

# Les Agents de Contraste Nanoparticulaires pour l'Imagerie Médicale : Conception, Caractérisation et Applications

---

## Nanoparticle Contrast Agents for Medical Imaging: Conception, Characterization and Applications

---

Sarah Belaïd<sup>1</sup>, Dimitri Stanicki<sup>1</sup>, Sophie Laurent<sup>1,\*</sup>, Luce Vander Elst<sup>1</sup>, Robert N. Muller<sup>1,2,\*</sup>

<sup>1</sup> Service de Chimie Générale, Organique et Biomédicale, Laboratoire de RMN et d'Imagerie Moléculaire, Université de Mons, 7000 Mons

<sup>2</sup> Centre de Microscopie et d'Imagerie Moléculaire (CMMI), 6041 Gosselies

\* Tel: +32 65 37 35 25, e-mail: [sophie.laurent@umons.ac.be](mailto:sophie.laurent@umons.ac.be)

[robert.muller@umons.ac.be](mailto:robert.muller@umons.ac.be)

### Abstract

During the last decades, researchers succeeded to reduce the size of the materials until nanometers. Thanks to their size, several nanosystems were elaborated for biomedical applications as MRI contrast agents, hyperthermia mediators for cancer ablation and drug delivery vehicles. For all these applications, the size of the material is a key factor for nanosystem biodistribution. This article presents a rapid overview of existing synthesis process for the preparation of iron oxide nanoparticles as well as the physicochemical characterization of these nanomaterials. These techniques allow to obtain informations on their size and magnetic properties. Finally, the importance of the choice of the surface coating is discussed and some biomedical applications of the nanoparticle platforms are illustrated.

### Keywords

Contrast agent, iron oxide nanoparticles, MRI, co-precipitation, thermal decomposition, drug delivery

## Introduction

Les oxydes de fer sont des composés naturels résultant de la combinaison d'oxygène et de fer, que l'on retrouve dans des environnements tels que les roches, les sédiments, les marécages ou encore dans certains organismes vivants comme par exemple les bactéries magnétotactiques. Parmi les différents oxydes de fer existants, la magnétite ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$  ou  $\text{FeO}\cdot\text{Fe}_2\text{O}_3$ ) et la maghémite ( $\text{Fe}_2\text{O}_3$ ) se distinguent par leurs propriétés ferrimagnétiques. A une échelle nanométrique, ces matériaux acquièrent de nouvelles propriétés magnétiques remarquables nommées « superparamagnétisme ». Ces nanocristaux balagent de nombreux champs d'applications potentielles qui s'étendent de la mécanique à la médecine. Dans le domaine biomédical, ces systèmes sont utilisés comme agents de diagnostic et de thérapie : en imagerie par résonance magnétique nucléaire (IRM), leur influence sur la vitesse de relaxation des protons environnants leur confère un grand intérêt en tant qu'agents de contraste, et en cancérologie, leur capacité d'absorbants d'ondes électromagnétiques de haute fréquence les rendent capables d'induire une hyperthermie localisée permettant la destruction sélective des cellules tumorales.<sup>1-3</sup>

Selon leur taille, les nanoparticules d'oxyde de fer sont divisées en trois catégories :

- les USPIO (**U**ltrasmall **S**uper**P**aramagnetic **I**ron **O**xide) dont le diamètre hydrodynamique est inférieur à 50 nm ;
- les SPIO (**S**uper**P**aramagnetic **I**ron **O**xide) caractérisées par un diamètre hydrodynamique supérieur à 50 nm ;
- et les MPIO (**M**icron-sized **I**ron **O**xide **P**articles), des particules de tailles micrométriques.

Grâce aux récentes avancées dans le domaine nanotechnologique, de nombreux procédés de synthèse conduisant à l'obtention de particules d'oxyde de fer magnétiques stables, de différentes tailles et relativement monodisperses ont été développés.

## Les voies de synthèse des nanoparticules d'oxyde de fer

- **Synthèse par coprécipitation en milieu basique**

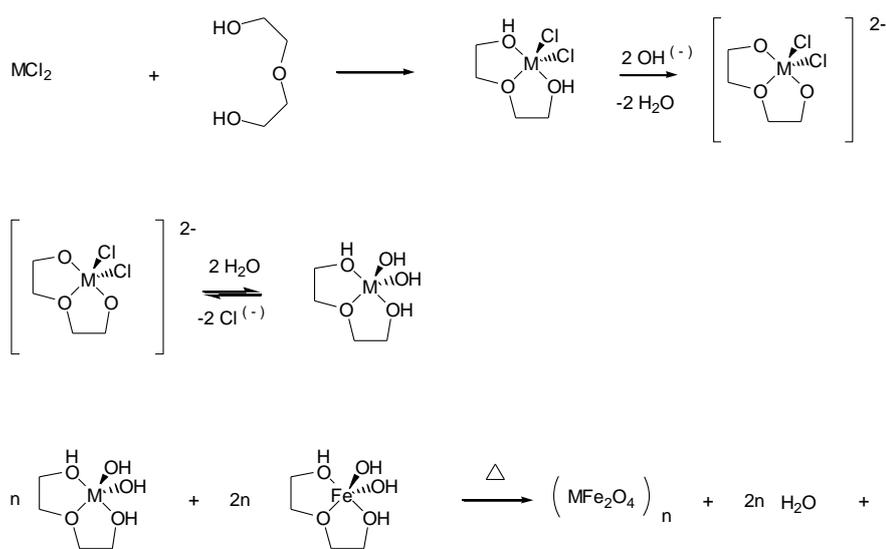
A l'origine décrite par Massart<sup>4</sup>, cette méthode permet la synthèse de magnétite par co-précipitation de sels ferreux et ferriques en milieu basique aqueux selon l'équation :



Les dispersions colloïdales de magnétite sont alors obtenues après peptisation soit par un acide (acide nitrique), soit par une base (hydroxyde de tétraméthylammonium). Ce procédé rapide et peu coûteux permet la formation à grande échelle de particules sphériques dont la taille peut être modifiée en ajustant les paramètres expérimentaux tels que la nature et le rapport des sels ferreux/ferriques, le pH, la force ionique, la vitesse d'agitation ou encore la température de réaction.

Malgré de nombreux avantages, les particules obtenues par ce procédé sont caractérisées par un indice de polydispersité élevé et un procédé de sélection en taille (magnétofiltration, centrifugation, chromatographie d'exclusion stérique) est indispensable afin de réduire la distribution en taille.

Une réduction significative de l'indice de polydispersité peut être obtenue en travaillant en présence d'un solvant organique polaire tel que les polyols. Caruntu<sup>5</sup> rapporte un mécanisme permettant d'expliquer la formation de nanoparticules de magnétite par hydrolyse d'un mélange ferreux-ferrique en milieu alcalin dans le diéthylène glycol. Ce mécanisme (figure 1) comporte trois étapes : (a) la complexation du métal par une molécule du solvant, (b) les réactions d'hydrolyse-condensation conduisant à une forme partiellement hydratée, et enfin (c) la déshydratation des nanoparticules.

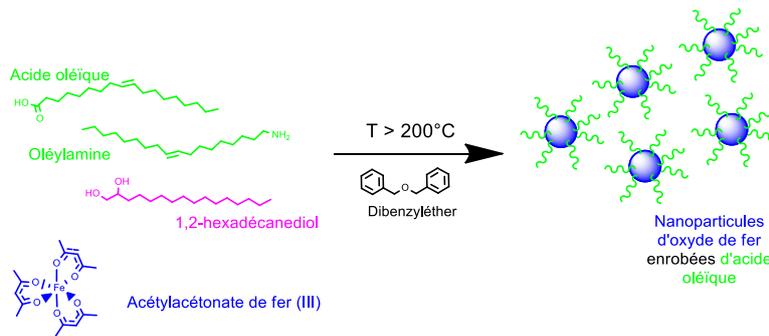


**Figure 1 : Mécanisme réactionnel proposé par Caruntu décrivant le processus de formation de nanoparticules en présence de diéthylèneglycol**

Caractérisés par une température d'ébullition élevée ainsi que par des propriétés complexantes, les polyols jouent à la fois le rôle de solvant et de surfactant, limitant ainsi les phénomènes d'agglomération habituellement observés. De plus, La présence de groupements glycols hydrophiles à la surface des nanoparticules permet une dispersion aisée en milieu aqueux.

#### ▪ Synthèse par décomposition thermique

Une approche alternative pour obtenir des nanoparticules d'oxyde de fer est la synthèse à haute température en milieu organique. La décomposition thermique est une méthode de plus en plus utilisée pour la production de nano-aimants de diamètre inférieur à 20 nm avec un bon contrôle de la taille. Cette méthode permet d'obtenir des populations de nanoparticules avec une distribution de taille très étroite et une cristallinité élevée. Sun et ses collaborateurs<sup>6, 7</sup> ont développé la synthèse par décomposition thermique dans un milieu organique réducteur. L'acétylacétonate de fer(III), le précurseur de fer, est décomposé et une partie est réduite en ions ferreux par la présence de 1,2-hexadécandiol, d'oléylamine et d'acide oléique dans le dibenzyléther. Cette réaction est portée à haute température ( $T \geq 200^\circ\text{C}$ ) afin d'induire la décomposition des réactifs en nanoparticules.<sup>8</sup>



**Figure 2** : Schéma de la synthèse des nanoparticules d'oxyde de fer par décomposition thermique

A la fin de la synthèse et après les étapes de purification, les nanoparticules sont enrobées d'acide oléique et peuvent être dispersées dans un solvant organique (hexane, heptane, toluène,...). Cette synthèse permet l'obtention d'une solution de nanoparticules d'oxyde de fer de taille contrôlée avec un faible indice de polydispersité sans l'utilisation de système de sélection de taille après synthèse.

## L'imagerie par résonance magnétique

Depuis plusieurs décennies, l'imagerie par résonance magnétique (IRM) s'est imposée comme une technique de choix pour le diagnostic médical. Cette technique d'imagerie permet une visualisation précise des différents organes et tissus d'un organisme par l'acquisition de coupes réalisées dans toutes les directions de l'espace. Son intérêt réside dans la mise en évidence, de manière non invasive et avec une résolution spatiale exceptionnelle (de l'ordre du  $\mu\text{m}$  pour les appareils les plus performants), d'anomalies tissulaires (malformations ou tumeurs) indétectables par d'autres techniques d'imagerie. Le principe de cette technique repose sur l'application de gradients de champ magnétique dans les trois directions de l'espace lors d'une expérience de résonance magnétique nucléaire. L'image résultant de cet encodage spatial des noyaux d'hydrogène est constitué de « pixels », dont les niveaux de gris représentent l'intensité du signal émis par l'élément de volume correspondant (voxel). L'intensité du signal dépendra de paramètres intrinsèques, à savoir, de la concentration locale en protons ainsi que de leur vitesse de relaxation longitudinale ( $R_1$ ) et transverse ( $R_2$ ). En fonction de l'environnement et de leur dynamique, les cinétiques de relaxation varient et induisent des modulations de l'intensité de l'image selon la nature tissulaire des différents organes.

### ▪ La relaxation nucléaire : Généralités

La relaxation nucléaire correspond à l'évolution d'un système de spins nucléaires excités par l'application d'une onde électromagnétique de fréquence appropriée. Elle tire son origine des fluctuations microscopiques des champs magnétiques, conséquentes, notamment, à des mouvements moléculaires. Les vitesses de relaxation longitudinale ( $R_1$ ) et transverse ( $R_2$ ) sont ainsi déterminées par l'amplitude des interactions magnétiques et par leur modulation temporelle. Elles sont exprimées par la relation générale (1) suivante :

$$\frac{1}{T_i} = R_i = K E_c^2 f(\tau_c) \quad (1)$$

où :  $i = 1, 2$  ;  $K$  est une constante,  $E_c$  est l'amplitude de l'interaction responsable de la relaxation et  $f(\tau_c)$  est une fonction de temps de corrélation ( $\tau_c$ ) qui module l'interaction.

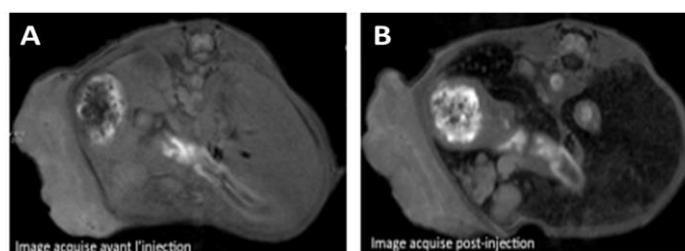
- **Notion d'agents de contraste**

Typiquement, la sensibilité d'un examen IRM est accrue par l'administration d'**agents de contraste** au patient. Le rôle de ces agents est ainsi de « doper » la relaxation nucléaire. L'efficacité d'un agent de contraste est déterminée par sa relaxivité ( $r_i$ ), qui est définie comme l'augmentation qu'apporte une millimole de composé paramagnétique ou superparamagnétique par litre, à la vitesse de relaxation des protons de l'eau. Elle s'exprime donc en  $s^{-1}.mM^{-1}$  et est donnée par l'équation (2) :

$$r_i = \frac{R_i^{obs} - R^{end}}{[C]} \quad (2)$$

où  $i = 1$  ou  $2$ ,  $R_i^{obs}$  est la vitesse de relaxation observée ( $s^{-1}$ ) et est égale à  $1/T_i$ ,  $R^{end}$  est la vitesse de relaxation du solvant ou du milieu (contribution diamagnétique) et  $[C]$  est la concentration (mM) en substance paramagnétique ou superparamagnétique.

Un agent de contraste se doit d'être non toxique, biocompatible et efficace à faible dose. En ce sens, l'efficacité des colloïdes superparamagnétiques n'est plus à démontrer. Grâce à leur moment magnétique important, les nanoparticules d'oxyde de fer vont créer localement de grandes inhomogénéités de champ magnétique au voisinage des protons environnants. Cette hétérogénéité aura pour conséquence une accélération du déphasage des spins nucléaires des protons et une diminution du temps de relaxation transverse ( $T_2$ ). Cet effet induit la décroissance de l'intensité du signal et l'assombrissement de l'image où les nanoparticules se sont accumulées (figure 3). Ce type de contraste est dit « négatif ».



**Figure 3** : Images IRM d'une coupe axiale d'une souris (A) avant et (B) après injection de la solution d'un agent de contraste nanoparticulaire

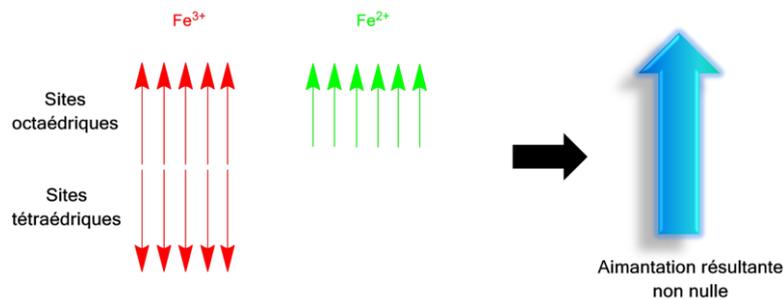
L'accroissement des vitesses de relaxation induite par ce type de particules dépend de leurs propriétés intrinsèques, à savoir la taille du grain magnétique, sa composition, ses propriétés magnétiques ainsi que la nature de son enrobage.

## Propriétés magnétiques et relaxométriques de la magnétite

- **Notion de superparamagnétisme**

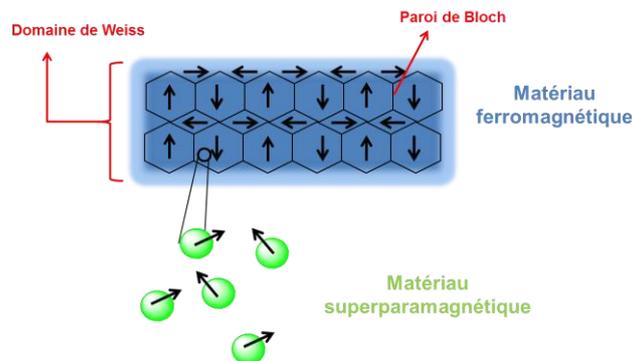
Le magnétisme des ferrites résulte principalement du couplage anti-parallèle des électrons 3d non appariés des ions ferreux et ferriques répartis dans les sites tétraédriques et octaédriques de son réseau cubique à faces

centrées. Comme les moments magnétiques de ces spins ne se compensent pas dans les sous-réseaux, il en découle une aimantation résultante non nulle à basse température (figure 4). Au-delà d'une température critique (température de Néel), l'ordre disparaît et le moment magnétique résultant devient nul.



**Figure 4 :** Représentation schématique de l'aimantation élevée de la magnétite due à la présence des électrons 3d non appariés des ions ferreux et ferriques dans les sites octaédriques et tétraédriques

Pour des raisons énergétiques, les spins d'un cristal ferromagnétique ne sont pas tous alignés suivant la même direction : il existe différents domaines de taille micrométrique (domaine de Weiss; figure 5), chacun d'entre eux étant caractérisé par une magnétisation uniforme. Au sein de chacun de ces domaines délimités par des frontières (paroi de Bloch), tous les moments magnétiques sont alignés, définissant ainsi une direction privilégiée pour l'aimantation résultante. Toutefois, sous l'effet d'un champ magnétique extérieur, les domaines dont la direction d'aimantation est favorable énergétiquement voient leur volume croître au détriment de ceux dont la magnétisation pointe dans une direction énergétiquement plus coûteuse, définissant ainsi une direction privilégiée pour l'aimantation résultante.



**Figure 5 :** Comparaison de la structure d'un matériau ferromagnétique et superparamagnétique

Pour une taille inférieure à un domaine de Weiss, la particule n'est plus composée que d'un seul et unique domaine magnétique (figure 5). Les nanoparticules d'oxyde de fer possèdent une dimension de l'ordre du nanomètre (inférieure donc à la taille d'un domaine), ce qui explique leurs propriétés superparamagnétiques.

Dans un monodomaine superparamagnétique, le choix de la direction d'aimantation n'est pas arbitraire. Il existe des axes dits « faciles » dépendant de la nature et de la forme du cristal, le long desquels la magnétisation a tendance à s'aligner, de manière à minimiser l'énergie d'anisotropie du système. Dans le cas simplifié d'une particule possédant un seul axe d'anisotropie, l'énergie d'anisotropie<sup>9-12</sup> s'exprime par l'équation (3) :

$$E_a = K_a V \sin^2\theta \quad (3)$$

où  $\theta$  est l'angle entre le vecteur moment magnétique et la direction d'aimantation facile, et  $V$  est le volume du cristal et  $K$  correspond à la

constante d'anisotropie

L'énergie d'anisotropie est donc proportionnelle au volume du cristal magnétique ainsi qu'à la constante d'anisotropie. Cette constante peut être influencée par quatre contributions pour les nanoparticules isolées: (1) la composition chimique et la structure cristallographique du matériau ; (2) la forme des nanoparticules ; (3) la nature de la surface des nanoparticules et (4) l'inter-distance entre les nanoparticules. Dans le cas de nanoparticules agglomérées, seule la contribution de la distance entre deux nanoparticules intervient dans cette relation.

Le basculement du vecteur moment magnétique, d'une direction facile à l'autre le long de l'axe d'anisotropie, est observé lorsque l'énergie thermique est suffisante afin de sauter la barrière d'énergie d'anisotropie. Le temps moyen pour que le vecteur bascule d'une direction à l'autre est appelé « temps de relaxation de Néel ( $\tau_N$ ) » et est donné par l'équation (4) :

$$\tau_N = \tau_0(E_a) e^{\frac{E_a}{kT}} \quad (4)$$

Où  $\tau_N$ = temps de relaxation de Néel,  $k$ =constante de Boltzmann,  $T$ = température et  $\tau_0(E_a)$ = facteur pré-exponentiel de l'expression du temps de relaxation de Néel.

Par cette relation, on notera que le temps de relaxation de Néel est à la fois fonction de la température ainsi que du volume du cristal superparamagnétique. Ce temps est suffisamment court pour qu'une mesure effective de magnétisation donne une valeur nulle en l'absence de champ extérieur. Lorsque les nanoparticules superparamagnétiques sont soumises à un champ magnétique extérieur, les fluctuations ne disparaissent pas, mais le vecteur moment magnétique reste suffisamment de temps dans la (les) direction(s) facile(s) proches de la direction du champ magnétique extérieur, donnant lieu à une magnétisation résultante proportionnelle à ce champ magnétique extérieur. Le comportement de ces nanoparticules est comparable à celui des corps paramagnétiques, néanmoins, la susceptibilité magnétique des nanoparticules est plus élevée (environ 100 fois), due au comportement collectif des électrons imposé par leur interaction d'échange, ce qui justifie l'appellation « superparamagnétique » qui leur a été conférée. La dépendance vis-à-vis du volume dans l'argument de l'exponentielle montre que pour des cristaux suffisamment volumineux, de tels changements de directions peuvent ne pas être observés (car leur temps de relaxation de Néel devient extrêmement long). On définit le volume du blocage  $V_B$  comme le volume critique d'une particule au-delà duquel le moment magnétique apparaît gelé pour un temps de mesure et une température donnés. Dans ce cas, seul un mouvement de rotation de l'ensemble du nanocristal soumis à l'agitation thermique intervient. Le temps caractéristique de cette rotation est donné par le temps de relaxation de Brown selon la relation (5) :

$$\tau_B = \frac{4\pi a^3 \eta}{3kT} \quad (5)$$

où  $a$  est le rayon de la particule et  $\eta$  la viscosité du fluide.

Ainsi, la vitesse de relaxation globale d'une solution nanoparticulaire superparamagnétique est modulée par la relaxation de Néel et la relaxation brownienne suivant la relation (6) :

$$\frac{1}{\tau} = \frac{1}{\tau_N} + \frac{1}{\tau_B} \quad (6)$$

Où  $\tau$ = temps de relaxation magnétique global et  $\tau_B$  = le temps de relaxation brownien.

Par conséquent, le mécanisme le plus rapide domine la relaxation. Le comportement des nano-aimants sera cependant différent selon qu'ils sont en solution ou attachés de manière rigide à la paroi d'une cellule. Ainsi par exemple, si le nano-cristal est sous forme de poudre ou est attaché à un support rigide, seul le temps de relaxation de Néel intervient dans le processus de relaxation magnétique.

En ce qui concerne la magnétite (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>), la relaxation de Néel domine pour des cristaux de diamètre inférieur à 14 nm. Au contraire, pour des particules de magnétite de diamètre supérieur à 14 nm, la relaxation magnétique est régie presque exclusivement par la relaxation de Brown.

▪ **Relaxation induite par les cristaux superparamagnétiques**

Un modèle théorique spécifique aux particules de ferrites superparamagnétiques a été développé sur base de la théorie de la relaxation « outer sphere » décrite par Freed<sup>9, 11, 12</sup> (équation (7)) :

$$R_1^{OS} = \frac{6400\pi}{81} \left(\frac{\mu_0}{4\pi}\right)^2 \gamma_I^2 \gamma_S^2 \hbar^2 S(S+1) N_A \frac{[C]}{dD} [7j(\omega_S \tau_D) + 3j(\omega_I \tau_D)] \quad (7)$$

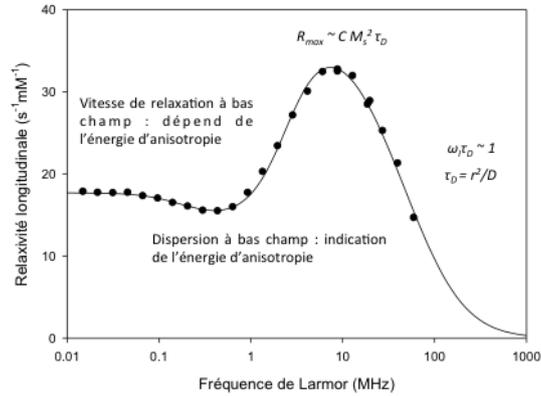
avec

$$j(\omega_I \tau_D) = \left[ Re \frac{1 + \frac{1}{4}(i\omega \tau_D + \tau_D/\tau_{S1})^{1/2}}{1 + (i\omega \tau_D + \tau_D/\tau_{S1})^{1/2} + \frac{4}{9}(i\omega \tau_D + \tau_D/\tau_{S1}) + \frac{1}{9}(i\omega \tau_D + \tau_D/\tau_{S1})^{3/2}} \right]$$

où  $\gamma_S$  et  $\gamma_H$  sont respectivement les rapports gyromagnétiques de l'électron (S) et du proton (H),  $\omega_S$  et  $\omega_H$  sont les fréquences angulaires de l'électron et du proton,  $\tau_{S1}$  est le temps de relaxation longitudinale des électrons (dépendant du champ magnétique statique B<sub>0</sub>), d est la distance de plus petite approche, D est la constante de diffusion relative, [C] est la concentration molaire en ions magnétiques,  $\tau_c = d^2/D$  est le temps de corrélation translationnel et  $j(\omega, \tau_D)$  une fonction de densité spectrale.

Ce modèle de relaxation se base sur la diffusion des protons des molécules de solvants au voisinage des inhomogénéités de champ magnétique créées par les particules superparamagnétiques. Cette interaction dipolaire entre le spin du proton et le moment magnétique de la particule est modulée par le temps de corrélation translationnel ( $\tau_D$ ) qui tient compte de la constante de diffusion relative (D) du centre superparamagnétique et de la molécule de solvant ainsi que de la distance de plus petite approche (d).

En fonction de la taille du cristal, de sa composition ainsi que de l'intensité du champ magnétique externe appliqué, le champ local perçu par les protons soumis à l'influence des cristaux superparamagnétiques variera, induisant une variation des temps de relaxation, comme l'illustre la mesure de relaxivité longitudinale à champ variable (figure 6).



**Figure 6 : Exemple de profil NMRD d'une solution de nanoparticules d'oxyde de fer superparamagnétiques**

Les profils NMRD (Nuclear Magnetic Resonance Dispersion) représentent un outil précieux pour évaluer l'efficacité des agents de contraste destinés à l'IRM. Obtenus par une méthode de relaxométrie à cyclage rapide de champ magnétique, ils permettent une caractérisation rapide de la plupart des paramètres physiques concernant les particules superparamagnétiques.

Le lissage des profils NMRD par la théorie de relaxation « outer sphere », permet de déterminer les paramètres suivants :

➔ **Le rayon moyen (r)**

A haut champ, la vitesse de relaxation ne dépendra que du temps de corrélation translationnel ( $\tau_D$ ) et le point d'inflexion correspond à la condition  $\omega_l \tau_D \sim 1$  avec  $\omega_l$  la fréquence angulaire du proton et  $\tau_D = r^2/D$

Moyennant la connaissance de la constante de diffusion relative (D), la détermination de  $\tau_D$  permet de calculer r, le rayon moyen des cristaux superparamagnétiques. Un accroissement de la taille du grain conduit à la fois à une augmentation de la vitesse de relaxation mais également à un déplacement du point d'inflexion de la courbe vers les faibles fréquences pour remplir la condition  $\omega_l \tau_D \sim 1$ .

➔ **L'aimantation à saturation ( $M_s$ )**

A haut champ,  $M_s$  peut être obtenu à partir de l'équation  $R_{max} \sim C M_s^2 \tau_D$  où C est une constante et  $R_{max}$  la vitesse de relaxation maximale. Cette relation est valable uniquement si les champs considérés sont assez élevés pour que la relaxation ne dépende uniquement que de  $\tau_D$ .

➔ **L'énergie d'anisotropie du cristal ( $E_a$ )**

La présence ou non d'une dispersion à faible champ fournit des informations quant à l'amplitude de l'énergie d'anisotropie. Pour les cristaux présentant une haute énergie d'anisotropie, par rapport à l'agitation thermique, la dispersion à bas champ disparaît.

➔ **Le temps de relaxation de Néel**

La vitesse de relaxation à très bas champ est gouvernée par un temps de corrélation à champ nul  $\tau_{C0}$  qui est égal à  $\tau_N$  si  $\tau_N \ll \tau_D$ . Le plus fréquemment, cette situation n'est pas rencontrée et donc la valeur de

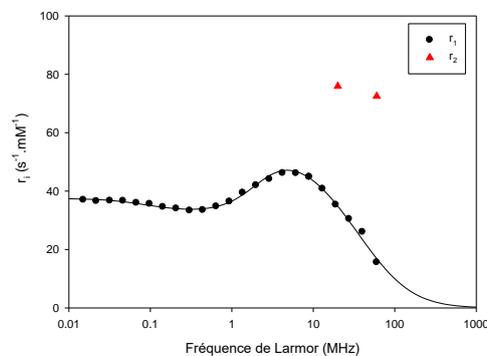
$T_N$  est apportée à titre qualitatif. Il convient de souligner que toutes les valeurs issues du lissage théorique des profils NMRD sont des valeurs moyennes, qui sont influencées par la polydispersité de taille de l'échantillon.

## Caractérisation des propriétés physicochimiques et morphologiques des nanoparticules

Les propriétés magnétiques des nanoparticules dépendent de la taille et de la forme des nanoparticules, ainsi que la structure cristalline de ce matériau. Plusieurs techniques peuvent être utilisées afin de définir ces propriétés.

### ▪ Mesure de relaxivité

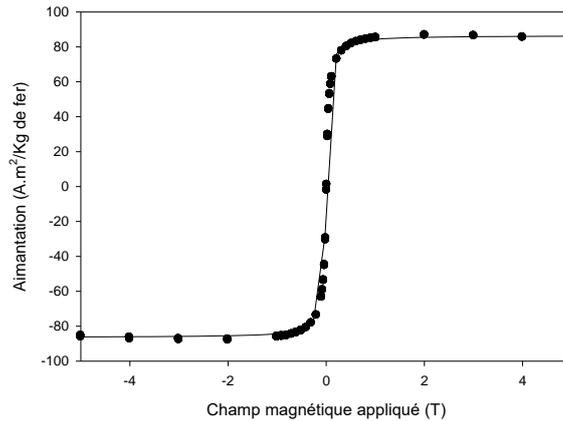
Comme nous l'avons déjà mentionné précédemment, pour être efficace un agent de contraste doit pouvoir « doper » la vitesse de relaxation des protons environnants afin d'induire une modification de l'intensité du signal dans la zone où il s'est accumulé. Outre leur influence sur la vitesse de relaxation longitudinale ( $R_1$ ), les oxydes de fer agissent de manière prédominante sur la vitesse de relaxation transverse ( $R_2$ ), induisant une chute importante du signal. Contrairement à l'effet sur  $R_1$  qui diminue brutalement après 10MHz, l'effet sur  $R_2$  reste constant même à très haut champ (figure 7). A l'heure où les fabricants d'imageur à résonance magnétique produisent des appareils dotés d'aimants de plus en plus puissants (pouvant atteindre près de 10T), on comprend l'intérêt croissant des cliniciens pour ce type de particules.



**Figure 7** : Profil NMRD d'une solution de nanoparticules d'oxyde de fer superparamagnétiques

### ▪ Propriétés magnétiques des particules

Le lissage théorique d'une courbe magnétométrique par une fonction de Langevin permet de déterminer le rayon magnétométrique du cristal magnétique ainsi que son aimantation à saturation (aimantation lorsque tous les spins nucléaires sont alignés). L'allure de la courbe de mesure renseigne sur la nature magnétique du matériau. Une courbe magnétique ne présentant pas d'hystérèse confirme la présence de nanocristaux superparamagnétiques.

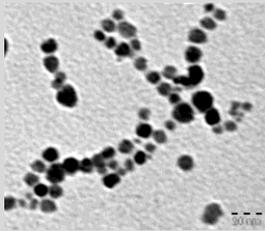
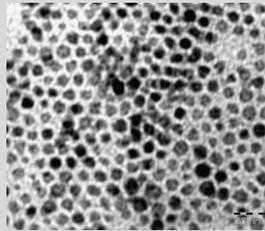


**Figure 8 : Courbe magnétométrique d'une solution de nanoparticules d'oxyde de fer superparamagnétiques**

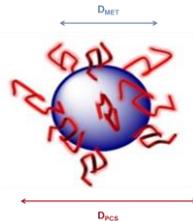
▪ **Détermination de la taille des particules**

Selon l'application visée, il est important de pouvoir disposer de particules de taille contrôlée caractérisées par un faible indice de polydispersité. Différentes méthodes peuvent être utilisées pour déterminer la dimension de particules. Précédemment, nous avons vu que des modèles théoriques permettent d'estimer un diamètre particulaire moyen au départ des résultats expérimentaux obtenus par relaxométrie (profils NMRD) ou par les courbes magnétométriques. Toutefois, les valeurs issues de ces lissages théoriques sont des valeurs moyennes, qui sont influencées par l'hétérogénéité en taille de l'échantillon. La microscopie à transmission électronique (MET) est une des techniques permettant d'imager les nanoparticules à l'échelle nanométrique et ainsi en déduire, après comptage d'un nombre statistiquement significatif de particules, le diamètre du cœur magnétique et l'indice de polydispersité (PDI), ainsi que la forme des objets analysés (tableau 1). Ainsi par exemple, les résultats indiquent que la synthèse par décomposition thermique permet de produire des nanoparticules avec un indice de polydispersité plus faible que celui des nanoparticules synthétisées selon la méthode par coprécipitation.

**Tableau 1 : Images TEM de nanoparticules d'oxyde de fer synthétisées par coprécipitation et par décomposition thermique**

Synthèse par :	Coprécipitation	Décomposition thermique
Image MET		
Forme	sphérique	sphérique
$D^{MET} \pm \text{écart-type (nm)}$	$8.4 \pm 2.1$	$5.7 \pm 0.8$
PDI	1.32	1.07

La spectroscopie de corrélation photonique (PCS) constitue une autre technique fréquemment employée afin d'estimer le diamètre des nanoparticules ainsi que leur distribution en taille. La détermination du coefficient de diffusion des nanoparticules en solution permet d'avoir accès au diamètre hydrodynamique par la seule connaissance de la viscosité du milieu. Le diamètre hydrodynamique correspond au diamètre des nanoparticules incluant l'enrobage et les couches de solvation (figure 9).



**Figure 9** : Comparaison des diamètres mesurés par microscopie électronique à transmission ( $D_{MET}$ ) et par spectroscopie à corrélation photonique ( $D_{PCS}$ )

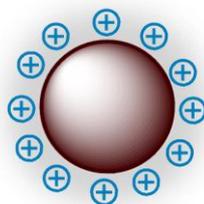
D'autres techniques telles que la diffraction de rayons X (DRX) ou encore la microscopie à force atomique (AFM) permettent également de fournir de précieuses informations sur la dimension et la distribution en taille des particules mais leur usage est moins fréquent et ne sera donc pas discuté.

## Modification et étude de la surface des nanoparticules

### ▪ Nature de l'enrobage

La stabilisation des nanoparticules est un paramètre crucial afin d'obtenir des fluides colloïdaux stables vis-à-vis des phénomènes d'agrégation, en particulier en milieu biologique et sous l'effet d'un champ magnétique. La stabilité d'une telle suspension résulte d'un équilibre entre des forces attractives (type van der Waals et forces dipolaires magnétiques) et répulsives (électrostatiques et stériques). Même si une phase dispersée est instable d'un point de vue thermodynamique (de par leur petite taille, les nanoparticules sont caractérisées par un rapport surface/volume important et pour réduire cette tension interfaciale, les nanoparticules vont donc s'agglomérer spontanément), d'un point de vue cinétique, la stabilisation de particules magnétiques peut être atteinte en influant sur l'une des deux forces répulsives (figure 10).

**Stabilisation électrostatique**



**Stabilisation stérique**



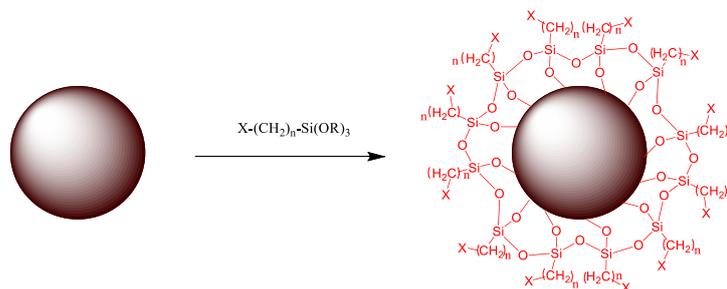
**Figure 10** : Comparaison entre la stabilisation électrostatique et stérique

Dans le cadre des applications biomédicales, l'enrobage doit être biocompatible et non toxique. Différentes matrices ont été employées afin de stabiliser les nanoparticules en milieu physiologique. La plupart des stratégies employées sont fondées sur l'adsorption d'un matériau de poids moléculaire important (éventuellement chargé)

permettant de stabiliser le cœur magnétique soit en cours de synthèse, soit après préparation. L'exemple le plus répandu est celui du dextran et de ses dérivés (comme le carboxydextran), dont les composites ont été commercialisés pour des applications cliniques sous les noms d'Endorem® ou de Resovist®. Le mécanisme d'adsorption du dextran à la surface des oxydes de fer résulte essentiellement de liaisons hydrogènes entre les groupements polaires distribués le long de la chaîne polymère et les fonctions hydroxyles présentes à la surface des particules. D'autres enrobages à base de matériaux polymères synthétiques tels que le polyéthylène glycol (PEG), l'alcool de polyvinyle (PVA),... ou des polymères naturels tels que le chitosan, l'alginate, ... ont également été décrits dans la littérature.<sup>13</sup>

Parmi l'ensemble des matrices étudiées, la fonctionnalisation de la surface des oxydes de fer par la silice et les agents silaniques organofonctionnels suscitent un intérêt particulier. En effet, la silice possède de nombreux avantages : elle permet une fixation covalente à la surface des particules, elle est chimiquement inerte et bon marché. Les procédés de couplage à sa surface, notamment avec les organosilanes, sont relativement simples. L'intérêt d'employer des agents silaniques organofonctionnels (de formule  $X-(CH_2)_n-Si(OR)_3$  où X représente un groupement fonctionnel et R = H ou un groupement alkyle) repose, entre autres, sur la diversité importante de leur groupement fonctionnel X, offrant ainsi une variété importante de possibilités de fonctionnalisation de surface.

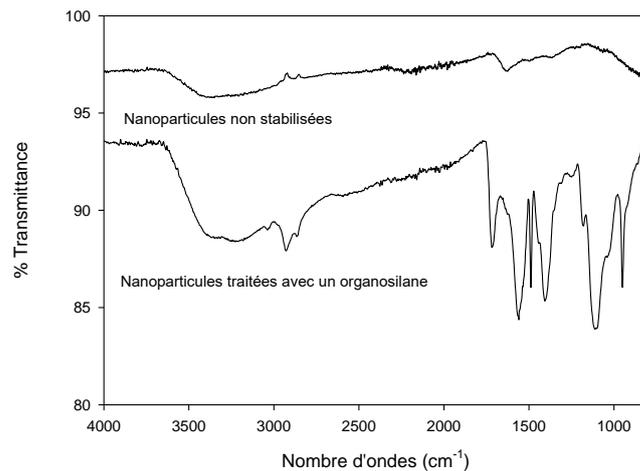
La réaction de silanisation d'une particule au moyen d'un trialkoxyalkylsilane est un procédé complexe qui implique une succession d'étapes d'hydrolyse/condensation dont le résultat final est l'enrobage d'une ou plusieurs particules par une couche plus ou moins épaisse (allant d'environ 1 nm à plusieurs dizaines de nm) de polysiloxane (figure 11).



**Figure 11** : Silanisation de la surface des nanoparticules d'oxyde de fer avec des organosilanes fonctionnels

#### ▪ Caractérisation de la surface des particules

Divers outils permettent de confirmer la modification de la surface des particules. De manière indicative, la spectroscopie infra-rouge permet d'attester de la présence d'une couche de polysiloxane en comparant les spectres avant et après silanisation. Dans l'exemple (figure 12), nous pouvons ainsi clairement constater l'apparition de bandes vers  $2900\text{ cm}^{-1}$  ( $-CH_2-$ ),  $1700\text{ cm}^{-1}$  ( $-C=O$ ) et entre  $1000$  et  $1200\text{ cm}^{-1}$  ( $-Si-O-Si-$ ) caractéristiques du composé organosilanique employé.



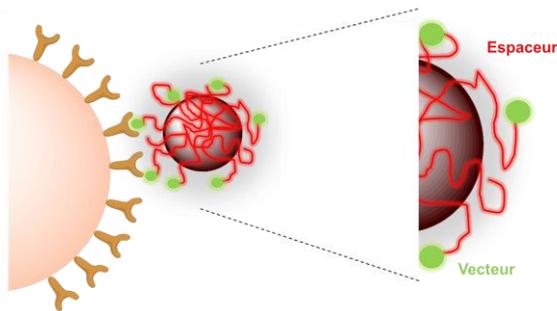
**Figure 12** : Spectres infra-rouges avant et après modification de la surface des nanoparticules d'oxyde de fer avec des organosilanes fonctionnels

Une mesure du potentiel zêta sur une large de gamme de pH permet de déterminer la valeur du point isoélectrique (PIE). Le PIE des nanoparticules d'oxyde de fer non enrobés se situent autour d'une valeur de pH égale à 6.5. Dans l'hypothèse d'un enrobage avec des fonctions acides ou basiques en surface, un déplacement du PIE vers les pH acides ou basiques confirme la modification de la surface des particules. De plus, cette valeur est un indicateur important de la stabilité d'une suspension colloïdale puisque c'est aux pH proches du PIE que le colloïde est le moins stable.

Enfin, la détermination du diamètre hydrodynamique et de la distribution en taille obtenue par spectroscopie de photocorrelation (PCS) peut également s'avérer utile afin d'estimer la dimension des grains magnétiques après enrobage. Couplée à une analyse relaxométrique, les informations obtenues permettront d'évaluer si l'augmentation du diamètre hydrodynamique est le résultat de l'enrobage de plusieurs grains magnétiques ou de l'enrobage d'un seul grain. D'autres informations peuvent être obtenues par une analyse thermogravimétrique (masse de matière organique en surface), la microscopie électronique haute résolution (épaisseur de l'enrobage) ou encore le TOF-SIMS (détermination des fragments moléculaires en surface).

## Développement actuels

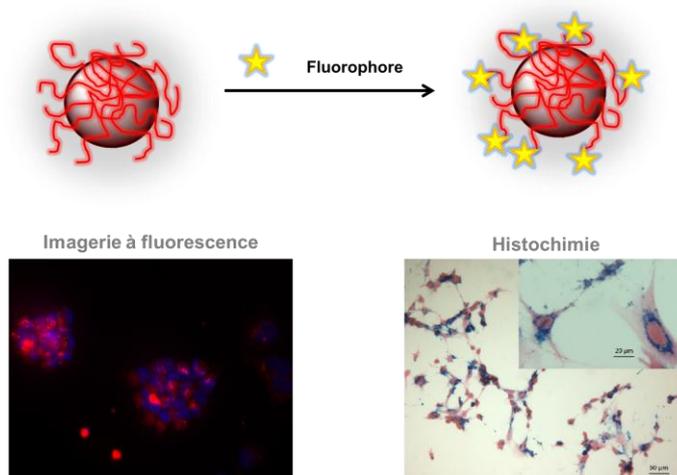
Les recherches actuelles visent à optimiser la spécificité et l'efficacité des agents de contraste superparamagnétiques. Ainsi, les études de pointe s'orientent vers le développement d'agents de contraste dit « intelligents » destinés à l'imagerie moléculaire dont le principe repose sur la reconnaissance à l'échelle moléculaire de biomarqueurs spécifiques de pathologies. Typiquement, cette méthode requiert l'emploi d'agents de contraste ciblés qui sont des systèmes moléculaires souvent complexes, constitués d'un vecteur (peptide, oligonucléotide ou molécule de synthèse) spécifique de la structure ciblée et couplé, par l'intermédiaire d'un espaceur (linker), à l'agent de contraste (figure 13).



**Figure 13** : Interaction de l'agent de contraste superparamagnétique fonctionnalisé avec un vecteur spécifique à la pathologie surexprimée par la cible

Un nouveau domaine d'application a fait son apparition depuis quelques années. Il combine les aspects thérapeutiques et diagnostiques pour fournir des agents « théragnostiques ». <sup>14</sup> Les nanoparticules d'oxyde de fer peuvent être utilisées comme des transporteurs de médicaments. Leur propriété magnétique particulière leur offre la possibilité de conduire les médicaments à la zone cible par l'action d'un aimant extérieur (aspect thérapeutique). La validation de leur localisation dans l'organisme et le suivi du traitement sont confirmés par IRM (aspect diagnostique). Ces médicaments sont libérés dans la région de la cible par des actions stimulantes induites par exemple par la modification du pH, de la température, de l'action d'une enzyme, ... <sup>15,16</sup> Une autre application théragnostique de ces systèmes est de les utiliser dans le traitement par hyperthermie. Lorsqu'une onde électromagnétique alternative est envoyée où les nanoparticules se sont accumulées, les nano-éléments induisent une élévation de température et par conséquent la destruction de la zone tumorale ciblée. <sup>1, 17-19</sup>

La recherche évolue également vers la formation de plateformes d'imagerie multifonctionnelles combinant plusieurs caractéristiques en un seul système. Par exemple, le greffage d'un fluorophore à la surface des particules permet de disposer d'une sonde multimodale combinant l'IRM à l'imagerie optique. L'avantage de cette association est de palier les défauts et avantages de ces deux techniques d'imagerie. La combinaison de la haute résolution de l'IRM à la sensibilité élevée de l'imagerie optique permet la conception de plateforme très performantes, particulièrement pour le marquage cellulaire. En outre, le marquage de cellules souches permet de localiser ces cellules après implantation dans un organisme vivant dans l'optique d'une thérapie cellulaire.



**Figure 14** : Exemple d'une plateforme bimodale magnétique et fluorescente ; Caractérisation par microscopie à fluorescence et par histochemie

## Conclusions

Les avancées spectaculaires dans le domaine médical exigent des outils de diagnostic toujours plus précis et efficaces. Devant ces enjeux importants, des outils d'investigation puissants sont nécessaires notamment dans la conception de nouveaux agents de contraste. En ce sens, les fluides magnétiques à base de magnétite constituent un outil très prometteur. Que ce soit en tant qu'outils de diagnostic et/ou outils thérapeutiques, le diamètre de ces particules, leur distribution en taille ainsi que la composition de leur surface constituent des paramètres clefs afin d'optimiser leur efficacité et leur stabilité en milieu biologique.

Divers outils permettent de fournir une description très complète des propriétés physicochimiques du colloïde magnétique. Ainsi, nous avons vu comment les méthodes relaxométriques et magnétométriques permettent de rapidement estimer la taille du cœur superparamagnétique, son aimantation à saturation, le temps de relaxation de Néel du cristal ainsi que les valeurs de relaxivités à différents champs.

Les recherches menées actuellement au laboratoire portent sur le développement, la caractérisation et la validation d'agents de contraste destinés à l'imagerie moléculaire. Ainsi, différents vecteurs (peptides ou organomimétiques) ont été greffés avec succès à la surface de ces nano-objets dans le but de les rendre capables d'identifier spécifiquement certaines pathologies au stade précoce.

## Remerciements

Les auteurs remercient le Dr. Alain Roch pour son aide précieuse, en particulier pour la compréhension des notions théoriques abordées dans le cadre ce travail. Nous souhaitons également remercier Mme Corinne Piérart pour son aide ainsi que Mme Marjorie Vermeersch et Dr. Pérez Morga pour les clichés TEM effectués au sein du laboratoire de parasitologie moléculaire de l'Université Libre de Bruxelles. Enfin, les auteurs remercient le Fonds pour la Recherche dans l'Industrie et dans l'Agriculture (F.R.I.A.), la Région Wallonne (au profit de la spin-off « AGEKO »), le Fonds National de la Recherche Scientifique (F.N.R.S.) et les programmes ARC, PAI et ENCITE pour les financements octroyés.

## Références

1. Laurent, S.; Dutz, S.; Häfeli, U.O.; Mahmoudi, M., *Adv. Colloid Interface Sci.*, **2011**, 166, 8-23
2. Laurent, S.; Boutry, S.; Mahieu, I.; Vander Elst, L.; Muller, R.N., *Curr. Med. Chem.*, **2009**, 16, 4712-4727
3. Huang, S.-H.; Juang, R.-S., *J.Nanopart. Res.*, **2011**, 13, 4411-4430
4. Lefebure, S.; Dubois, E.; Cabuil, V.; Neveu, S.; Massart, R., *J. Mater. Res.*, **1998**, 13, 2975-1981
5. Caruntu, D.; Caruntu, G.; Chen, Y.; O'Connor, C.J.; Goloverda, G.; Kolesnichenko, V.L., *Chem. Mater.*, **2004**, 16, 5527-5534
6. Sun, S.; Zeng, H., *J. Am. Chem. Soc.*, **2002**, 124, 8204-8205
7. Sun, S.; Zeng, H.; Robinson, D.B.; Raoux, S.; Rice, P.M.; Wang, S.X.; Li, G., *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**, 126, 273-279
8. Belaïd, S.; Sophie, L.; Marjorie, V.; Vander Elst, L.; Perez-Morga, D.; Muller, R.N., *Nanotechnology*, **2013**, 24, 055705
9. Gossuin, Y.; Gillis, P.; Hocq, A.; Vuong, Q.L.; Roch, A., *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology*, **2009**, 1, 299-310
10. Roch, A.; Gillis, P.; Ouakssim, A.; Muller, R.N., *J. Magn. Magn. Mater.*, **1999**, 201, 77-79
11. Roch, A.; Gossuin, Y.; Muller, R.N.; Gillis, P., *J. Magn. Magn. Mater.*, **2005**, 293, 532-539
12. Roch, A.; Muller, R.N.; Gillis, P., *J. Chem. Phys.*, **1999**, 110, 5403-5411
13. Laurent, S.; Forge, D.; Port, M.; Roch, A.; Robic, C.; Vander Elst, L.; Muller, R.N., *Chem. Rev.*, **2008**, 108, 2064-2110
14. Kim, C.S.; Tonga, G.Y.; Solfiell, D.; Rotello, V. M., *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **2013**, 65, 93-99
15. Barakat, N.S., *Nanomedecine*, **2009**, 4, 799-812
16. Bhaskar, S.; Tian, F.; Stoeger, T.; Kreyling, W.; Fuente, J.M.; Grazú, V.; Borm, P.; Estrada, G.; Ntziachristos, V.; Razansky, D., *Part. Fibre Toxicol.*, **2010**, 7:3
17. Le Renard, P.-E.; Lortz, R.; Senatore, C.; Rapin, J.-P.; Buchegger, F.; Petri-Fink, A.; Hofmann, H.; Doelker, E.; Jordan, O., *J. Magn. Magn. Mater.*, **2011**, 323, 1054-1063
18. Torres, T.E.; Roca, A.G.; Morales, M.P.; Ibarra, A.; Marquina, C.; Ibarra, M.R.; Goya, G.F., *J. Phys. Conf. Ser.*, **2010**, 200, 072101
19. Pankhurst, Q.A.; Thanh, N.K.T.; Jones, S.K.; Dobson, J., *J. Phys. D Appl. Phys.*, **2009**, 42, 224001