; Chimie de Surface Des Oxydes*, Inter édition.; CNRS, **1994**.
 - (11) Cornell, R. M.; Schwertmann, U. *The Iron Oxides: Structure, Properties, Reactions, Occurrences and Uses*, Wiley.; **2003**.
 - (12) Tartaj, P.; Morales, M. a del P.; Veintemillas-Verdaguer, S.; González-Carretero, T.; Serna, C. J. The Preparation of Magnetic Nanoparticles for Applications in Biomedicine. *Journal of Physics D: Applied Physics* **2003**, 36 (13), R182–R197.
 - (13) Morales, M. P.; Veintemillas-Verdaguer, S.; Montero, M. I.; Serna, C. J.; Roig, A.; Casas, Ll.; Martínez, B.; Sandiumenge, F. Surface and Internal Spin Canting in γ -Fe₂O₃ Nanoparticles. *Chem. Mater.* **1999**, 11 (11), 3058–3064.
 - (14) Lu, A.-H.; Salabas, E. L.; Schüth, F. Magnetic Nanoparticles: Synthesis, Protection, Functionalization, and Application. *Angewandte Chemie International Edition* **2007**, 46 (8), 1222–1244.
 - (15) Mojić, B.; Giannakopoulos, K. P.; Cvejić, Ž.; Srdić, V. V. Silica Coated Ferrite Nanoparticles: Influence of Citrate Functionalization Procedure on Final Particle Morphology. *Ceramics International* **2012**, 38 (8), 6635–6641.
 - (16) Deng, Y.-H.; Wang, C.-C.; Hu, J.-H.; Yang, W.-L.; Fu, S.-K. Investigation of Formation of Silica-Coated Magnetite Nanoparticles via Sol-Gel Approach. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **2005**, 262 (1–3), 87–93.
 - (17) Yang, D.; Hu, J.; Fu, S. Controlled Synthesis of Magnetite–Silica Nanocomposites via a Seeded Sol-Gel Approach. *J. Phys. Chem. C* **2009**, 113 (18), 7646–7651.
 - (18) Brinker, C. J.; Scherer, G. W. *Sol-Gel Science: The Physics and Chemistry of Sol-Gel Processing*; Academic Press, **2013**.

- (19) Srdic, V.; Mojic, B.; Nikolic, M.; Ognjanovic, S. Recent Progress on Synthesis of Ceramics Core/Shell Nanostructures. *Processing and Application of Ceramics* **2013**, 7 (2), 45–62.
- (20) Nadeem, K.; Ali, L.; Gul, I.; Rizwan, S.; Mumtaz, M. Effect of Silica Coating on the Structural, Dielectric, and Magnetic Properties of Maghemite Nanoparticles. *Journal of Non-Crystalline Solids* **2014**, 404, 72–77.
- (21) Vichery, C. Procédé de Recuit Protégé Appliqué à Des Nanoparticules d'oxyde de Fer : Étude Des Relations Structure / Propriétés Magnétiques. thesis, Palaiseau, Ecole polytechnique, **2012**.
- (22) Zeb, F.; Nadeem, K.; Shah, S. K. A.; Kamran, M.; Gul, I. H.; Ali, L. Surface Spins Disorder in Uncoated and SiO₂ Coated Maghemite Nanoparticles. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* **2017**, 429, 270–275.
- (23) Tartaj, P.; González-Carreño, T.; Serna, C. J. Magnetic Behavior of γ -Fe₂O₃ Nanocrystals Dispersed in Colloidal Silica Particles. *J. Phys. Chem. B* **2003**, 107 (1), 20–24.
- (24) Papaefthymiou, G. C.; Devlin, E.; Simopoulos, A.; Yi, D. K.; Riduan, S. N.; Lee, S. S.; Ying, J. Y. Interparticle Interactions in Magnetic Core/Shell Nanoarchitectures. *Phys. Rev. B* **2009**, 80 (2), 024406.
- (25) Périgo, E. A.; Hemery, G.; Sandre, O.; Ortega, D.; Garaio, E.; Plazaola, F.; Teran, F. J. Fundamentals and Advances in Magnetic Hyperthermia. *Applied Physics Reviews* **2015**, 2 (4), 041302.
- (26) Lemal, P.; Balog, S.; Geers, C.; Taladriz-Blanco, P.; Palumbo, A.; Hirt, A. M.; Rothen-Rutishauser, B.; Petri-Fink, A. Heating Behavior of Magnetic Iron Oxide Nanoparticles at Clinically Relevant Concentration. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* **2018**.
- (27) Lartigue, L.; Hugounenq, P.; Alloyeau, D.; Clarke, S. P.; Lévy, M.; Bacri, J.-C.; Bazzi, R.; Brougham, D. F.; Wilhelm, C.; Gazeau, F. Cooperative Organization in Iron Oxide Multi-Core Nanoparticles Potentiates Their Efficiency as Heating Mediators and MRI Contrast Agents. *ACS Nano* **2012**, 6 (12), 10935–10949.
- (28) Meffre, A.; Mehdaoui, B.; Kelsen, V.; Fazzini, P. F.; Carrey, J.; Lachaize, S.; Respaud, M.; Chaudret, B. A Simple Chemical Route toward Monodisperse Iron Carbide Nanoparticles Displaying Tunable Magnetic and Unprecedented Hyperthermia Properties. *Nano Lett.* **2012**, 12 (9), 4722–4728.
- (29) Lee, J.-H.; Jang, J.; Choi, J.; Moon, S. H.; Noh, S.; Kim, J.; Kim, J.-G.; Kim, I.-S.; Park, K. I.; Cheon, J. Exchange-Coupled Magnetic Nanoparticles for Efficient Heat Induction. *Nature Nanotechnology* **2011**, 6 (7), 418–422.
- (30) Taylor, A.; Krupskaya, Y.; Krämer, K.; Füssel, S.; Klingeler, R.; Büchner, B.; Wirth, M. P. Cisplatin-Loaded Carbon-Encapsulated Iron Nanoparticles and Their in Vitro Effects in Magnetic Fluid Hyperthermia. *Carbon* **2010**, 48 (8), 2327–2334.

- (31) de la Presa, P.; Luengo, Y.; Multigner, M.; Costo, R.; Morales, M. P.; Rivero, G.; Hernando, A. Study of Heating Efficiency as a Function of Concentration, Size, and Applied Field in γ -Fe₂O₃ Nanoparticles. *The Journal of Physical Chemistry C* **2012**, *116* (48), 25602–25610.
- (32) Hugounenq, P.; Levy, M.; Alloyeau, D.; Lartigue, L.; Dubois, E.; Cabuil, V.; Ricolleau, C.; Roux, S.; Wilhelm, C.; Gazeau, F.; et al. Iron Oxide Monocrystalline Nanoflowers for Highly Efficient Magnetic Hyperthermia. *The Journal of Physical Chemistry C* **2012**, *116* (29), 15702–15712.
- (33) Saville, S. L.; Qi, B.; Baker, J.; Stone, R.; Camley, R. E.; Livesey, K. L.; Ye, L.; Crawford, T. M.; Thompson Mefford, O. The Formation of Linear Aggregates in Magnetic Hyperthermia: Implications on Specific Absorption Rate and Magnetic Anisotropy. *Journal of Colloid and Interface Science* **2014**, *424*, 141–151.
- (34) Sotiriou, G. A.; Visbal-Onufrak, M. A.; Teleki, A.; Juan, E. J.; Hirt, A. M.; Pratsinis, S. E.; Rinaldi, C. Thermal Energy Dissipation by SiO₂-Coated Plasmonic-Superparamagnetic Nanoparticles in Alternating Magnetic Fields. *Chem. Mater.* **2013**, *25* (22), 4603–4612.
- (35) Fu, R.; Yan, Y. Y.; Roberts, C. Study of the Effect of Dipole Interactions on Hyperthermia Heating the Cluster Composed of Superparamagnetic Nanoparticles. *AIP Advances* **2015**, *5* (12), 127232.
- (36) Mehdaoui, B.; Tan, R. P.; Meffre, A.; Carrey, J.; Lachaize, S.; Chaudret, B.; Respaud, M. Increase of Magnetic Hyperthermia Efficiency Due to Dipolar Interactions in Low-Anisotropy Magnetic Nanoparticles: Theoretical and Experimental Results. *Physical Review B* **2013**, *87* (17).
- (37) Serantes, D.; Simeonidis, K.; Angelakeris, M.; Chubykalo-Fesenko, O.; Marciello, M.; Morales, M. del P.; Baldomir, D.; Martinez-Boubeta, C. Multiplying Magnetic Hyperthermia Response by Nanoparticle Assembling. *J. Phys. Chem. C* **2014**, *118* (11), 5927–5934.
- (38) Martinez-Boubeta, C.; Simeonidis, K.; Makridis, A.; Angelakeris, M.; Iglesias, O.; Guardia, P.; Cabot, A.; Yedra, L.; Estradé, S.; Peiró, F.; et al. Learning from Nature to Improve the Heat Generation of Iron-Oxide Nanoparticles for Magnetic Hyperthermia Applications. *Scientific Reports* **2013**, *3*, 1652.
- (39) Guardia, P.; Di Corato, R.; Lartigue, L.; Wilhelm, C.; Espinosa, A.; Garcia-Hernandez, M.; Gazeau, F.; Manna, L.; Pellegrino, T. Water-Soluble Iron Oxide Nanocubes with High Values of Specific Absorption Rate for Cancer Cell Hyperthermia Treatment. *ACS Nano* **2012**, *6* (4), 3080–3091.
- (40) Joshi, H. M.; Lin, Y. P.; Aslam, M.; Prasad, P. V.; Schultz-Sikma, E. A.; Edelman, R.; Meade, T.; Dravid, V. P. Effects of Shape and Size of Cobalt Ferrite Nanostructures on Their MRI Contrast and Thermal Activation. *J. Phys. Chem. C* **2009**, *113* (41), 17761–17767.

- (41) Gonzalez-Fernandez, M. A.; Torres, T. E.; Andrés-Vergés, M.; Costo, R.; de la Presa, P.; Serna, C. J.; Morales, M. P.; Marquina, C.; Ibarra, M. R.; Goya, G. F. Magnetic Nanoparticles for Power Absorption: Optimizing Size, Shape and Magnetic Properties. *Journal of Solid State Chemistry* **2009**, *182* (10), 2779–2784.
- (42) Ovejero, J. G.; Cabrera, D.; Carrey, J.; Valdivielso, T.; Salas, G.; Teran, F. J. Effects of Inter- and Intra-Aggregate Magnetic Dipolar Interactions on the Magnetic Heating Efficiency of Iron Oxide Nanoparticles. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2016**, *18* (16), 10954–10963.
- (43) Etheridge, M. L.; Hurley, K. R.; Zhang, J.; Jeon, S.; Ring, H. L.; Hogan, C.; Haynes, C. L.; Garwood, M.; Bischof, J. C. Accounting for Biological Aggregation in Heating and Imaging of Magnetic Nanoparticles. *Technology (Singap World Sci)* **2014**, *2* (3), 214–228.
- (44) Coral, D. F.; Mendoza Zélis, P.; Marciello, M.; Morales, M. del P.; Craievich, A.; Sánchez, F. H.; Fernández van Raap, M. B. Effect of Nanoclustering and Dipolar Interactions in Heat Generation for Magnetic Hyperthermia. *Langmuir* **2016**, *32* (5), 1201–1213.
- (45) Abenojar, E. C.; Wickramasinghe, S.; Bas-Concepcion, J.; Samia, A. C. S. Structural Effects on the Magnetic Hyperthermia Properties of Iron Oxide Nanoparticles. *Progress in Natural Science: Materials International* **2016**, *26* (5), 440–448.
- (46) Erné, B. H.; Butter, K.; Kuipers, B. W. M.; Vroege, G. J. Rotational Diffusion in Iron Ferrofluids. *Langmuir* **2003**, *19* (20), 8218–8225.
- (47) Wang, X.; Gu, H.; Yang, Z. The Heating Effect of Magnetic Fluids in an Alternating Magnetic Field. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* **2005**, *293* (1), 334–340.
- (48) Deatsch, A. E.; Evans, B. A. Heating Efficiency in Magnetic Nanoparticle Hyperthermia. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* **2014**, *354*, 163–172.
- (49) Chang, L.; Liu, X. L.; Di Fan, D.; Miao, Y. Q.; Zhang, H.; Ma, H. P.; Liu, Q. Y.; Ma, P.; Xue, W. M.; Luo, Y. E.; et al. The Efficiency of Magnetic Hyperthermia and in Vivo Histocompatibility for Human-like Collagen Protein-Coated Magnetic Nanoparticles. *Int J Nanomedicine* **2016**, *11*, 1175–1185.
- (50) Nemati, Z.; Alonso, J.; Martinez, L. M.; Khurshid, H.; Garaio, E.; Garcia, J. A.; Phan, M. H.; Srikanth, H. Enhanced Magnetic Hyperthermia in Iron Oxide Nano-Octopods: Size and Anisotropy Effects. *J. Phys. Chem. C* **2016**, *120* (15), 8370–8379.
- (51) Garaio, E.; Collantes, J. M.; Garcia, J. A.; Plazaola, F.; Mornet, S.; Couillaud, F.; Sandre, O. A Wide-Frequency Range AC Magnetometer to Measure the Specific Absorption Rate in Nanoparticles for Magnetic Hyperthermia. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* **2014**, *368*, 432–437.
- (52) Fortin, J.-P.; Wilhelm, C.; Servais, J.; Ménager, C.; Bacri, J.-C.; Gazeau, F. Size-Sorted Anionic Iron Oxide Nanomagnets as Colloidal

- Mediators for Magnetic Hyperthermia. *Journal of the American Chemical Society* **2007**, 129 (9), 2628–2635.
- (53) Kallumadil, M.; Tada, M.; Nakagawa, T.; Abe, M.; Southern, P.; Pankhurst, Q. A. Suitability of Commercial Colloids for Magnetic Hyperthermia. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* **2009**, 321 (10), 1509–1513.
- (54) Balamurugan, A.; Sockalingum, G.; Michel, J.; Fauré, J.; Banchet, V.; Wortham, L.; Bouthors, S.; Laurent-Maquin, D.; Balossier, G. Synthesis and Characterisation of Sol Gel Derived Bioactive Glass for Biomedical Applications. *Materials Letters* **2006**, 60 (29), 3752–3757.
- (55) Li, W.; Nooeaid, P.; Roether, J. A.; Schubert, D. W.; Boccaccini, A. R. Preparation and Characterization of Vancomycin Releasing PHBV Coated 45S5 Bioglass®-Based Glass–Ceramic Scaffolds for Bone Tissue Engineering. *Journal of the European Ceramic Society* **2014**, 34 (2), 505–514.
- (56) Pereira, M. M.; Clark, A. E.; Hench, L. L. Calcium Phosphate Formation on Sol-Gel-Derived Bioactive Glasses in Vitro. *J. Biomed. Mater. Res.* **1994**, 28 (6), 693–698.
- (57) Ebisawa, Y.; Kokubo, T.; Ohura, K.; Yamamuro, T. Bioactivity of Fe₂O₃-Containing CaO-SiO₂ Glasses: In Vitro Evaluation. *J Mater Sci: Mater Med* **1993**, 4 (3), 225–232.
- (58) Ohura, K.; Nakamura, T.; Yamamuro, T.; Ebisawa, Y.; Kokubo, T.; Kotoura, Y.; Oka, M. Bioactivity of CaO·SiO₂ Glasses Added with Various Ions. *J Mater Sci: Mater Med* **1992**, 3 (2), 95–100.

Conclusions

Des nanoparticules multifonctionnelles à structure multi cœur-coquille pour le traitement local du cancer par hyperthermie magnétique et la régénération osseuse ont été élaborées. La stratégie de synthèse utilisée a été la croissance d'une coquille bioactive, constituée de verre bioactif binaire ($\text{SiO}_2 - \text{CaO}$) par un procédé Stöber modifié autour d'un cœur magnétique constitué de nanoparticules de maghémite obtenues par co-précipitation.

Afin de mieux comprendre l'impact des différents paramètres de synthèse sur la vitesse de minéralisation et de l'optimiser, des nanoparticules de verre bioactif binaire de différente taille et composition ont tout d'abord été synthétisées. L'influence de 3 paramètres de synthèse, la concentration en ammoniacque, le moment d'ajout du précurseur de calcium et le ratio Ca / Si initial (quantité initiale de calcium) sur la taille, l'état d'agglomération et la composition des nanoparticules bioactives a ainsi été analysée. Il ressort de cette étude les points essentiels suivants :

- La concentration en ammoniacque contrôle principalement la taille des particules (plus la concentration de NH_4OH augmente, plus le diamètre augmente).
- La teneur en calcium des verres bioactifs et leur état d'agglomération dépendent essentiellement du moment d'ajout du précurseur de calcium dans le milieu réactionnel. Lorsque le sel de calcium est ajouté moins d'une heure après le début de la réaction sol-gel, une grande quantité de calcium est insérée dans le verre. Par contre, cette forte incorporation du calcium se fait au détriment de leur dispersibilité en solution : les nanoparticules formées sont très agglomérées. Pour des moments d'ajout de deux heures ou plus, la quantité de calcium incorporée est moindre et diminue lorsque le moment d'ajout augmente. Les particules formées sont par contre non agglomérées. Un bon compromis est donc de réaliser l'ajout du précurseur de calcium entre 2 et 3 heures après le début de la synthèse (obtention de nanoparticules bioactives non agglomérées et contenant une quantité de calcium raisonnable).
- Il est possible d'augmenter la teneur en calcium du verre bioactif en augmentant la quantité initiale de sel dans le milieu (ratio Ca/Si initial). Néanmoins celle-ci atteint un plateau à partir d'un ratio Ca/Si de 2.

L'effet des paramètres expérimentaux majeurs sur la synthèse des nanoparticules de verre bioactif par le procédé Stöber étant compris et contrôlé, nous nous sommes ensuite attachés à étudier le seul impact de

leur composition (proportion de CaO) sur leur bioactivité. En effet, à ce jour l'étude de la littérature ne permet pas de séparer l'effet de la composition de celui de la surface spécifique des particules, 2 paramètres influençant fortement la bioactivité.

Pour ce faire, 3 échantillons présentant une taille, une dispersion en taille, une surface spécifique et une porosité similaire, mais de composition différente en CaO (6,9 %mol, 10,6 %mol et 15,4 %mol) ont été élaborés par variation du moment d'ajout du sel de calcium dans le milieu réactionnel. Les caractérisations structurales des échantillons obtenus après immersion dans du SBF, ont montré que l'échantillon contenant la plus grande quantité de calcium présentait les meilleures propriétés bioactives. Cependant la quantité d'HAp formée n'a pas évolué de manière significative dans le domaine de composition étudié. L'échantillon contenant le plus de calcium n'a présenté aucune cytotoxicité significative après 3 et 7 jours d'incubation avec des cellules souches mésenchymateuses. C'est donc un échantillon très prometteur pour une application dans le domaine de la régénération osseuse.

À la suite de ces études, des nanoparticules multifonctionnelles ont été élaborées par un protocole en 2 étapes:

- Formation des nanoparticules de maghémite par co-précipitation, fonctionnalisation avec de l'acide citrique et peptisation en milieu basique.
- Croissance d'une coquille de verre bioactif autour des particules magnétiques *via* la formation d'une coquille de silice en milieu dilué ($V_E / V_H > 2$) suivie de l'ajout d'un sel de calcium 3h après le début de la réaction sol-gel et d'un traitement thermique permettant la diffusion des ions Ca^{2+} dans le réseau vitreux.

La microscopie électronique en transmission a mis en évidence une structure multi cœur-coquille des nanoparticules qui sont par ailleurs monodisperses en taille, non agglomérées et qui contiennent une quantité de calcium raisonnable (12,8 %mol). En outre, des mesures d'hyperthermie et des tests de bioactivité effectués sur les hétérostructures ont montré un véritable potentiel pour le traitement du cancer et la régénération osseuse, car elles présentent d'excellentes propriétés bioactives couplées à un pouvoir chauffant élevé (ILP = 0,52 nH.m²/kg en dispersion, 0,4 nH.m²/kg sous forme de pastille).

Perspectives

Des nanoparticules à structure multi cœur-coquille aux propriétés magnétiques et bioactives ont été synthétisées dans cette étude. Malgré leur potentiel très prometteur pour le traitement du cancer par hyperthermie magnétique, nous avons observé une forte réduction de leur pouvoir chauffant comparativement aux particules magnétiques brutes. Une perspective serait donc d'essayer d'augmenter leur SAR *via* l'obtention de particules mono cœur-coquilles. En effet, l'influence délétère des interactions magnétiques dipolaires sur le pouvoir chauffant peut être importante. Il serait donc nécessaire de contrôler finement le phénomène d'agglomération des particules magnétiques lors de la croissance de la coquille bioactive. En outre, au regard des études reportées dans la littérature, il est admis que des nanoparticules magnétiques avec une forte aimantation à saturation (M_s) et/ou une taille proche de la transition superparamagnétique - ferromagnétique possèdent une capacité de chauffe plus élevée. Par conséquent, l'idéal serait d'élaborer un matériau à structure mono cœur-coquille dont le cœur est constitué de nanoparticule de maghémite d'environ 15 nm de diamètre. Des synthèses ont été effectuées dans ce sens. Les caractérisations sont en cours et semblent très prometteuses.

Un autre axe de perspectives serait d'élaborer d'autres types d'hétérostructures. Il serait en effet intéressant de comparer les propriétés magnétiques et d'hyperthermie des hétérostructures déjà synthétisées à celles d'hétérostructures inverses (nanoparticules bioactives décorées de particules magnétiques). Dans le cas d'hétérostructures inverses, le devenir des particules magnétiques lors de la formation d'HAp serait à étudier. Aussi, dans le but d'accélérer la minéralisation de la coquille bioactive, former une coquille mésoporeuse aurait un grand intérêt car cela permettrait d'augmenter considérablement la surface spécifique des échantillons. Au-delà des différentes caractérisations physico-chimiques, magnétiques et de cytocompatibilité qui peuvent être envisagées, il serait également intéressant d'effectuer des études d'hyperthermie magnétique en milieu *in vivo* afin d'évaluer l'efficacité thérapeutique des différentes hétérostructures élaborées. Une étude sur petit animal pourrait même être envisagée. Les hétérostructures pourraient être mélangées à du sang pour former une pâte pressée dans de petits défauts osseux, ou pourraient être utilisées pour obtenir un matériau de taille macroscopique. Cela pourrait se faire soit par dispersion dans un polymère ou par la technique de l'éponge sacrificielle, afin d'avoir une structure poreuse similaire à celle de l'os naturel.

Annexe 1

1. Synthèse de nanoparticules de verre bioactif

1.1. Variation de la concentration d'ammoniaque

Solution 1 : 20 mL EtOH_{abs} + 2,34 mL TEOS

Solution 2 : 17,5 mL EtOH_{abs} + 11,7 mL H₂O + **z** mL NH₄OH (28%)

Volume d'ammoniaque prélevé (z , mL)	Concentration ammoniaque (C, M)
0,75	0,14
1,12	0,21
1,5	0,33
1,75	0,57

- Mettre sous agitation Sol 1 et Sol 2.
- 30 min plus tard, transférer Sol 1 dans Sol 2.
- 24h plus tard, ajouter dans le milieu réactionnel 0,49 g de Ca(NO₃)₂·4H₂O (préalablement dissous dans 1 mL d'eau).
- Laisser sous agitation le mélange résultant pendant 3h.
- Retirer le surnageant par centrifugation (10 min / 7700 rpm).
- Effectuer 3 centrifugations avec de l'éthanol (20 min / 7700 rpm).
- Sécher le précipité dans une étuve à 60°C.
- Broyer la dans un mortier le solide récupéré.
- Recuit à 650°C pendant 3h.

1.2. Variation du moment d'ajout du sel de calcium

Solution 1 : 20 mL EtOH_{abs} + 2,34 mL TEOS

Solution 2 : 17,5 mL EtOH_{abs} + 11,7 mL H₂O + 1,12 mL NH₄OH (28%)

- Mettre sous agitation Sol 1 et Sol 2.
- 30 min plus tard, ajout de Sol 1 dans Sol 2.

- A différents temps, $H_1 = 30$ min, $H_2 = 1$ h, $H_7 = 6$ h, ajout dans le milieu réactionnel de 0,49 g de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (préalablement dissous dans 1 mL d'eau).
- Laisser sous agitation le mélange résultant pendant $(24 - H_x)$, avec $H_x = H_1, H_2, \dots, H_7$.
- Lavages, séchage et recuit comme dans la section 1.1.

1.3. Variation du ratio Ca/Si initial

Solution 1 : 20 mL EtOH_{abs} + 2,34 mL TEOS

Solution 2 : 17,5 mL EtOH_{abs} + **e** mL H₂O + 1,12 mL NH₄OH (28%)

Ratio Ca/Si initial	Volume eau distillée (e, mL)	Masse de sel de calcium (g)
0,2	11,7	0,49 (dissout dans 1 mL d' H ₂ O)
0,75	11,7	1,86 (dissout dans 1 mL d' H ₂ O)
1,3	10,7	3,22 (dissout dans 2 mL d' H ₂ O)
2,0	10,7	4,95 (dissout dans 2 mL d' H ₂ O)
2,6	9,7	6,43 (dissout dans 3 mL d' H ₂ O)
3.5	9.7	8,66 (dissout dans 3 mL d' H ₂ O)

- Mettre sous agitation Sol 1 et Sol 2.
- 30 min plus tard, ajout de Sol 1 dans Sol 2.
- 3h plus tard, ajout de la quantité correspondante de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ dans le milieu réactionnel (cf. tableau ci-dessus)
- Laisser sous agitation le mélange résultant pendant 21h.
- Lavages, séchage et recuit comme dans la section 1.1.

Annexe 2

2. Essais biologiques

2.1. Procédure d'isolement et de culture des cellules souches mésenchymateuses (CSM)

Les cellules souches mésenchymateuses (CSM) ont été extraites à partir de morceaux d'os spongieux métaphysaire prélevés sur la tête fémorale supérieure de patients lors d'une arthroplastie totale de la hanche. Avant l'extraction, les patients ont signé une autorisation permettant l'utilisation de leurs os à des fins de recherche. Le volume d'os prélevé est fonction du patient et varie généralement entre 2 et 4 cm³. Les morceaux d'os spongieux ont ensuite été transportés rapidement au laboratoire de culture cellulaire dans un tube contenant 5 mL d'une solution tampon de phosphate salin (PBS) stérile et 100 µL d'héparine à 2%.

Une fois au laboratoire, les os ont subi plusieurs étapes de rinçage par aspiration et refoulement avec du PBS. La solution de rinçage filtrée a été conservée. Après avoir découpé les os en petites pièces, ils ont été transférés dans un tube contenant 0,2 mL de collagénase diluée dans 2 mL de PBS et 4 mL d'un milieu de culture dont la composition est détaillée dans le Tableau A2.1. Puis, l'ensemble a été incubé dans un bain-marie durant 15 min à 37°C. Ensuite, les morceaux d'os ont été rincés avec 5 mL de PBS contenant 5% de SVF (Sérum de Veau Fétal) et filtrés.

Les différentes solutions de rinçages obtenues ont été centrifugées pendant 10 min à 1400 rpm. Le surnageant a été éliminé et le culot cellulaire, contenant les CSM et cellules sanguines, a été repris dans 5 mL de PBS. Après comptage sur lame de Malassez, les cellules ont été mises en culture dans des flasques de 25 cm² à une concentration moyenne de 20.10⁶ cellules par flasque et placées à 37°C sous atmosphère régulée à 5% de CO₂.

Après 3 jours de culture, les flasques ont été rincées avec 3 mL de PBS afin d'éliminer les cellules sanguines et de conserver les CSM qui ont adhérées à la surface des flasques. 5 mL de milieu de culture frais ont été ajoutés et le milieu a été renouvelé 2 fois par semaine.

Lorsque les cellules ont atteint environ 80% de confluence, un repiquage a été effectué à l'aide de trypsine-EDTA 1X (Trypsine-Ethylène Diamine Tétracétique). Après un nouveau comptage, une concentration appropriée de cellules a été mise en culture avec les échantillons pour évaluer leur cytotoxicité.

Produits	Volumes
MEM + Glutamax (Dutscher)	500 mL
Gentamicine sulfate (50 mg/mL Dutscher)	40 µL
Acides aminés non essentiels (100 X Dutscher)	5 mL
Sodium pyruvate (100 mM Dutscher)	5 mL
Vitamines (100 X Dutscher)	5 mL
SVF	50 mL

Tableau A2.1 : composition du milieu de culture.

2.2. Test de cytotoxicité

A la fin de la période d'incubation (3 jours et 7 jours) des poudres en présence des CSM, 100 µL de réactif MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) ont été ajoutés dans les puits. Les plaques de culture ont été ré-incubées pendant 3h à 37°C sous atmosphère régulée à 5% de CO₂. Après 3h l'ensemble des puits de culture a été vidé, sans toucher aux poudres et aux cellules situées au fond des puits. Puis 500 µL de DMSO (diméthyl sulfoxyde) ont été ajoutés dans les puits afin de dissoudre les cristaux de formazan. Après 40 min, la solution de DMSO de chaque puits a été prélevée et transférée dans une nouvelle plaque, en faisant attention à ne pas prélever les particules. La densité optique (DO) de chaque puits de la nouvelle plaque a ensuite été mesurée à 570 nm et 690 nm. La différence entre les valeurs de DO obtenues à ces 2 longueurs d'onde est utilisée pour obtenir l'activité mitochondriale des cellules en présence et en absence des échantillons (Témoin).

Annexe 3

3. Synthèse d'hétérostructures (γ -Fe₂O₃@SiO₂-CaO)

3.1. Synthèse de nanoparticules de maghémite

- Dissoudre 5,73 g de FeCl₃·6H₂O dans 30 mL de H₂O
- Dissoudre 3,87 g de FeCl₂·4H₂O dans 6 mL de HCl. Puis mélanger les 2 solutions sous agitation.
- Ajouter rapidement 11,4 mL d'une solution aqueuse de NH₄OH (28%, 14,8 M) puis laisser sous agitation pendant 30 min.
- Retirer le surnageant à l'aide d'un aimant (décantation magnétique).
- Laver 2 fois à l'eau déionisée le flocculat obtenu.
- Ajouter 4,9 mL de HNO₃ (2 M) et laisser agiter pendant 30 min.
- Décantation magnétique.
- Ajouter 7,38 g de Fe(NO₃)₃·9H₂O (préalablement dissous dans 12 mL d'eau) et transvaser la solution résultante dans un ballon de 100 mL.
- Porter à reflux pendant 30 min vers 110°C
- Laisser refroidir puis transférer le mélange dans un bécher.
- Ajouter 27 mL de HNO₃ (2 M) puis porter le tout sous ultrasons pendant 10 min.
- Décantation magnétique.
- Effectuer 3 lavages à l'acétone.
- Disperser les particules dans 30 mL de HNO₃ (pH = 2).
- Mettre sous ultrasons pendant 10 min.
- Effectuer 2 centrifugations (6490 g) pendant 5 min pour retirer les plus grosses particules et les agglomérats.

3.2. Fonctionnalisation de la surface des nanoparticules de maghémite et peptisation

- Mettre 0,97 mL de la dispersion de nanoparticules de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ (73 mg/mL) dans un bécher contenant 15 mL d'une solution aqueuse d'acide citrique (C = 0,3 M).
- Porter sous ultrasons le mélange pendant 5 min et laisser sous agitation pendant 30 min.
- Retirer le surnageant par décantation magnétique
- Effectuer 2 lavages à l'acétone afin d'éliminer l'excès de groupements citrate non adsorbés en surface.
- Disperser les nanoparticules fonctionnalisées dans un mélange H_2O (5 mL) + NH_4OH (0,5 mL).

3.3. Croissance d'une coquille bioactive

Solution 1 : 100 mL EtOH_{abs} + 6,1 mL TEOS

Solution 2 : 87,5 mL EtOH_{abs} + 58,5 mL H_2O + 2 mL NH_4OH (28%)

Solution 3 : Dispersion de nanoparticules de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ fonctionnalisées à l'acide citrique (voir section 3.2.).

- Sol 1 et Sol 2 sont mis sous agitation.
- 10 min plus tard, Sol 3 est ajouté à Sol 2
- Après 10 min d'agitation, ajout de Sol 1 au mélange précédent (Sol 2 + Sol 3)
- 3h plus tard, ajout dans le milieu réactionnel de 1,9 g de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (préalablement dissous dans 1 mL d'eau)
- Laisser sous agitation le mélange résultant pendant 21h.
- Centrifugation (10 min / 7700 rpm), retrait du surnageant.
- Effectuer plusieurs lavages à l'eau déionisée par centrifugation (20 min / 7700 rpm) jusqu'à ce que la solution de lavage soit incolore
- Sécher le solide récupéré dans une étuve à 60°C.
- Broyage de la poudre dans un mortier.
- Recuit à 650°C pendant 3h.

Produits chimiques utilisés

- Acétone (VWR chemicals)
- Acide citrique monohydrate, pureté $\geq 99.5\%$ (Labogros)
- EtOH absolute, pureté $\geq 99\%$ (Sigma-Aldrich)
- $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (Sigma-Aldrich)
- $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, pureté $\geq 99\%$ (Sigma-Aldrich)
- $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, pureté $\geq 99\%$ (Sigma-Aldrich)
- $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$, pureté $\geq 98\%$ (Sigma-Aldrich)
- HNO_3 solution, pureté $\geq 65\%$ (Sigma-Aldrich)
- NH_4OH solution, pureté 28-30% NH_3 (Sigma-Aldrich)

- NaCl , pureté $\geq 99\%$ (Sigma-Aldrich)
- NaHCO_3 , pureté 99,7-100,3% (Sigma-Aldrich)
- KCl , pureté $\geq 99\%$ (Sigma-Aldrich)
- $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, pureté $\geq 99\%$ (Sigma-Aldrich)
- $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, pureté $\geq 99\%$ (Sigma-Aldrich)
- CaCl_2 , pureté 96% (Sigma-Aldrich)
- Na_2SO_4 , pureté $\geq 99\%$ (Sigma-Aldrich)
- HCl solution, pureté 32 %wt (Sigma-Aldrich)
- Trizma base (Sigma-Aldrich)

Liste des abréviations

- **α -TCP** : α -Tricalcium phosphate
- **β -TCP** : β -Tricalcium phosphate
- **Ca** : Calcium
- **Ca(NO₃)₂** : Nitrate de calcium
- **CME** : 2-méthoxyéthanolate de calcium
- **HAC** : Hydroxyapatite carbonatée
- **HAp** : Hydroxyapatite
- **IUPAC** : International Union of Pure and Applied Chemistry
- **LaB₆** : Hexaborure de lanthane
- **PCL** : Polycaprolactone
- **PMMA** : Poly(Methyl Methacrylate)
- **PLLA** : Polylactic acid
- **MTT** : 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide
- **UHMWPE** : Ultra-High Molecular Weight Polyethylene
- **45S5** : Verre bioactif avec 45 %wt de SiO₂ et un ratio molaire CaO:P₂O₅ = 5:1
- **58S** : Verre bioactif avec 58 %wt en SiO₂
- **⁸⁹Sr** : Isotope du strontium dont le nombre de masse est 89
- **¹⁵³Sm** : Isotope du samarium dont le nombre de masse est 153
- **A** : Constante d'échange
- **a** : Paramètre de maille
- **A_i** : Aire de la boucle d'hystérésis
- **A_{ij}** : Intégrale d'échange
- **CSM** : Cellule Souche Mésenchymateuse
- **C_p** : Capacité calorifique
- **D_c** : Diamètre critique
- **d** : Diamètre d'une particule
- **d_m** : Diamètre moyen des particules
- **EPR** : Enhanced Permeability and Retention
- **E_B** : Energie de barrière
- **E_T** : Energie thermique
- **f** : Fréquence du champ magnétique
- **H** : Champ magnétique
- **H_c** : Champ coercitif
- **H** : Amplitude du champ magnétique
- **ILP** : Intrinsic Loss Power
- **K** : Constante d'anisotropie
- **k_B** : Constante de Boltzmann
- **M** : Aimantation
- **M_s** : Aimantation à saturation
- **M_r** : Aimantation rémanente
- **P** : Puissance calorifique
- **PDI** : Polydispersity Index

- **SAR** : Specific Absorption Rate
 - **SBF** : Simulated Body Fluid
 - **T** : Température
 - **T_B** : Température de blocage
 - **T_C** : Température de Curie
 - **T_N** : Température de Néel
 - **V** : Volume de la particule
 - **ZFC-FC** : Zero Field Cooled – Field Cooled
 - χ : Susceptibilité magnétique
 - τ_N : Temps de relaxation de Néel
 - τ_0 : Temps intrinsèque de retournement de l'aimantation
 - τ_m : Temps d'acquisition de la mesure magnétique
 - τ_B : Temps de relaxation de Brown
 - τ_{eff} : Temps de relaxation effectif
 - η : Viscosité du milieu
 - μ_0 : Perméabilité du vide
 - μ_B : Magnéton de Bohr
 - σ : Largeur de distribution
 - σ_d : Déviation standard
 - **S_i, S_j** : Moments de spin portés par des électrons i et j
 - **X_{ij}** : Interaction élémentaire entre les électrons i et j
 - **DDL** : Diffusion Dynamique de la Lumière
 - **DRX** : Diffraction des Rayons X
 - **EDS** : Energy Dispersive X-rays Spectrometry
 - **FTIR** : Fourier Transform Infrared
 - **ICP-AES** : Inductively Coupled Plasma-Atomic Emission Spectrometry
 - **MEB** : Microscopie électronique à balayage
 - **MET** : Microscopie électronique à transmission
 - **RMN ²⁹Si**: Résonance Magnétique Nucléaire du silicium
-
- nVB+**x**min, nVB+**x**h : Nanoparticules de verre bioactif élaborées après ajout du sel de calcium à un temps **x** après le début de la réaction sol-gel
 - SiCa-**y** : Nanoparticules de verre bioactif, synthèse n°**y**

Abstract: Most of patients suffering of cancer develop bone metastases because of the migration of primary tumors cells. Surgical extraction is one of the commonly used therapies in clinical settings but deteriorates significantly the patient quality of life. In this context, it is needed to improve this therapy in order to minimize its side effects. We propose to design a new kind of multifunctional biomaterial, composed of bioactive glass and iron oxide nanoparticles to combine the benefits of bone regeneration and destruction of cancerous cells through magnetic hyperthermia. Indeed, these particles could be implanted into the cavity originating from the tumor removal, and the heat produced by the magnetic particles in an alternative magnetic field would destroy selectively the remaining or resurgent cancerous cells. Finally, the bioactive glass would induce the bone regeneration in the cavity. In a first part of this work, the influence of the synthesis parameters (sol-gel process) on the composition and the textural properties of bioactive nanoparticles ($\text{SiO}_2\text{-CaO}$) have been studied. The impact of their composition on their bioactivity has then been investigated. In a second part, core/shell nanoparticles composed of maghemite ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) and bioactive glass ($\text{SiO}_2\text{-CaO}$) have been synthesized and characterized. The good performances in terms of heating power (SAR) and bioactivity of the $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3@ \text{SiO}_2\text{-CaO}$ heterostructures pave the way to their use for bone cancer treatment.

Résumé : La plupart des patients atteints de cancer développent également des métastases osseuses dues à la migration des cellules tumorales primaires. L'extraction de la masse tumorale par une intervention chirurgicale fait partie des traitements classiques utilisés en milieu clinique, néanmoins elle détériore considérablement la qualité de vie du patient. Dans un tel contexte, il est donc nécessaire d'améliorer cette thérapie afin de minimiser les inconvénients qui y sont associés. Nous proposons l'élaboration d'un biomatériau multifonctionnel, constitué de verre bioactif et de nanoparticules magnétiques en vue de combiner les effets bénéfiques de la régénération osseuse et de la destruction des cellules cancéreuses par hyperthermie magnétique. En effet, après implantation de ces particules dans le défaut osseux généré par l'exérèse de la masse tumorale, la production de chaleur sous champ magnétique alternatif pourrait détruire totalement les cellules cancéreuses restantes ou résurgentes, puis le verre bioactif induirait la minéralisation osseuse dans la cavité. Dans une première partie, l'influence des paramètres de synthèse (voie sol-gel) sur la composition et les propriétés texturales de nanoparticules bioactives ($\text{SiO}_2\text{-CaO}$) a été étudiée. L'impact de la composition sur leur bioactivité a ensuite été évalué. Dans une deuxième partie, des nanoparticules à structure cœur-coquille composées de maghémite ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) et de verre bioactif ($\text{SiO}_2\text{-CaO}$) ont été synthétisées et caractérisées. Les bonnes performances en termes de pouvoir chauffant (SAR) et de bioactivité des hétérostructures $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3@ \text{SiO}_2\text{-CaO}$ ouvrent la voie pour leur utilisation pour le traitement des métastases osseuses.