



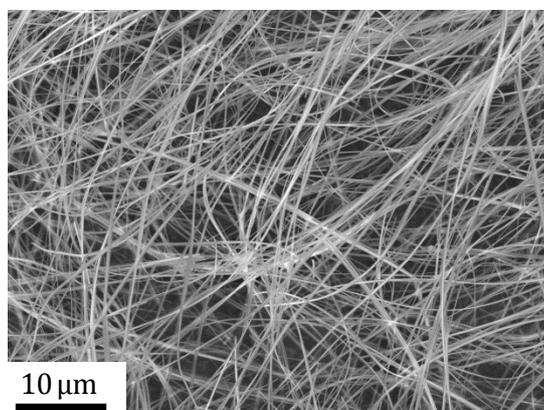
UNIVERSITÉ DE BOURGOGNE
Laboratoire Interdisciplinaire Carnot de Bourgogne
UMR 6303 Université de Bourgogne/CNRS
UFR Sciences et Techniques
Ecole Doctorale Carnot

THÈSE

Pour obtenir le grade de
Docteur de l'Université de Bourgogne
Discipline Sciences spécialité Chimie-Physique

Vanessa BELLAT

Ingénierie d'un nouveau nanobiohybride à base de nanorubans de titanates pour la médecine régénérative



Soutenue le 20 novembre 2012 devant la commission d'examen :

Mme BEGIN-COLIN Sylvie
Mme ANSELME Karine
M. DENAT Franck
M. HOCHÉPIED Jean-François
Mme MILLOT Nadine
M. VANDROUX David
Mme BERARD Véronique

Professeur à l'Université de Strasbourg
Directrice de recherche à l'Université de Mulhouse
Professeur à l'Université de Bourgogne
Chargé de recherche à l'École des Mines de Paris
Professeur à l'Université de Bourgogne
PDG NVH Medicinal
Maitre de conférences à l'Université de Bourgogne

Rapporteur
Rapporteur
Président
Examineur
Directrice de thèse
Co-encadrant
Membre invitée

Remerciements

Durant mes trois années de thèse, j'ai eu la chance de rencontrer et de travailler avec des personnes formidables. Je tiens ici à les remercier car ce travail ne serait pas ce qu'il est sans leur contribution.

J'adresse en premier lieu mes remerciements à Monsieur le Professeur *Gilles Bertrand* pour m'avoir permis d'intégrer le Laboratoire Interdisciplinaire Carnot de Bourgogne.

Mes plus sincères remerciements vont également aux membres de mon jury, les professeurs *Sylvie Begin-Colin*, *Franck Denat* et *Nadine Millot* ainsi que les docteurs *Karine Anselme*, *Jean-François Hochepped*, *David Vandroux* et *Véronique Bérard*, pour avoir accepté de juger mon travail de thèse.

Je remercie également Monsieur *Frédéric Bernard*, professeur à l'Université de Bourgogne pour m'avoir accueillie au sein de l'équipe MaNaPI (Matériaux Nanostructurés : Phénomènes à l'Interface) qu'il anime avec ferveur.

Je tiens bien évidemment à exprimer ma profonde gratitude à mes deux « chefs » :

- Le professeur *Nadine Millot* à qui je dois mes premiers pas dans le domaine de la recherche. Je lui suis particulièrement reconnaissante pour l'autonomie et la liberté d'initiatives qu'elle m'a accordées tout au long de ce travail. La confiance qu'elle m'a témoignée m'a permis de donner le meilleur de moi-même. Je la remercie également pour sa constante disponibilité, sa franchise et son soutien dans tous les projets entrepris. Ses compétences et son investissement auprès de ses étudiants m'inspirent une profonde estime.

- Le directeur de la société de biotechnologie NVH Medicinal, *David Vandroux*. Je le remercie d'avoir toujours cru en moi et en ce projet. Ses nombreuses connaissances en biologie et nanomédecine ainsi que ses judicieux conseils ont été pour moi une source d'enseignements intarissable. Son implication sans limite, son ingéniosité et son discernement ont également suscité chez moi une grande admiration. Qu'il trouve ici l'expression de mon plus profond respect.

Merci à vous deux pour tout ce que vous avez fait pour moi. Je suis très fière du travail réalisé à vos côtés.

Je voudrais exprimer toute mon estime à l'ensemble de l'équipe MaNaPI. Je suis très heureuse d'avoir fait partie de cette équipe, je n'oublierai jamais mes 3 années passées parmi vous. Merci pour votre accueil, votre gentillesse et votre bonne humeur quotidienne. J'adresse en particulier un grand merci à :

- *Lucien Saviot* pour le temps qu'il m'a consacré et pour m'avoir permis d'utiliser « la rolls royce » de la spectroscopie Raman !! Merci également pour l'album de Sexion d'Assaut qui m'a aidé à trouver de nombreuses fois l'inspiration lors de la rédaction de mon manuscrit :o).

- *Jean-Claude Niepce* pour sa prévenance et ses précieux conseils en DRX qui m'ont permis de mieux comprendre la structure des nanorubans de titanates.

- *Sophie Le Galet* pour toutes les fois où je suis entrée dans le bureau en disant « les filles, ON a un problème !!! ». Merci d'avoir été à l'écoute de toutes mes péripéties (bonnes et moins bonnes) et merci pour ton empathie ainsi que tes conseils à la fois professionnels et personnels que j'ai bien évidemment suivis à la lettre.

- *Julien Boudon* pour avoir toujours répondu présent à mes nombreuses sollicitations malgré un emploi du temps de ministre !! Merci pour ta gentillesse, ton optimisme à toute épreuve et surtout pour avoir eu réponse à toutes mes questions.

- *Florence Baras* pour son soutien et son réconfort lors des moments de doutes, notamment la veille de ma soutenance...

- *Anne-Laure Papa* pour m'avoir si bien encadrée lors de mon stage de Master 1 et de Master 2 et pour m'avoir transmis sa passion pour les nanoparticules et la nanomédecine. C'est en grande partie grâce à toi si aujourd'hui je suis docteur !!

- *Véronique Bérard* pour tout ce qu'elle a fait pour moi. Merci de m'avoir initiée à la galénique et de m'avoir si chaleureusement accueillie en face de pharmacie. Merci également pour ton amitié précieuse et pour tous les bons moments passés ensemble au labo et ailleurs. Tu resteras toujours pour moi « maman Véro ».

- *Coralie Fèvre* pour avoir réglé tous mes petits problèmes administratifs dans la bonne humeur et pour nos nombreuses conversations entre filles riches en potins de stars :o).

Je tiens également à remercier vivement toute l'équipe de NVH Medicinal pour leur accueil, leur gentillesse et leur disponibilité. Je souhaite remercier plus particulièrement *Laure Dumont* et *Virginie De Araujo* pour le temps qu'elles ont consacré à la réalisation des tests de cicatrisation *in vivo*. Merci beaucoup pour votre aide précieuse (expérimentale et didactique) qui a permis d'enrichir ce travail par une belle partie consacrée à la biologie. Merci également à *Jean-Pascal Gimeno* pour m'avoir initiée au greffage peptidique avec beaucoup d'humour et une bonne humeur permanente. Enfin, je suis très reconnaissante au docteur *Emmanuel de Maistre*, du service d'hématologie biologique du CHU de Dijon, de m'avoir permis de réaliser des tests d'agrégation plaquettaire. Je le remercie pour le temps qu'il m'a consacré ainsi que pour sa gentillesse, sa prévenance et ses nombreux encouragements.

Je remercie également très sincèrement tous les spécialistes du Département Technique d'Analyse-Instrumentation (DTAI) avec qui j'ai travaillé sur la caractérisation de mes nanorubans et qui m'ont fait bénéficier de leurs connaissances dans leur domaine propre de compétence. Un grand merci à :

- *Rémi Chassagnon* pour les nombreuses sessions MET passées ensemble. J'espère ne pas t'avoir ruiné avec toutes nos pauses café !! Merci également d'avoir été mon confident (pour ne pas dire mon psy...) et mon ami. Enfin merci pour tous les bons moments et les fou rires que l'on a partagés.

- *Olivier Heintz*, plus connu sous le nom d'Olivier ketchup. Merci pour ta patience (souvent mise à rude épreuve je l'avoue) et pour le temps que tu m'as consacré ainsi qu'à mes échantillons. Grâce à toi je me suis découvert une passion pour l'XPS :o).

- *Nicolas Geoffroy* pour ta gentillesse et ta disponibilité (même le week-end) les nombreuses fois où je suis venue pour analyser en DRX mes échantillons « en urgence ».

- *Claudie Josse et Frédéric Herbst* pour l'observation de mes nanorubans au MEB. Merci pour votre bonne humeur et votre gentillesse.

- *Stéphane Maitre*, mon roudoudou, pour avoir notamment réglé tous mes petits problèmes mécaniques sur mon réacteur. Merci également de m'avoir accueillie si gentiment dans « le garage à motos » les nombreuses fois où j'attendais Rémi et ses incontournables soucis de ponctualité !!

Je tiens à exprimer toute ma reconnaissance à *Franck Denat*, Directeur de l'Institut de Chimie Moléculaire de l'Université de Bourgogne (ICMUB), pour avoir accepté de présider mon jury de thèse mais également pour m'avoir accueillie de nombreuses fois au sein son laboratoire. Merci à tous les membres de cette équipe pour leur gentillesse et pour toutes les fois où ils sont venus m'ouvrir la porte !! Je remercie tout particulièrement *Mathieu Moreau*, mon lapinou et mon héros, pour le temps qu'il m'a consacré et pour tout ce qu'il m'a enseigné en chimie organique (il y avait du boulot !!). Je te dois beaucoup et grâce à toi la spectroscopie RMN ¹H n'a plus aucun secret pour moi (enfin presque !!!). Merci de t'être si bien occupé de moi et pour avoir toujours su me remonter le moral dans les moments difficiles. Je garderai un très bon souvenir de tous les moments passés ensemble.

Je remercie très chaleureusement toute l'équipe Adsorption sur Solides Poreux (ASP) pour leur gentillesse et leur bienveillance. Un grand merci à *Jean-Pierre Bellat*, mon tonton et mon modèle, pour son soutien, son aide, ses encouragements et tout ce qu'il a fait pour moi depuis mon arrivée à l'Université de Bourgogne. J'espère aujourd'hui qu'il est fier de sa nièce préférée !! Merci également à *Guy Weber* pour ses précieux conseils en spectroscopie Infra rouge et à *Igor Bezverkhy* pour m'avoir formée à la méthode BET.

Je tiens à remercier également *Jean-Michel Guignier* de l'Institut de Minéralogie et de Physique des Milieux Condensés (IMPMC) de l'Université de Jussieu pour les investigations réalisées en MET ainsi que *Annie Malchere* de l'Institut National des Sciences Appliquées de Lyon et *Aline Bonnotte* de l'Institut National de la Recherche Agronomique de Dijon pour les investigations réalisées au MEB environnemental.

Enfin, je souhaite remercier tous les thésards qui ont croisé ma route et qui sont devenus aujourd'hui mes amis :

- Je commence bien évidemment par ma *Lulu*. Je te dois beaucoup et je n'oublierai jamais tout ce que tu as fait pour moi. Bien que Lionel l'ait déjà largement fait, je tiens à mon tour à te remercier pour toutes les soirées inoubliables où tu t'es endormie dans le canapé. Je suis également très fière de notre collaboration sur l'invention du toast au Tartidou qui restera LA révélation culinaire du siècle !! Merci enfin de m'accompagner partout, même dans les endroits les plus chauds. N'oublie pas la crème solaire indice 80, on en aura besoin !!

- *Lionel*, mon loulou numéro 1. Merci de m'avoir si gentiment accueillie lors de mon arrivée à MaNaPI. Merci également pour tous les bons moments passés ensemble au bureau ou ailleurs et pour avoir toujours su me redonner le sourire. Merci enfin Lionel Roucas pour ton humour dévastateur que je suis obligée d'illustrer par ta célèbre blague « femme qui rit, femme fromage » qui restera dans les annales !!!!!

- Mes loulous « clubbers » *Cédric, Harold et Seb*. Merci pour toutes les soirées mémorables passées à la Jamaïque. Vous me manquez énormément et particulièrement mon loulou *Cédric*, parti à Front Rémo (promis, un jour j'arriverai à le prononcer correctement !!).

- Mon bichon *Romain*. Merci d'avoir été là pour moi dans les bons moments comme dans les mauvais. Merci pour toutes nos soirées sushis, bière et massages des pieds et d'avoir été si attentionné et prévenant. Merci enfin pour les croissants du dimanche matin :o).

- Mon chaton *Antoine*. Notre amitié a commencé lorsque tu as flashé sur mon jean rouge (qui d'ailleurs est un pantalon !!) et moi sur ta montre de geek. Malgré mes problèmes d'oreille interne très fréquents et mon rire de camionneur, merci de m'avoir choisie pour écrire ta biographie. Ta vie particulièrement palpitante m'a permis de prendre déjà beaucoup de notes ce qui laisse présager une bonne cinquantaine de chapitres !!

- *JB*. Merci d'avoir organisé de nombreuses sorties sportives et de m'avoir expliquée EN DETAILS les règles du basket. Merci également pour nos conversations très spirituelles et d'avoir si bien animé le brunch du dimanche au Malaghan qui restera grâce à toi, mémorable.

- Loulou *Anthony* (je sais tu détestes ce surnom !!). Merci pour le temps que tu m'as consacré et pour m'avoir formée à la spectroscopie Infra rouge. Je garderai un très bon souvenir de nos looooooongues conversations lors des manips. Merci également pour ton empathie, ta gentillesse et ton soutien sans faille.

- *Clémentine*. Merci d'avoir organisé des dimanches barbecue dans ton jardin. Ces journées soleil, transat, brochettes et bataille d'eau resteront de très bons moments passés tous ensemble.

- *Emmanuel*. Merci d'être mon fournisseur officiel de séries et de savoir si bien animer les soirées. Tu es et restera le plus grand fan de mon petit chemisier blanc :o).

- Les nouveaux p'tits loups, *Romarc, Guillaume et Thomas*. Merci pour votre bonne humeur et votre humour « révolutionnaire ». C'est un plaisir de partager le bureau avec vous !!

Enfin, j'adresse mes tendres remerciements à mes parents, mon frère et mes proches pour m'avoir toujours encouragée et soutenue. Merci pour votre patience, notamment dans la dernière ligne droite, où j'étais particulièrement désagréable et insupportable (je l'avoue !!).

Et pour finir un grand MERCI à tous ceux qui se sont ruinés pour m'offrir le sac de mes rêves !!

<i>Introduction</i>	1
<i>Chapitre I : Elaboration de nanorubans de titanates et caractérisation de leur morphologie, structure et composition chimique</i>	7
I.1 Synthèse de nanorubans d'oxydes de titane simples et mixtes	8
<u>I.1.1 Les nanorubans : de l'ombre à la lumière</u>	8
<u>I.1.2 Les différentes voies de synthèse possible des nanorubans d' « oxydes de titane »</u>	11
<u>I.1.3 Les avantages du traitement hydrothermal pour la synthèse des nanorubans</u>	13
<u>I.1.4 Description d'une synthèse type réalisée au laboratoire</u>	13
I.2 Les réactifs nécessaires à l'élaboration de nanorubans de titanates par traitement hydrothermal	15
<u>I.2.1 Utilisation de différentes phases du précurseur TiO₂ : la taille des grains et la structure du TiO₂ de départ ont-elles une influence sur les produits de la réaction ?</u>	15
<i>I.2.1.1 Les différents précurseurs de TiO₂ utilisés pour la synthèse des nanorubans de titanates</i>	15
<i>I.2.1.2 Synthèse par co-précipitation et traitement thermique de précurseurs de TiO₂ de phase anatase</i>	16
<i>I.2.1.3 Caractérisations des précurseurs de TiO₂ utilisés pour la synthèse de nanorubans de titanates</i>	18
<i>I.2.1.4 Synthèse de nanorubans de titanates à partir de quatre précurseurs de TiO₂ présentant des phases cristallographiques et des tailles de grain différentes</i>	20
<u>I.2.2 Influence de la concentration de la solution de soude et de son niveau de carbonatation</u>	28
<i>I.2.2.1 Influence de la concentration de la solution de soude sur l'obtention de nanorubans de titanates</i>	28
<i>I.2.2.2 Le taux de carbonatation de la solution de soude influe-t-il sur la synthèse des nanorubans ?</i>	31
I.3 Etude de l'influence des différents paramètres de synthèse sur l'obtention des nanorubans de titanates	32
<u>I.3.1 Une étape de sonication aux ultrasons des réactifs : atout ou frein à la formation des nanorubans ?</u>	32
<u>I.3.2 La température de réaction : un paramètre clé</u>	35
<u>I.3.3 Effet du temps de réaction: sur les traces du mécanisme de formation des Nanorubans</u>	40
<u>I.3.4 Impact de la vitesse d'agitation sur la synthèse des nanorubans de titanates</u>	46
<u>I.3.5 Le type de refroidissement en sortie de synthèse joue-t-il un rôle important ?</u>	48

<u>I.3.6 Influence d'un traitement post synthèse par lavage acide sur les propriétés physico-chimique des rubans</u>	51
I.4 Analyse morphologique fine des nanorubans de titanates	55
<u>I.4.1 Détermination de l'épaisseur des rubans – une première mondiale</u>	55
<i>I.4.1.1 Détermination de l'épaisseur des nanorubans par mesure directe</i>	55
<i>I.4.1.2 Détermination de l'épaisseur des nanorubans par tilt et mesure de projection</i>	56
<i>I.4.1.3 Détermination de l'épaisseur des nanorubans par observation en coupe transverse</i>	59
<i>I.4.1.4 Détermination de l'épaisseur des nanorubans par tomographie et reconstruction 3D</i>	61
<i>I.4.1.5 Technique EELS (Electron Energy Loss Spectroscopy)</i>	62
<i>I.4.1.6 Autres techniques pouvant être développées</i>	63
<i>I.4.1.7 Conclusion sur l'épaisseur des nanorubans de titanates</i>	64
<u>I.4.2 Détermination de l'intégrité des rubans</u>	64
<u>I.4.3 Conclusion sur la morphologie des nanorubans de titanates</u>	68
I.5 Vers la commercialisation des nanorubans dans le domaine biomédical	69
<u>I.5.1 Maitrise de la reproductibilité de la synthèse de nanorubans</u>	69
<u>I.5.2 Elimination des contaminants et sous produits de synthèse présents</u>	71
I.6 Conclusion sur l'élaboration des nanorubans de titanates	75
 <i>Chapitre II : Fonctionnalisation des nanorubans de titanates par un polymère synthétique permettant un greffage ciblé de protéines</i>	
II.1 Un nouveau nanobiohybride destiné à la nanomédecine	77
II.2 Conception d'un PEG hétérobifonctionnel	80
<u>II.2.1 Le PEG : un polymère aux propriétés particulières pour des applications biomédicales</u>	80
<u>II.2.2 Hétérobifonctionnalité : le choix des deux groupements fonctionnels du polymère</u>	81
II.3 Synthèse d'un PEG hétérobifonctionnel : le Si-PEG₅₀₀₀-Mal	83
<u>II.3.1 Détermination des meilleures conditions de greffage du groupement maléimide</u>	83
<i>II.3.1.1 Utilisation de l'acide-4-maléimido butanoïque</i>	84
<i>II.3.1.2 Utilisation du succinimido-4-maléimido benzoate</i>	86
<i>II.3.1.3 Purification du HO-PEG-Mal synthétisé</i>	91

II.3.2 Détermination des meilleures conditions de silanisation	92
II.3.2.1 Utilisation du triéthoxychlorosilane.....	93
II.3.2.2 Utilisation du 3-isocyanatopropyltriéthoxysilane.....	95
II.3.2.3 Silanisation du HO-PEG-Mal.....	98
II.4 Fonctionnalisation des nanorubans de titanates par le Si-PEG-Mal : première étape de la formation du nouveau nanobiohybride	102
II.4.1 Choix du solvant permettant le couplage TiONRs/Si-PEG-Mal	102
II.4.2 Greffage de différentes quantités de PEG en surface des nanorubans de titanates et caractérisation de la fonctionnalisation	104
II.4.3 Etude du temps de réaction nécessaire à la fonctionnalisation des nanorubans	110
II.4.4 Comparaison du Si-PEG-Mal synthétisé au laboratoire avec un PEG-Mal commercial	111
II.5 Fonctionnalisation des nanorubans d'oxydes de titane par un autre PEG hétérobifonctionnel : le Si-PEG₅₀₀₀-NHS	115
II.5.1 Utilisation du Si-PEG-NHS pour un ciblage des protéines par l'intermédiaire du couplage NHS/Lys	115
II.5.2 Silanisation du HO-PEG-NHS commercial au laboratoire	116
II.5.3 Fonctionnalisation des nanorubans d'oxydes de titane par le Si-PEG-NHS commercial	118
II.5.4 Comparaison et conclusion quant au choix du polymère hétérobifonctionnel permettant la fonctionnalisation des nanorubans de titanates	118
II.6 Greffage ciblé de protéines sur les nanorubans de titanates fonctionnalisés : deuxième étape de la formation du nouveau nanobiohybride	119
II.7 Conclusion	121
<i>Chapitre III : Formulation d'un nouveau nanobiohybride destiné au domaine de la nanomédecine : utilisation en tant qu'agent hémostatique, agent cicatrisant et pour la médecine régénérative</i>	123
III.1 Etat de l'art	124
III.1.1 Les différentes étapes de la cicatrisation d'une plaie	124
III.1.2 Les agents hémostatiques commerciaux	126
III.1.2.1 Les agents mécaniques.....	127

III.1.2.2 Les agents actifs.....	128
III.1.2.3 Les matrices.....	129
III.1.2.4 Les enduits.....	130
III.1.2.5 Les agents adhésifs.....	131
III.1.3 Les agents cicatrisants commerciaux.....	132
III.1.4 La médecine régénérative.....	134
III.1.4.1 Les réseaux de matrice extracellulaire (MEC).....	134
III.1.4.2 Les réseaux de polymères : cas particulier de la régénération osseuse.....	137
III.1.5 Les nouveaux produits à base de nanofibres pour la nanomédecine.....	137
III.1.5.1 Une nouvelle classe d'agents hémostatiques : les nanohémostats.....	137
III.1.5.2 Les hydrogels de monomères.....	139
III.1.5.3 Les biopolymères de chitosan.....	140
III.1.5.4 Les gels de plaquettes.....	142
III.1.5.5 Les protéines recombinantes.....	143
III.2 Les propriétés particulières du collagène-like produit par NVH Medicinal....	144
III.3 Tests biologiques <i>in vitro</i> des nanorubans nus et fonctionnalisés.....	144
III.3.1 Etude bibliographique concernant la toxicité des nanoparticules d'oxydes de titane.....	145
III.3.2 Tests MTT de cytotoxicité sur des fibroblastes et des cardiomyocytes.....	147
III.3.3 Tests d'agrégation plaquettaire.....	150
III.4 Formulation galénique du nanobiohybride : cas des alginates.....	152
III.4.1 Les avantages d'une formulation par hydrogel d'alginate.....	152
III.4.2 Généralité sur les alginates.....	154
III.4.3 Elaboration et caractérisation d'hydrogels d'alginate de sodium.....	156
III.4.4 Elaboration d'hydrogels d'alginate de calcium : le principe de la « boîte à œuf ».....	162
III.4.5 Etude de la répartition des nanorubans à l'intérieur des hydrogels.....	164
III.4.6 Vers la commercialisation des hydrogels d'alginate.....	166
III.4.7 Effets produits par les hydrogels d'alginate de calcium sur la cicatrisation d'une plaie externe : tests <i>in vivo</i>.....	166
III.4.7.1 Sans présence de principe actif	166
III.4.7.2 Avec présence de principe actif : le collagène de type III.....	170
III.5 Conclusion.....	180

Conclusion générale182

Perspectives.....185

Annexes

Annexe 1 : Récapitulatif des différentes techniques de caractérisation utilisées.....188

Annexe 2 : Catalogue des différentes synthèses réalisées.....189

Annexe 3 : Analyse XPS des nanorubans de titanates.....196

Annexe 4 : Estimation du taux de pollution présent dans les synthèses de nanorubans de titanates.....201

Annexe 5 : Détermination de l'épaisseur par EELS.....202

Annexe 6 : Détermination de l'épaisseur par CBED.....204

Annexe 7 : Détermination de l'épaisseur par la technique grain de café.....207

Annexe 8 : Détermination du taux de greffage de polymère par ATG.....208

Annexe 9 : Protocole d'utilisation du TCEP.....211

Annexe 10 : Protocole d'utilisation du test d'Ellman.....215

Annexe 11 : Les différents collagènes formant la matrice extracellulaire.....219

Annexe 12 : Préparation du PRP utilisé pour les tests d'agrégation plaquettaire.....221

Annexe 13 : Protocole expérimental des modèles *in vivo* de cicatrisation.....222

Annexe 14 : Analyse statistique de l'évolution de la cicatrisation en fonction du produit utilisé pour le traitement des plaies.....226

Annexe 15 : Analyse statistique de l'évolution de la cicatrisation en fonction de la présence de collagène de type III dans les matrices utilisées pour le traitement des plaies.....229

Annexe 16 : Valorisation des travaux de thèse.....231

Références bibliographiques.....233

Liste des abréviations

α -CD	α -CycloDextrin
AA	Amino Acide
ADN	Acide DésoxyriboNucléique
ADP	Adénosine DiPhosphate
ANSM	Agence Nationale de Sécurité du Médicament
Am	Acrylamide
ARN	Acide RiboNucléique
ATG	Analyse ThermoGravimétrique
BSA	Bovine serum albumin
BET	Brunauer Emmet Teller
CBED	Convergent Beam Electron Diffraction
CMC	CarboxyMéthyl Cellulose
CMR	Cancérigène Mutagène Reprotoxique
CYS	Cystéine
DCC	DiCyclohexylCarboxydiimide
DIPEA	N,N-DiIsoPropylEthylAmine
DMF	DiMéthylFormamide
DRX	Diffraction des Rayons X
EDCI	1-Ethyl-3-(3-Diméthylaminopropyl)CarbodiImide
EDS	Energy Dispersive X-ray Spectrometry
EDTA	EthyleneDiamineTetraacetic Acid
EELS	Electron Energy Loss Spectroscopy
EFTEM	Energy Filtered Transmission Electron Microscopy
FWHM	<i>Full Width at Half Maximum</i>
GDL	Glucono δ -Lactone
HA	HydroxyApatite
HBTU	2-(1H-Benzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-TétraméthylUronium hexafluorophosphate
HOBt	HydrOxyBenzoTriazole
HO-PEG-NH ₂	Hydroxy-PEG-Amine
HO-PEG-Mal	Hydroxy-PEG-Maléimide
HO-PEG-NHS	Hydroxy-PEG-succinimidyl carboxymethyl ester
ICMUB	Institut de Chimie Moléculaire de l'Université de Bourgogne
INRA	Institut National de la Recherche Agronomique
INSA	Institut National des Sciences Appliquées
IPTES	3-IsocyanatoPropylTriEthoxySilane
IRM	Imagerie à Résonance Magnétique
LYS	Lysine
MAL	Maléimide
MEB	Microscope Electronique à Balayage
MEC	Matrice ExtraCellulaire
MET	Microscope Electronique en Transmission
motif RGD	tripeptide arginine-glycine-acide aspartique

mPEG-Si	méthoxy-PEG-Silane
MTT	<i>Methyl</i> Thiazolyl Tetrazolium
NHS-1	Nanohémostat-1
NHS	N-HydroxySuccinimide
NVH Medicinal	Nature Value Harmony Medicinal
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCL	Poly(CaproLactone)
PDGF-BB	Platelet Derived Growth Factor
PEG	PolyEthyleneGlycol
PEI	PolyEthyleneImine
PEO	PolyEthylene Oxide
PEUU	PolyEster Urethane Urea
PLGA	<i>Poly(Lactic-co-Glycolic Acid)</i>
PLLA	Poly-L-Lactide Acid
PMMA	Poly(methyl methacrylate)
PRP	Plasma Riche en Plaquettes
PVA	PolyVinyl Alcohol
RMN ¹ H	spectroscopie par Résonance Magnétique Nucléaire du Proton
Si-PEG-Mal	Silane-PEG-Maléimide
Si-PEG-NHS	Silane-PEG-Succinimidyl ester
TCEP	Tris(2-CarboEthyl)Phosphine
TGFβ	Transforming Growth Factor
THF	TetraHydroFurane
VS	Vinyl Sulfone
XPS	X-ray Photoelectron Spectrometry
ZLP	Zero Loss Peak

Introduction

Le contexte de l'étude

Le titane, considéré autrefois comme un métal rare, est aujourd'hui l'un des métaux les plus fréquemment utilisés dans des domaines divers et variés. Découvert pour la première fois en 1790 par William Gregor, il ne porte le nom de titane que depuis 1795 en référence aux premiers fils de la Terre, les Titans, tirés de la mythologie grecque. Au début du 20^{ème} siècle, des études approfondies ont permis de réaliser la production de titane pur à 99% et d'identifier ses propriétés physico-chimiques. Ses propriétés remarquables permettent au titane d'être aujourd'hui largement utilisé dans le domaine biomédical. En effet, le caractère isoélastique du titane, provenant de son faible module d'Young (≈ 100 GPa) en comparaison à celui de l'inox (≈ 220 GPa), lui confère une rigidité proche de celle de l'os. Sa faible valeur de susceptibilité magnétique ($\approx 2 \times 10^{-4}$), largement inférieure à celle du fer ($\approx 3 \times 10^5$), rend le titane non magnétique ce qui permet de minimiser les artefacts en cas de diagnostic par Imagerie à Résonance Magnétique (IRM). De plus, sa résistance à la corrosion et à l'usure est exceptionnelle lorsqu'il est introduit dans un environnement biologique. Enfin, le titane possède un caractère biocompatible remarquable qui lui permet d'interagir totalement avec les os, les tissus et les fluides corporels (Liu *et al.* 2004). Le phénomène d'ostéointégration permettant à l'os d'adhérer spontanément au titane en fait un matériau privilégié pour la réalisation d'implants osseux tels que les prothèses du genou ou de la hanche (figures 1a et b) ou les implants dentaires (figures 1c et d).

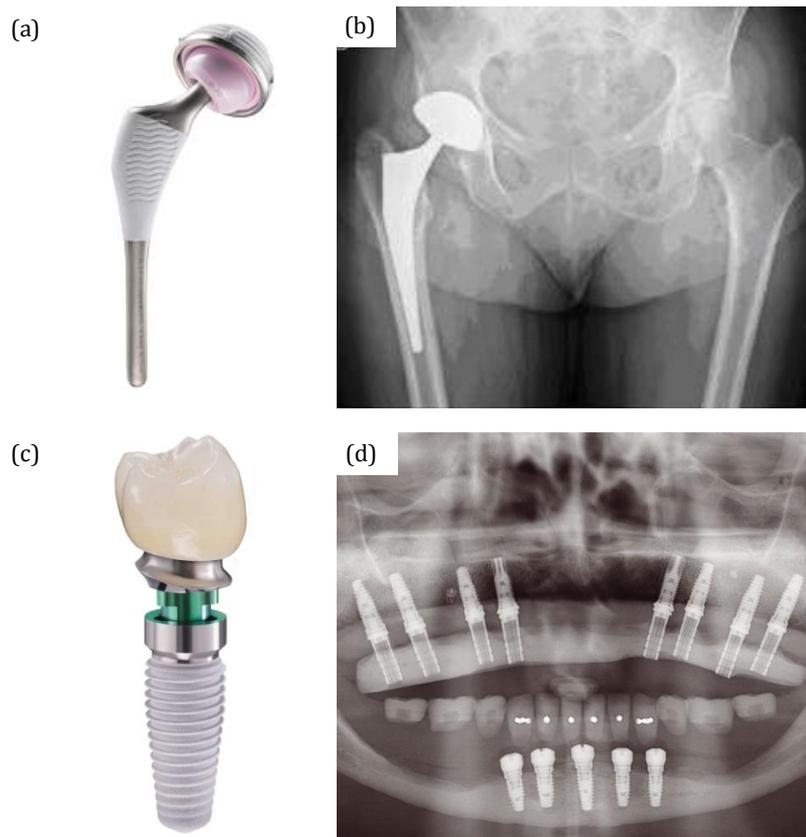


Figure 1 : (a) Photo d'une prothèse de hanche. Seule la partie longue de la prothèse insérée dans le col du fémur et la cupule creuse se logeant dans le bassin sont constituées de titane. (b) Radiographie d'un bassin comportant une prothèse de hanche en titane. (c) Photo d'un implant dentaire constitué d'une racine artificielle sous forme de vis en titane soutenant une prothèse dentaire. (d) Radiographie d'une mâchoire comportant des implants dentaires en titane insérés dans l'os alvéolaire d'après (Liu *et al.* 2004).

Le titane est également utilisé dans le domaine cardiovasculaire. Il est de plus en plus employé pour la conception de valves artificielles cardiaques et de stents permettant la dilatation et l'ouverture des vaisseaux sanguins bouchés ou rétrécis (Liu *et al.* 2004). Enfin, des plaques et des vis en titane sont couramment fixées sur les os fracturés pour favoriser l'ostéosynthèse (Williams *et al.* 2001).

Le titane sous sa forme oxydée TiO₂ est également un excellent candidat pour des applications biomédicales. En effet, le dioxyde de titane présente une biocompatibilité et une réactivité plus élevée que celle du titane (Takemoto *et al.* 2003). La présence de groupements hydroxyles à sa surface lui permet de se combiner à de nombreuses molécules chimiques et biologiques. Cela lui confère notamment une forte affinité avec des protéines spécifiques comme l'albumine (Klinger *et al.* 1997, Serro *et al.* 1997), la laminine V (Tamura *et al.* 1997), les glycosaminoglycans (Collis *et al.* 1992), le collagénase (Kane *et al.* 1994), la fibronectine (Vaudaux *et al.* 1990) et le fibrinogène (Sundgren *et al.* 1986) qui s'absorbent facilement en surface des oxydes de titane. Cela permet au TiO₂ de jouer notamment le rôle d'agent hémostatique et cicatrisant. De plus, il favorise la croissance et la différenciation cellulaire permettant une application dans l'ingénierie et la régénération tissulaire (Liu *et al.* 2004). Enfin, le TiO₂ est également utilisé en tant qu'additif dans de nombreux produits cosmétiques et pharmaceutiques (Chevin *et al.* 1988).

A l'échelle nanométrique, un effet de confinement couplé à un effet de surface permet de modifier les propriétés particulières du TiO₂ (Perriat 1997). Les nanoparticules d'oxydes de titane trouvent ainsi leur application en nanomédecine. Comme le TiO₂ macroscopique, les nanoparticules d'oxydes de titane sont utilisées pour la régénération tissulaire (Torres *et al.* 2007, Jayakumar *et al.* 2011) et pour favoriser l'ostéosynthèse (Erli *et al.* 2006, Tiainen *et al.* 2012). Elles possèdent également des propriétés antibactériennes permettant de les utiliser pour lutter contre le développement de microorganismes et de bactéries (Xing *et al.* 2012, Kim *et al.* 2012). Les nanoparticules d'oxydes de titane jouent aussi le rôle d'agent thérapeutique grâce à leurs propriétés anticancéreuses sous irradiations UV. Ce phénomène est notamment expliqué par la production de radicaux libres sous ces rayonnements permettant de détruire les cellules malades (Matsui *et al.* 2009, Thevenot *et al.* 2008). Enfin, leurs propriétés mécaniques supérieures à celles des hydroxyapatites en font un matériau idéal pour la confection de revêtements nanostructurés (Hirakura *et al.* 2010).

Les titanates sous forme de tubes commencent à être employés dans le domaine biomédical notamment pour la détection de la dopamine (Liu *et al.* 2006, Niu *et al.* 2008). Ils favorisent également l'adhésion et la différenciation des ostéoblastes permettant d'accroître la régénération osseuse (Tsuchiya *et al.* 2006, Brammer *et al.* 2009, Kodama *et al.* 2009, Wang *et al.* 2011). Ils sont aussi utilisés en tant que nanovecteur pour la transfection d'ADN (Papa *et al.* 2012). En revanche, très peu d'études bibliographiques relatent à ce jour de l'utilisation de nanorubans de titanates dans le domaine biomédical. Cependant, les caractéristiques morphologiques, structurales et chimiques particulières de ces nanorubans en font, selon nous, un candidat approprié pour des applications en nanomédecine et notamment pour la régénération et l'ingénierie tissulaire.

Les objectifs de ce travail de thèse

L'objectif final de ce travail de thèse est de concevoir un nouveau nanobiohybride destiné au domaine biomédical. Son rôle sera de favoriser les processus de cicatrisation et de régénération des tissus lésés. L'ingénierie de ce nouveau nanobiohybride repose sur la combinaison entre des nanorubans de titanates et des protéines particulières par l'intermédiaire d'un linker en polymère. Pour répondre à ce cahier des charges, ce travail a été divisé en six objectifs principaux :

- 1) **Synthétiser des nanorubans de titanates** par traitement hydrothermal. Ces nanostructures étant destinées au domaine médical, il est nécessaire que cette synthèse soit maîtrisée et optimisée. De plus, les nanorubans devront être analysés par différentes techniques de caractérisation (MET, MEB, DRX, spectroscopie Raman, et XPS) pour avoir une connaissance approfondie de leur morphologie, de leur structure et de leur composition chimique,
- 2) **Synthétiser un polymère hétérobifonctionnel** permettant le couplage entre les nanorubans et les protéines. Comme pour les nanorubans, la synthèse du polymère devra être optimisée et maîtrisée. De plus, il est indispensable de caractériser le polymère (spectroscopie RMN ^1H et spectroscopie IR) pour contrôler sa réactivité, sa stabilité au cours du temps et sa pureté,
- 3) **Fonctionnaliser les nanorubans de titanates** par le polymère hétérobifonctionnel. Les conditions de réaction seront optimisées afin que le greffage du polymère en surface des nanostructures soit contrôlé et confirmé. Le taux de greffage sera enfin estimé par des analyses ATG,
- 4) **Greffer de manière ciblée des protéines** sur les nanorubans fonctionnalisés. Après avoir optimisé les différents paramètres et conditions de réaction, le greffage ciblé devra être confirmé et son taux évalué,
- 5) **Formuler le nanobiohybride**. La forme galénique choisie sera synthétisée au laboratoire puis caractérisée pour évaluer ses propriétés. Une étude de la répartition du nanobiohybride au sein de l'excipient devra être effectuée puis optimisée,
- 6) **Evaluer le potentiel biologique** des différents composants synthétisés par des tests biologiques *in vitro* et *in vivo* permettant de valider le concept du nanobiohybride ainsi développé.

Le cadre partenarial de ce travail

Ce travail de thèse, financé par une bourse CIFRE attribuée en octobre 2009, repose sur un partenariat entre l'équipe MaNaPI, « Matériaux Nanostructurés : Phénomènes à l'interface » du département Nanosciences du laboratoire Interdisciplinaire Carnot de Bourgogne et la société de biotechnologie NVH Medicinal.

L'équipe MaNaPI travaille sur trois axes principaux : la santé, l'énergie et la défense et a pour thématiques centrales la maîtrise de l'élaboration de matériaux nanostructurés et la compréhension des propriétés physiques et chimiques granulo-dépendentes. Elle a notamment parfait la connaissance de différents matériaux nanostructurés tels les oxydes de structures pérovskite et spinelle, intéressants pour leurs propriétés électriques et magnétiques, les

intermétalliques, réputés pour leurs propriétés structurales et anticorrosives à haute pression. L'élaboration de toutes ces poudres nanométriques se fait par différentes méthodes chimiques ou mécaniques comme la chimie douce, le traitement hydrothermal ou bien encore par une technique très novatrice : la synthèse en continue et en eau supercritique. Ce travail de thèse s'est inscrit dans le secteur « nanomatériaux appliqués au domaine de la santé » initié en 2005 par le Professeur Nadine MILLOT (Millot 2005). Les objectifs de cette nouvelle thématique sont de développer de nouveaux thérapeutiques (nanovectorisation et cicatrisation) et de nouveaux agents de contraste (IRM ou agents bimodaux IRM/TEP) dans deux grands domaines que sont les maladies cardiovasculaires et l'oncologie. Les familles de nanomatériaux développées dans ce but sont des nanotubes et des nanorubans de titanates, des nanoparticules d'oxydes de fer (SPIO pour Super Paramagnetic Iron Oxide) et des nanoparticules de silice mésoporeuse.

NVH Medicinal est une société de biotechnologies, dirigée par le Docteur David Vandroux et **implantée à Dijon**, dont la mission repose sur la création de nouvelles entités protéiques appliquées à la médecine régénérative. Plus particulièrement, ses développements sont destinés au diagnostic et au traitement des maladies consécutives à un stress, avec des applications actuelles en cardiovasculaire et dermatologie. Sa technologie, à l'origine de ses produits innovants, repose sur sa capacité à associer de façon rationnelle des motifs peptidiques d'intérêt (portant une fonction) à un squelette protéique unique conférant une structure propre à l'ensemble. Elle permet ainsi la synthèse de nouvelles protéines recombinantes se différenciant notamment par leur créativité, leur sensibilité et leur spécificité en regard d'un processus ciblé.

NVH Medicinal s'est dotée d'une plateforme de bioproduction, lui permettant de synthétiser et produire ses nouvelles protéines, et d'une plateforme d'évaluation, constituées de modèles *in vitro* et *in vivo* spécifiques/particuliers, visant à valider l'efficacité de ces nouvelles entités en regard de la pathologie ciblée. Ainsi, fruit de ses propres développements, NVH Medicinal possède une expertise dans plusieurs domaines de compétences lui permettant de proposer **une large gamme de services** allant de l'ingénierie moléculaire d'une protéine jusqu'à son évaluation *in vivo* sur des modèles pertinents.

L'équipe MaNaPI et la société NVH Medicinal sont des acteurs des consortium *PharmImage** et *IMAPPI** qui associent des membres de différents horizons tels que chimistes, physiciens et biologistes pour constituer des groupes de recherche tournés vers l'imagerie médicale.

**PharmImage* : *PharmImage* est un GIE (Groupement d'intérêt Economique) dont le projet est transversal et axé sur l'utilisation, la mise au point de traceurs et la détermination de biomarqueurs capables de permettre le suivi de l'efficacité des traitements et la sélection de molécules plus actives. Ce projet est pluridisciplinaire (pharmacologie, chimie, informatique, électronique, physique, biologie, nanotechnologie, médecine...) et avec des applications dans tous les domaines de la santé et de la recherche (cancérologie, cardiologie, neurologie, immunologie, sensorialité...).

**IMAPPI* : Le projet *IMAPPI* (Integrated Magnetic resonance And Positron emission tomography in Preclinical Imaging – IRM et TEP couplés en imagerie pré-clinique), déposé dans le cadre de l'appel à projet « Equipement d'Excellence » (*EquipEx*) des Investissements d'Avenir (Grand Emprunt National) a été retenu par le Commissariat Général à l'Investissement. L'enjeu d'*IMAPPI* est d'offrir aux laboratoires pharmaceutiques, une instrumentation d'imagerie innovante basée sur un nouveau couplage TEP/IRM pour mener des études précliniques plus performantes et ainsi les transposer plus facilement chez l'Homme.

Plan du manuscrit

Ce manuscrit se divise en trois parties :

Dans un premier chapitre, la synthèse des nanorubans de titanates par traitement hydrothermal est présentée. L'impact des différents paramètres de réaction sur les caractéristiques morphologiques, structurales et chimiques des nanorubans a été étudié dans le but d'aboutir à une synthèse optimisée et maîtrisée. Un mécanisme de formation des nanorubans de titanates, sujet encore très controversé dans la littérature, est également proposé. Enfin, une caractérisation fine des nanorubans est réalisée dans l'objectif de déterminer, pour la première fois, l'épaisseur et l'architecture particulière de ces nanostructures.

Le deuxième chapitre traite de l'élaboration d'un polymère hétérobifonctionnel permettant la fonctionnalisation des nanorubans de titanates. Différentes techniques et approches ont été testées dans le but de déterminer les meilleures conditions de synthèse et de greffage du polymère. Le couplage entre les nanorubans et le polymère correspond à la première étape de l'élaboration du nouveau nanobiohybride destiné à des applications biomédicales. Pour mettre en avant les propriétés du polymère synthétisé au laboratoire, un comparatif avec des polymères commerciaux est également effectué. Enfin, des essais préliminaires de greffage ciblé de protéines sur les nanorubans fonctionnalisés, correspondant à la deuxième étape de formation du nanobiohybride, sont présentés.

Le dernier chapitre est tout d'abord consacré à l'étude bibliographique des agents hémostatiques et cicatrisants actuellement commercialisés et utilisés au sein des blocs opératoires. L'étude bibliographique s'étend également aux agents employés pour la médecine régénérative et aux nouveaux produits à base de nanofibres destinés à la nanomédecine. Dans la partie concernant les essais biologiques, la toxicité des nanorubans de titanates ainsi que leur impact sur le processus de l'agrégation plaquettaire est également évalué. Enfin, la formulation galénique des nanorubans en hydrogels d'alginate est réalisée puis testée sur des modèles *in vivo*.

Chapitre I : Elaboration de nanorubans de titanates et caractérisation de leur morphologie, structure et composition chimique

Ce premier chapitre est consacré à la synthèse et à la caractérisation fine de nanorubans de titanates par traitement hydrothermal. L'influence de la nature des réactifs sur la formation des nanorubans a été étudiée. Des investigations ont également été menées pour évaluer l'impact de la variation des différents paramètres de synthèse sur les caractéristiques morphologiques, structurales et chimiques des nanorubans. Ainsi, les paramètres optimaux conduisant à une synthèse maîtrisée ont été déterminés. Le mécanisme de formation des nanorubans de titanates, phénomène restant à ce jour très controversé, a également été appréhendé. Enfin, une attention particulière a été portée à la caractérisation morphologique des nanorubans et notamment à la détermination de leur épaisseur. Cette dimension n'a jusqu'à présent, jamais été étudiée dans la littérature.

I.1 Synthèse de nanorubans d'oxydes de titane simples et mixtes

Les titanates se composent d'ions titane engagés dans un polyèdre de coordination avec formation de liaisons iono-covalentes avec les ions oxygène. Cet assemblage joue le rôle d'anion qui se combine avec un autre cation (figure 2). Les titanates peuvent également être qualifiés d'oxydes de titane mixtes.

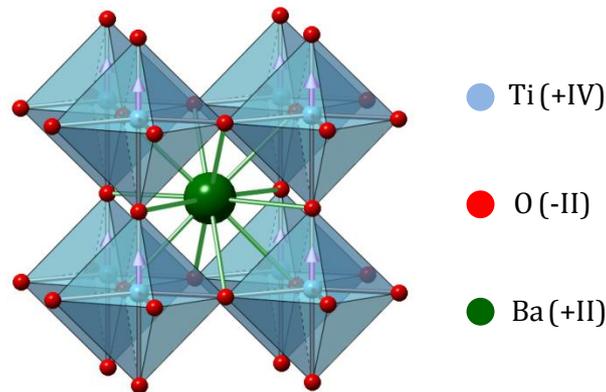


Figure 2 : Structure chimique d'un titanate. Exemple du titanate de barium $BaTiO_3$ d'après (Kobayashi *et al.* 2012).

Dans cette première partie bibliographique, plusieurs modes de synthèse ne conduisant pas forcément à l'élaboration de titanates vont être présentés. Le terme général « oxydes de titane » sera alors employé pour définir les différentes nanostructures évoquées.

I.1.1 Les nanorubans : de l'ombre à la lumière

Depuis la découverte des nanotubes de carbone (figure 3a) (Iijima, 1991), la morphologie tubulaire est très étudiée. De nombreux travaux ont été réalisés sur les nanotubes, notamment ceux dérivés des oxydes de titane. Les premiers travaux sur les nanotubes d'oxydes de titane ont été reportés par Kasuga *et al.* en 1998 (Kasuga *et al.* 1998). Dans ces travaux, les nanotubes ont été synthétisés par traitement hydrothermal dans des conditions fortement basiques et en utilisant un précurseur de TiO_2 de taille nanométrique (figure 3b).

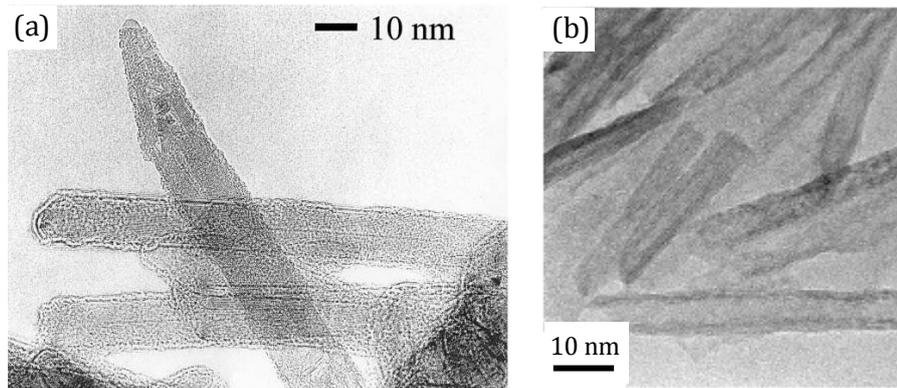


Figure 3 : Clichés MET (a) des nanotubes de carbone synthétisés par Iijima en 1991 et (b) des nanotubes d'oxydes de titane synthétisés par traitement hydrothermal par Kasuga en 1998.

Aujourd'hui, il existe de nombreuses publications sur la synthèse et la caractérisation des nanotubes d'oxydes de titane ainsi que sur leurs nombreuses applications dans des domaines divers et variés. En revanche, les autres nanostructures monodimensionnelles* et bidimensionnelles* dérivées des oxydes de titane, comme les nanofils, les nanorubans et les nanofeuilles, n'ont été que rarement étudiées et peu de travaux ont été publiés. Ces nanostructures, et plus particulièrement les nanorubans, ont souvent été considérés comme un sous produit de synthèse non désiré ou comme une structure intermédiaire à la formation des nanotubes (Li *et al.* 2007). Cependant, depuis environ dix ans, leurs caractéristiques morphologiques, structurales et chimiques ont permis aux nanorubans d'oxydes de titane de sortir de l'ombre des nanotubes et de devenir une nanostructure reconnue à part entière et de plus en plus étudiée par les scientifiques. Malgré l'émergence de ces autres nanostructures, les différentes formes morphologiques à une ou deux dimensions de ces nanomatériaux n'ont pas été clairement définies et de nombreuses confusions perdurent dans la littérature. La morphologie tubulaire a été décrite dans de nombreuses études mais la différence entre les nanofils, les nanorubans et les nanofeuilles n'a pas encore été clairement expliquée. Au final, il y a quatre différentes morphologies mono ou bidimensionnelles pour les nanoparticules d'oxydes de titane : les nanotubes, les nanofils (aussi appelés nanobâtonnets ou nanofibres), les nanorubans et les nanofeuilles (figure 4).

*Par abus de langage, on parlera ici de structure « monodimensionnelle » lorsqu'une des trois dimensions d'un objet sera bien supérieure aux deux autres (cas des nanotubes et des nanofibres) et de structure « bidimensionnelle » lorsque deux de ses dimensions seront supérieures à la troisième, l'épaisseur (cas des nanorubans et des nanofeuilles).

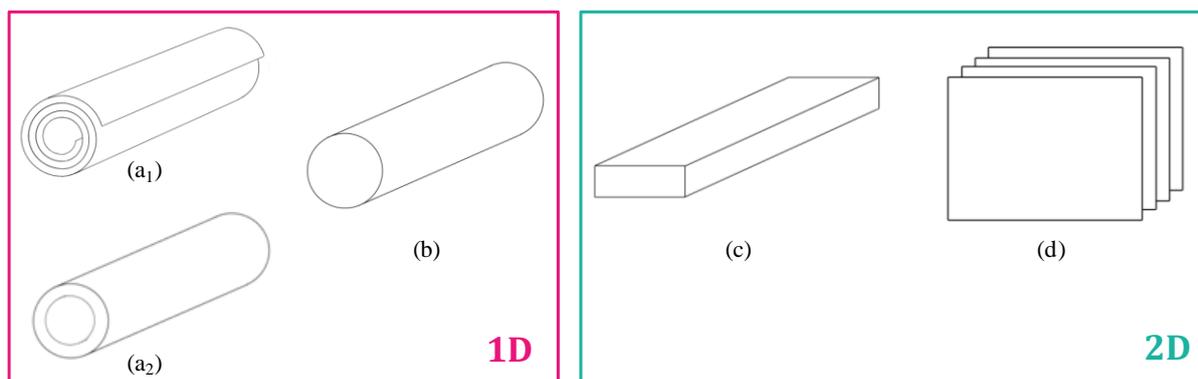


Figure 4 : Schéma des quatre différentes morphologies des nanoparticules mono ou bidimensionnelles d'oxydes de titane : (a) les nanotubes, (b) les nanofils (aussi appelés nanobâtonnets et nanofibres), (c) les nanorubans et (d) les nanofeuilles.

D'après Bavykin, chaque morphologie présente des caractéristiques particulières (Bavykin *et al.* 2006). La morphologie tubulaire est la plus facilement reconnaissable. Les nanotubes de titanates sont constitués de multi couches (2 à 10) enroulées en spirale et leurs deux extrémités sont ouvertes. Leur diamètre externe mesure environ 10 nm et leur longueur est comprise entre 100 et 200 nm (figure 4a₁). Les nanotubes d'oxydes de titane (TiO₂), quant à eux, se présentent sous la forme d'un cylindre possédant une cavité interne. Leur diamètre externe est compris entre 30 et 200 nm et leur longueur varie d'une centaine de nanomètre à plusieurs micromètres (figure 4a₂) (Ghikov *et al.* 2005, Kaneco *et al.* 2006, Oh *et al.* 2006). La géométrie des nanofils, nanobâtonnets ou nanofibres est un cylindre à base circulaire. Ce type de morphologie n'a pas de cavité interne et présente un diamètre inférieur à 50 nm pour une longueur de plus d'un micromètre (figure 4b). Les nanorubans d'oxydes de titane se présentent sous forme de longs parallélépipèdes. Ces structures ont tendance à avoir une bonne cristallinité et leur longueur peut atteindre plus d'une dizaine de micromètres alors que leur largeur est typiquement comprise entre 50 et 200 nm (figure 4c). Ils peuvent se trouver sous forme plane ou semi enroulée. Malgré leur différence, un amalgame entre nanofils et nanorubans est souvent présent dans la littérature. En effet, de nombreux travaux décrivant la synthèse de nanofils traitent en réalité de la synthèse de nanorubans. Cette ambiguïté sera étudiée plus précisément au cours du paragraphe I.1.2. Enfin, les nanofeuilles, qui sont des simples couches ou des multi-couches de plans de titanates, ont une morphologie très fine. Elles présentent une largeur et une longueur d'au moins 100 nm (figure 4d). Comme les nanorubans, elles peuvent se trouver sous forme plane ou pliée. Des nanotubes se formeraient par l'enroulement de ces nanofeuilles (Bavykin *et al.* 2006, Liu *et al.* 2011).

La morphologie sous la forme de rubans est rencontrée pour d'autres titanates alcalins comme les titanates de potassium. Ces nanorubans sont synthétisés par traitement hydrothermal à partir de Na₂Ti₃O₇ et de KOH. Durant la réaction les ions Na⁺ et K⁺, présentant des affinités chimiques similaires, vont s'échanger pour former des nanorubans de K₂Ti₆O₁₃ (Wang *et al.* 2003) ou de K₂Ti₈O₁₇ (Yuan *et al.* 2004). Ces dix dernières années, de nombreux travaux ont également été réalisés sur des nanorubans de composition chimique très variable. Des nanorubans d'oxydes de cobalt Co₃O₄ de quelques micromètres de long ont été synthétisés par traitement hydrothermal de chlorures de cobalt CoCl₂ et d'urée CO(NH₂)₂ en solution aqueuse. Ces nanorubans présentent une structure fortement nanoporeuse et une large surface spécifique qui leur confèrent des propriétés de supercapacité (Wang *et al.* 2009). Des

nanorubans de pentoxyde de niobium Nb_2O_5 ont également été synthétisés par traitement hydrothermal d'une poudre métallique de Nb avec une solution d'urée. Ces nanorubans, présentant une longueur de plusieurs dizaines de micromètres et une largeur avoisinant la centaine de nanomètres, présentent des propriétés photovoltaïques remarquables (Wei *et al.* 2008).

I.1.2 Les différentes voies de synthèse possible des nanorubans d' « oxydes de titane »

Il existe plusieurs voies de synthèse différentes pour obtenir des nanorubans d' « oxydes de titane ». En 2002, des nanorubans de titanates ont été synthétisés pour la première fois par traitement hydrothermal d'un précurseur pulvérulent de TiO_2 en milieu fortement basique (Yuan *et al.* 2002). Par cette voie de synthèse, la solution de soude, de concentration variable, et les particules de TiO_2 sont introduits dans un autoclave et subissent un traitement de 180 à 240°C pendant une durée de 24 à 48h. Cette technique permet d'obtenir des nanorubans de titanates de 30 à 500 nm de large pour une longueur de plusieurs dizaines de micromètres (figures 5a et b).

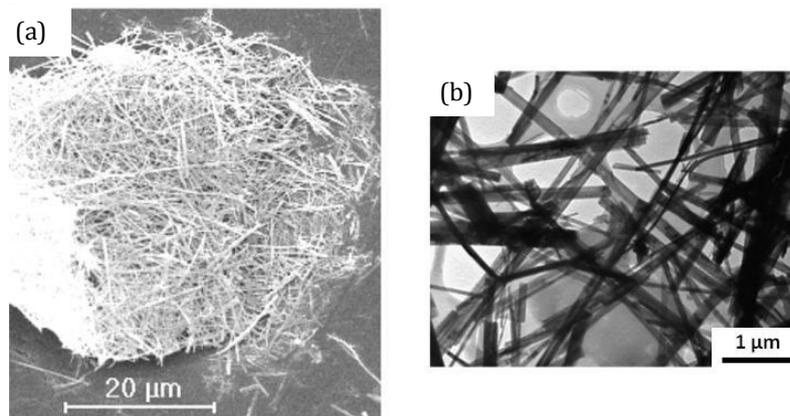


Figure 5 : Clichés (a) MEB et (b) MET des premiers nanorubans de titanates synthétisés par traitement hydrothermal d'après (Yuan *et al.* 2002).

En 2003, une autre voie de synthèse a été utilisée pour produire cette fois des nanofils de TiO_2 . Pour cette méthode, deux précurseurs sont nécessaires : une solution d'alkoxyde de titane (IV) à laquelle s'ajoute de l'éthylène glycol. Ces deux réactifs sont ensuite chauffés par bain d'huile à 170°C, sous forte agitation magnétique, pendant une durée de 2h et sous flux d'azote. L'alkoxyde est alors transformé en une chaîne de glycolates complexes qui cristallisent, d'après Jiang *et al.*, sous forme de nanofils uniformes de 50 nm de largeur pour une longueur de plus de 30 μm (figure 6) (Jiang *et al.* 2004). Dans ces travaux, les nanostructures synthétisées ont été baptisées nanofils. Cependant, les caractérisations réalisées n'ont pas permis de confirmer la morphologie cylindrique des nanoparticules et leurs dimensions coïncident d'avantage avec celles des nanorubans (Bavykin *et al.* 2006). Il est alors probable que la synthèse ait aboutit en réalité à la formation de nanorubans et non de nanofils.

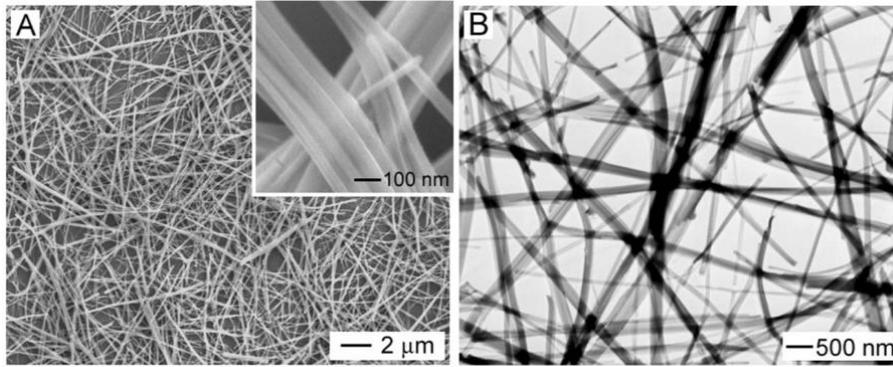


Figure 6 : Clichés (a) MEB et (b) MET des nanofils d'oxydes de titane synthétisés par cristallisation des chaînes de glycolate d'après (Jiang *et al.* 2004).

En 2004, des nanofils de titanates ont été synthétisés à partir de couches de titanate de $\text{Na}_2\text{Ti}_3\text{O}_7$ et d'une solution d'acide chlorhydrique chauffés à 170°C pendant 7 jours dans un autoclave. Cette réaction, basée sur l'échange cationique de Na^+ par H^+ , aboutit à la formation des nanorubans de composition chimique $\text{H}_2\text{Ti}_3\text{O}_7$ et présentant un diamètre compris entre 50 et 100 nm et une longueur de plusieurs centaines de micromètres. (Wei *et al.* 2004). Une fois de plus, bien que l'auteur emploie le terme de nanofils, les dimensions et la morphologie des nanoparticules obtenues laisse penser que la synthèse a aboutit à la formation des nanorubans. Ce point sera clarifié dans le cas de notre étude paragraphe I.4.1.

Enfin, en 2009, des nanorubans d'oxydes de titane de plusieurs dizaines de micromètres de long pour une largeur avoisinant les 450 nm ont été obtenus par electrospinning. Cette technique permet d'organiser les nanorubans de TiO_2 selon une architecture contrôlée en appliquant une différence de potentiel, une géométrie de spinneret* et une humidité environnementale relative adéquate (figures 7a et b) (Yu *et al.* 2009).

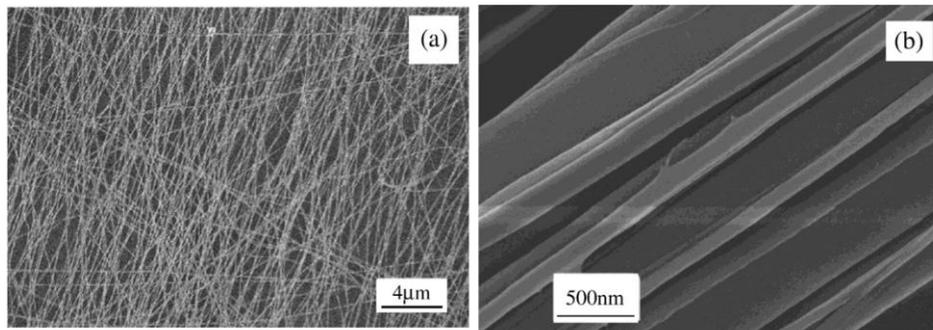


Figure 7 : (a) et (b) Clichés MEB des nanorubans d'oxydes de titane synthétisés par electrospinning d'après (Yu *et al.* 2009).

*spinneret : orifice de géométrie variable permettant l'extrusion des nanoparticules d'oxydes de titanes.

I.1.3 Les avantages du traitement hydrothermal pour la synthèse des nanorubans

Comme il est indiqué dans le paragraphe précédent, le choix du mode de synthèse est très important car il influe sur la morphologie, la composition et les propriétés des nanorubans et donc sur leurs domaines d'applications. Le mode de synthèse choisi dans la présente étude pour l'obtention de nanorubans d'« oxydes de titane » est le traitement hydrothermal en milieu fortement basique. Ce choix s'explique par différentes raisons. Tout d'abord, le traitement hydrothermal est une méthode efficace pour produire des titanates à une ou deux dimensions. En effet, cette méthode de synthèse peut être utilisée pour préparer une grande variété de nanostructures telles que les nanotubes (Chen *et al.* 2002), les nanofils (Armstrong *et al.* 2004, Wu *et al.* 2005, Tsai *et al.* 2005), les nanorubans (Yuan *et al.* 2002) et les nanofeuilles (Kasuga *et al.* 1998). De plus, le traitement hydrothermal permet la production de nanoparticules à grande échelle (Torrente-Murciano *et al.* 2009). Cette technique est également considérée comme la voie de synthèse la plus performante pour l'obtention de nanorubans de titanates car c'est une méthode simple, peu coûteuse et non polluante (Jitputti *et al.* 2007, Marinkovic *et al.* 2007). Ensuite, les nanorubans de titanates obtenus par traitement hydrothermal présentent des propriétés physiques et chimiques particulières permettant de les utiliser dans différents domaines comme la photocatalyse (Hafez. 2009, Jitputti *et al.* 2008), les batteries au lithium (Beuvier *et al.* 2010), les applications optiques (Feng *et al.* 2010), les cellules solaires et photovoltaïques (Pan *et al.* 2007) et les biocapteurs (Liu *et al.* 2008).

Enfin, le traitement hydrothermal est une méthode qui a fait ses preuves au sein de l'équipe MaNaPI pour la synthèse de nanotubes de titanates destinés à des applications biomédicales (Papa *et al.* 2011, Mirjolet *et al.* 2011). Par ce procédé, les tubes obtenus étaient dispersables par des voies de greffages chimiques, leurs deux extrémités étaient libres et ouvertes et ils présentaient une large surface spécifique. Les nanorubans de titanates étant également destinés à être utilisés dans le domaine biomédical, le traitement hydrothermal est alors la voie de synthèse qui nous a paru la plus appropriée pour l'obtention de nanorubans.

I.1.4 Description d'une synthèse type réalisée au laboratoire

La synthèse des nanorubans de titanates par traitement hydrothermal se déroule en plusieurs étapes. La réaction en elle-même a lieu dans un autoclave de chez Parr Instrument (figure 8a). Les deux réactifs, un précurseur pulvérulent de TiO₂ et une solution de soude, sont introduits dans un bol en Téflon. Ce bol est ensuite placé dans le réacteur qui est fermé par un couvercle équipé d'un thermocouple, permettant de mesurer la température *in situ* au cours de la réaction, d'un système d'agitation mécanique par une hélice à quatre pâles, d'un serpentin de refroidissement du milieu réactionnel par circulation d'eau froide, d'un système de prélèvement *in situ* et d'un manomètre contrôlant la pression dans le réacteur. Le poste de commande permet d'imposer la température de réaction et la vitesse d'agitation. Lors des synthèses réalisées, il n'y a pas de contrôle sur la pression interne du réacteur, elle est autogène. Une fois la réaction terminée, le précipité formé (figure 8b) est récupéré sur les éléments plongeants et séparé du surnageant de synthèse par un cycle de centrifugation de 10 minutes à 15000 tours.min⁻¹ (10847 ×g).

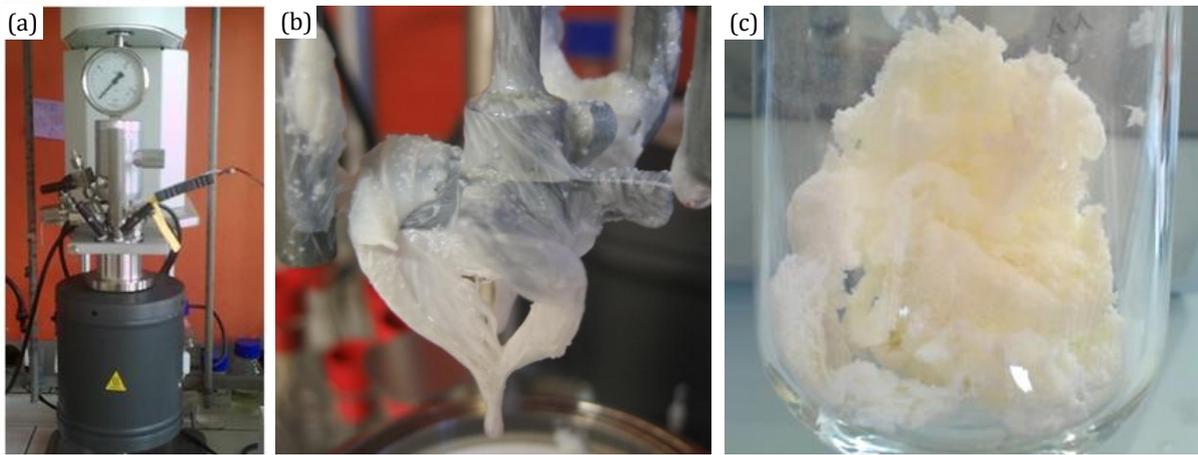


Figure 8 : (a) Photo du réacteur (Parr Instrument) dans lequel la synthèse de nanorubans de titanates par traitement hydrothermal se déroule. (b) Photo du précipité obtenu en sortie de synthèse (déposé sur les éléments plongeants du réacteur). (c) Photo du précipité après l'étape de lyophilisation.

Dans le but de revenir à un pH neutre, le précipité est ensuite lavé par dialyse pendant plusieurs jours (figure 9). Cette technique de purification consiste à placer le précipité à laver dans une membrane microporeuse et semi-perméable de 3500 Da, puis de le plonger dans un bain d'eau déionisée changée régulièrement. Par effet d'osmose et d'agitation moléculaire, les ions résiduels (excès de base, contre-ions, etc.) vont être éliminés de manière à ce que les potentiels chimiques de part et d'autre de la membrane soient identiques. Les eaux de lavage sont renouvelées régulièrement jusqu'à ce que leur pH et leur conductivité atteignent les valeurs de l'eau déionisée ($\text{pH} \approx 6$ et $s = 10 \mu\text{S}$). Ce mode de lavage, simple à mettre en œuvre, est une technique plus douce que les lavages par centrifugation. La dialyse offre ainsi l'avantage de préserver l'état de dispersion des rubans. Enfin, pour obtenir une poudre qui pourra être caractérisée, le précipité en suspension dans l'eau est ensuite congelé dans l'azote liquide puis lyophilisé par sublimation de l'eau à une température de -80°C et une pression d'environ 19 Pa (figure 8c).

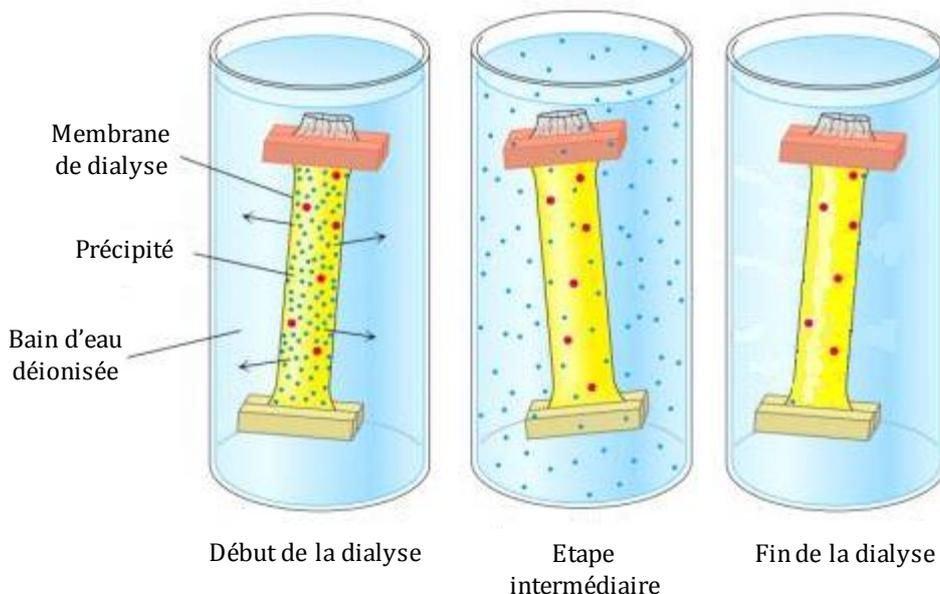


Figure 9 : Schéma expliquant le fonctionnement du mode de lavage et de purification du précipité par dialyse.

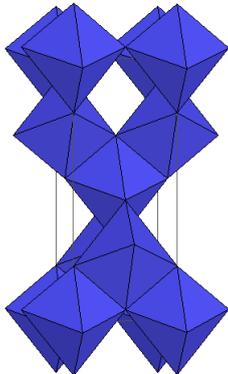
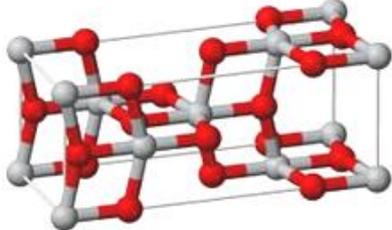
I.2 Les réactifs nécessaires à l'élaboration de nanorubans de titanates par traitement hydrothermal

Pour synthétiser des nanorubans de titanates par traitement hydrothermal, deux réactifs sont nécessaires : un précurseur pulvérulent de TiO_2 et une solution de soude. La quantité du précurseur ainsi que le volume de la solution de soude, conditionnés par la contenance du bol en Téflon et optimisés à partir des données bibliographiques, sont restés fixes à 440 mg et 110 mL respectivement. En revanche, la nature et la taille des grains du précurseur de TiO_2 ainsi que la concentration et le taux de carbonatation de la solution de soude sont des paramètres que nous avons fait varier.

I.2.1 Utilisation de différentes phases du précurseur TiO_2 : la taille des grains et la structure du TiO_2 de départ ont-elles une influence sur les produits de la réaction ?

I.2.1.1 Les différents précurseurs de TiO_2 utilisés pour la synthèse des nanorubans de titanates

D'après les données trouvées dans la littérature, il est possible de synthétiser des nanorubans d'oxydes de titane à partir de précurseurs de TiO_2 de différentes phases cristallographiques. En effet, du TiO_2 amorphe (Wu *et al.* 2006), de phase anatase (Feng *et al.* 2010), du P25 (Hong *et al.* 2003) et du TiO_2 cristallisé dans sa forme rutile (Pavasupree *et al.* 2005, Lan *et al.* 2005) ont été utilisés pour l'obtention de nanorubans par traitement hydrothermal. A ce jour, seule la phase brookite n'a pas été utilisée. Pour synthétiser des nanorubans de titanates au laboratoire, quatre précurseurs de TiO_2 présentant des phases cristallographiques et des tailles de grain différentes ont été testés. Les deux premiers, de phase rutile et de type P25, sont des précurseurs commerciaux produits par Tioxide et Degussa (tableau 1). Le précurseur de type P25 est un mélange de 20% de phase rutile et de 80% de phase anatase. Le troisième précurseur utilisé est quant à lui de phase anatase (tableau 1) et a été synthétisé par co-précipitation au laboratoire (Pighini. 2006, Pighini *et al.* 2007).

		Anatase	
Groupe ponctuel	$\frac{4}{m}$ mm		 <p style="text-align: center;">● Ti(IV) ● O(-II)</p>
Groupe d'espace	$I \frac{4_1}{a}$ md		
Système cristallin	Tétragonal		
Réseau de Bravais	Centré I		
Paramètres de maille	$a = 3,785 \text{ \AA}$		
	$c = 9,514 \text{ \AA}$		
	$Z = 4$		
	$V = 136,82 \text{ \AA}^3$		

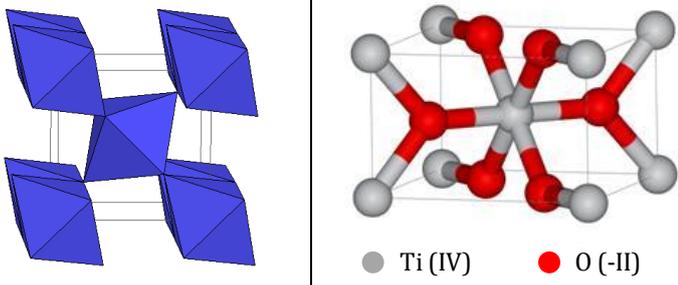
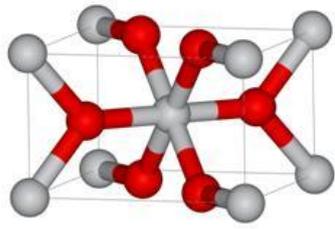
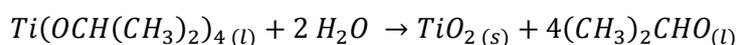
Rutile			
Groupe ponctuel	$\frac{4}{m}$		
Groupe d'espace	$P \frac{4_2}{m}$		
Système cristallin	Tétragonal		
Réseau de Bravais	Primitif P		
Paramètres de maille	$a = 4,593 \text{ \AA}$		
	$c = 2,959 \text{ \AA}$		
	$Z = 2$		
	$V = 62,43 \text{ \AA}^3$		

Tableau 1 : Tableau récapitulatif des caractéristiques cristallines du TiO₂ de phases cristallographiques anatase et rutile (fiches ICDD 21-1272 et 21-1276).

1.2.1.2 Synthèse par co-précipitation et traitement thermique de précurseurs de TiO₂ de phase anatase

La synthèse du précurseur de TiO₂ de phase anatase (protocole 1), déjà optimisée au laboratoire dans le cadre de la thèse de Catherine Pighini (Pighini, 2006), a été reproduite dans le cadre de ce travail. Cette synthèse est basée sur l'hydrolyse de l'isopropoxide de titane (équation 1) (Milot *et al.* 2005).



Équation 1 : Réaction d'hydrolyse de l'isopropoxide de titane permettant la synthèse de TiO₂ de phase anatase.

Protocole 1

Pour synthétiser du TiO₂ de phase anatase, 22,4 g en volume pesé d'isopropoxide de titane ont été ajoutés à 30 mL de butanol. Ces deux produits ont ensuite été progressivement introduits dans 400 mL d'eau déionisée préalablement chauffés au bain marie jusqu'à une température de 90°C (figure 10). Un précipité blanc s'est alors formé. Le mélange réactionnel a été laissé 15 minutes sous agitation magnétique de 700 tours.min⁻¹. Le précipité a ensuite été séparé du surnageant par un cycle de centrifugation de 10 minutes à 15000 tours.min⁻¹ (10847 ×g), puis lavé deux fois à l'acétone avant d'être lyophilisé.

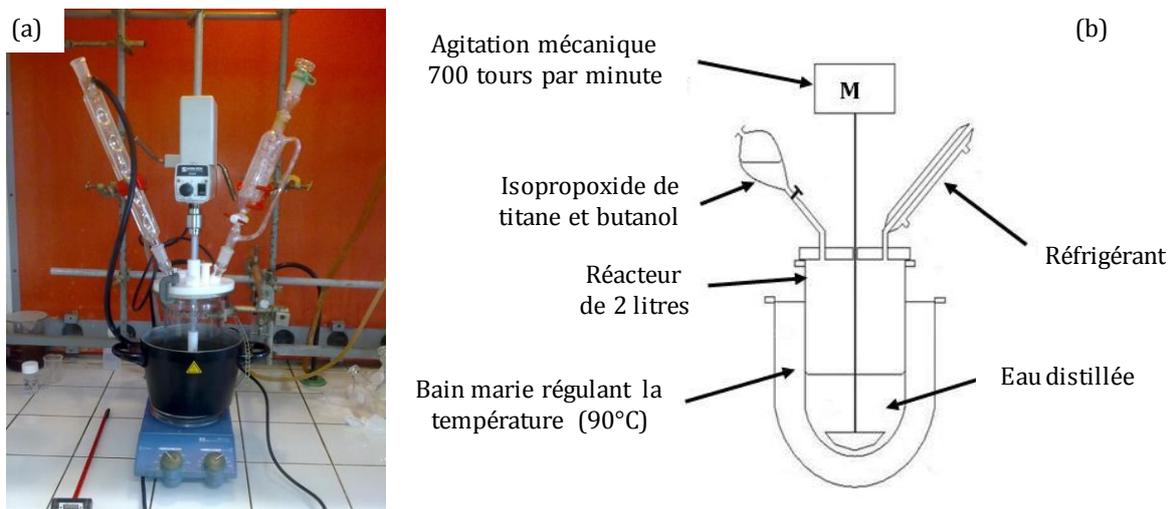


Figure 10 : (a) Photo et (b) schéma du réacteur permettant la synthèse du précurseur pulvérulent de TiO_2 de phase cristallographique anatase.

La poudre brute récupérée après l'étape de lyophilisation étant amorphe (Pighini. 2006), elle a été traitée thermiquement à deux températures différentes. Le traitement thermique, en plus d'éliminer les traces d'eau et les impuretés résiduelles, va favoriser la croissance des grains et va permettre l'obtention de nanoparticules cristallisées. Le choix des deux températures de traitement s'est fait après avoir analysé la poudre brute par ATG (figure 11). Pour cela, la poudre a été chauffée de 20 à 800°C (montée $2^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$) sous flux d'air reconstitué (débit $0,16 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$).

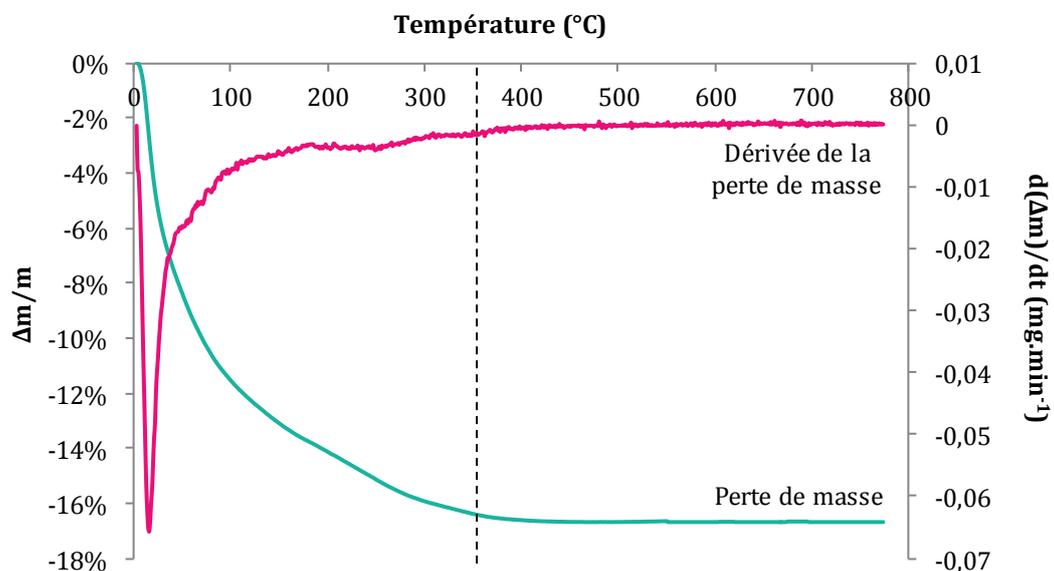


Figure 11 : Courbes ATG de la poudre brute de TiO_2 . Les mesures ont été effectuées sous flux d'air reconstitué ($\text{N}_2/\text{O}_2 = 0,12/0,04 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$) avec une rampe de montée en température de $2^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ de 20°C à 800°C.

Les résultats montrent qu'à partir de 350°C la perte de masse est quasi nulle. Cela signifie que le départ des résidus de synthèse ainsi que de l'eau physisorbée et chimisorbée se fait à des températures inférieures à 350°C. Un traitement thermique à cette température semble donc un choix judicieux. L'augmentation de la température favorisant la croissance de la taille des grains, un traitement thermique à 470°C permet d'obtenir également une poudre de

TiO₂ de phase anatase mais avec une taille de grain plus élevée. Cette augmentation de la taille des grains a été mise en évidence par observation au MET et par DRX lors de la thèse de Catherine Pighini. Le premier traitement thermique a donc été réalisé à une température de 350°C pendant 2h, couplée à une montée en température de 2°C par minute sous flux d'air reconstitué de 0,2 L par minute. Le deuxième traitement testé s'est déroulé dans les mêmes conditions, seule la température a été augmentée à 470°C (Pighini, 2006). Ces synthèses ont été reproduites dans le cadre de mon travail de thèse.

1.2.1.3 Caractérisations des précurseurs de TiO₂ utilisés pour la synthèse de nanorubans de titanates

Les observations MET indiquent qu'un traitement thermique, de 350°C pendant 2h de la poudre brute de TiO₂, conduit à une taille de grain comprise entre 5 et 10 nm alors qu'un traitement thermique, réalisé à une température plus élevée de 470°C, conduit à une taille de grain comprise entre 10 et 15 nm (figures 12a et b). Les précurseurs commerciaux présentent quant à eux des tailles de grain conformes à leur fiche technique. Les grains du TiO₂ de type P25 ont une taille moyenne de 25 nm et ceux de la phase rutile mesurent environ 175 nm (figure 12c et d et tableau 2).

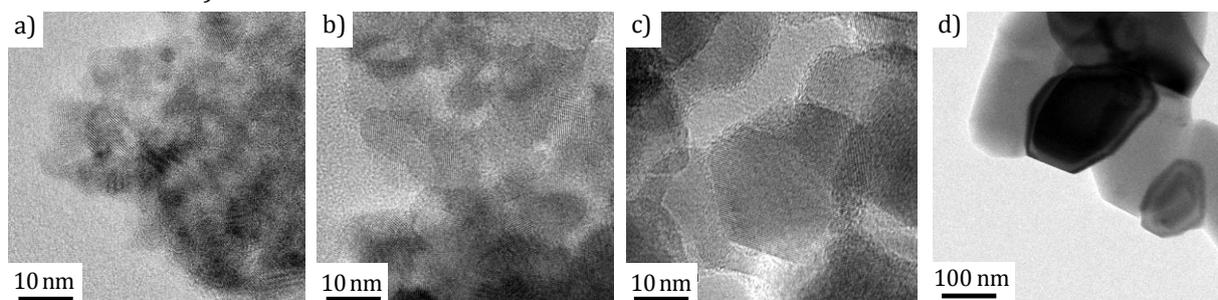


Figure 12 : Clichés MET des différents précurseurs de TiO₂ utilisés pour la synthèse des nanorubans de titanates : (a) anatase traité thermiquement à 350°C, (b) anatase traité thermiquement à 470°C, (c) P25 et (d) rutile.

Pour confirmer la phase cristallographique des deux précurseurs de TiO₂ synthétisés au laboratoire, des analyses en spectroscopie Raman et en DRX ont été réalisées. Sur les spectres Raman, les pics caractéristiques de la phase anatase situés à 142 cm⁻¹, 396 cm⁻¹, 512 cm⁻¹ et 636 cm⁻¹ (Ohsaka *et al.* 1978) sont présents pour les deux températures de traitement thermique (figure 13a). De plus, le modèle de confinement des phonons utilisé par l'équipe MaNaPI (Pighini *et al.* 2007), qui permet de relier le déplacement et l'élargissement des raies Raman à la taille des cristaux, a été utilisé pour confirmer la taille des grains des deux précurseurs de phase anatase synthétisés. Dans le cas de la poudre traitée à 350°C, la taille des grains est de 8 ± 1 nm et pour une température de 470°C, la taille des grains est évaluée à 11 ± 1 nm, ce qui coïncide avec les tailles déterminées par observations au MET (tableau 2). Un traitement thermique de 2h est suffisant pour obtenir la phase anatase. Un temps de traitement plus long aboutirait à l'apparition d'une phase parasite : la brookite (Ranade *et al.* 2002). Quant à la température, elle ne doit pas dépasser les 500°C pour éviter la transition en phase rutile (Ranade *et al.* 2002).

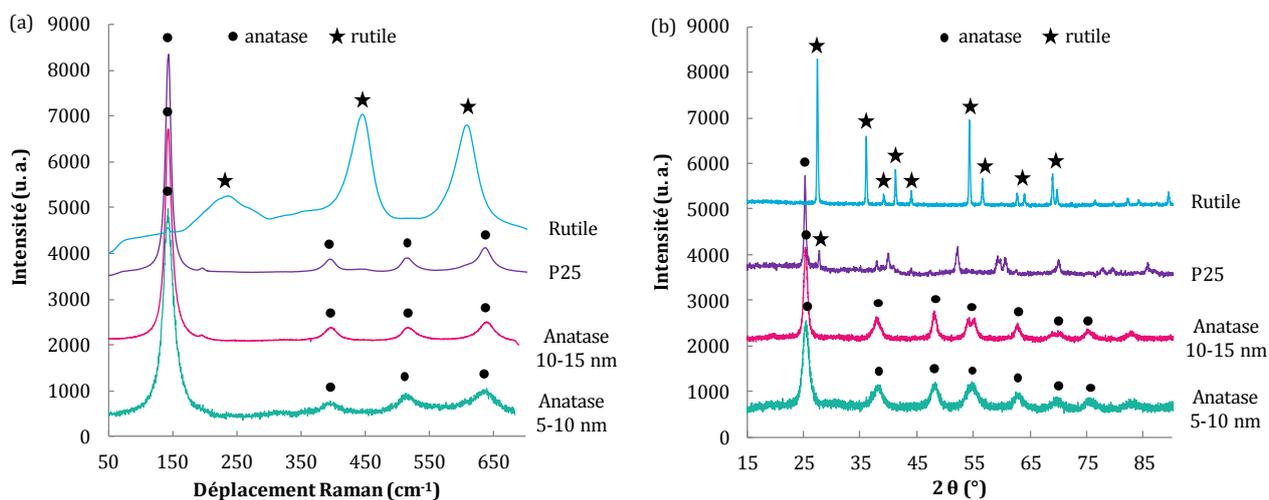


Figure 13 : (a) Spectres Raman et (b) diffractogrammes DRX ($\lambda K\alpha_{Cu} = 1,54056 \text{ \AA}$) des poudres de TiO_2 traitées thermiquement à 350 et 470°C et des poudres de TiO_2 commerciales.

Les diffractogrammes des deux poudres traitées thermiquement présentent des pics situés à $d = 0,35 ; 0,24 ; 0,19 ; 0,17 ; 0,16$ et $0,15 \pm 0,01 \text{ nm}$ (figure 13b). Ces pics sont caractéristiques du TiO_2 de phase anatase (fiche ICDD 21-1272). Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus en spectroscopie Raman et confirment que les deux poudres synthétisées au laboratoire sont de phase anatase. De plus, dans le cas de la poudre traitée à 350°C, les pics de diffraction sont plus larges que ceux de la poudre traitée à 470°C ce qui confirme que la taille des cristallites est plus faible.

	Ø MET	Ø Raman ($\pm 10\%$)	Ø DRX ($\pm 5\%$)	S BET ($\pm 5\%$)
Anatase TT350°C	5-10 nm	8 nm	7,3 nm	253 $m^2.g^{-1}$
Anatase TT470°C	10-15 nm	11 nm	13,1 nm	72 $m^2.g^{-1}$
P25	25 nm	26 nm	26 nm	25 $m^2.g^{-1}$
Rutile	175 nm	-	175 nm	6,5 $m^2.g^{-1}$

Tableau 2 : Tableau récapitulatif de la phase, de la taille des cristallites et de la surface spécifique des différents précurseurs de TiO_2 utilisés pour la synthèse des nanorubans de titanates. La taille Raman est déterminée par le modèle de confinement des phonons et la taille DRX par la méthode d'Halder et Wagner (logiciel Fityk pour la désomation des pics).

Pour déterminer la composition chimique des quatre précurseurs, des analyses XPS ont été réalisées (tableau 3). La profondeur d'échappement des photoélectrons étant de l'ordre de 3 nm, cette technique est alors considérée comme une analyse de surface des échantillons et non de composition globale. Les poudres synthétisées et commerciales présentent des proportions atomiques de carbone, d'oxygène et de titane très proches. La désomation du niveau 1s de l'oxygène montre qu'environ 80% des atomes d'oxygène contenus dans les échantillons sont attribués à l'oxygène de réseau. La proportion d'oxygène de réseau est alors deux fois supérieure à celle du titane ce qui confirme la composition TiO_2 des différents précurseurs. Dans le cas des poudres synthétisées au laboratoire, le rapport O^{2-}/Ti^{4+} se rapproche de 2 grâce au traitement thermique. En revanche, d'après la désomation du niveau 1s du carbone, il ne permet pas de réduire les pollutions de surface de type C-C et les fonctions organiques C-O et C=O (annexe 3) contenues dans la poudre brute. Les quatre précurseurs présentent alors la même proportion de liaisons C-C, C-O et C=O.

	Carbone (± 1%)	Oxygène (± 1%)	Titane (± 1%)	O ²⁻ /Ti ⁴⁺
Poudre TiO₂ brute	22	59	19	2,31
Poudre TT 350°C	17	61	22	2,05
Poudre TT 470°C	21	58	21	2,09
P25 commercial	20	59	21	2,19
Rutile commercial	20	58	22	2,09

	C-C et C-H (± 1%)	C-O (± 1%)	C=O et O-C=O (± 1%)	O ²⁻ (± 1%)	OH- et C=O (± 1%)
Poudre TiO₂ brute	16	4	2	44	15
Poudre TT 350°C	13	3	1	45	16
Poudre TT 470°C	16	3	2	44	14
P25 commercial	15	3	2	46	13
Rutile commercial	16	4	1	46	14

Tableau 3 : Proportion atomique XPS des éléments chimiques constituant les différents précurseurs (synthétisés et commerciaux) utilisés pour la synthèse des nanorubans de titanates.

Les différentes techniques de caractérisations utilisées ont montré que les deux précurseurs synthétisés au laboratoire sont des précurseurs de TiO₂ de phase anatase. Le premier, traité thermiquement à 350°C, présente une taille de grains comprise entre 5 et 10 nm. La taille des grains du second, traité à 470°C, est quant à elle comprise entre 10 et 15 nm. L'analyse des précurseurs commerciaux P25 et rutile a prouvé qu'ils présentent une taille de grains respective de 26 et 175 nm. Leur phase cristallographique a également été confirmée par DRX et spectroscopie Raman.

1.2.1.4 Synthèse de nanorubans de titanates à partir de quatre précurseurs de TiO₂ présentant des phases cristallographiques et des tailles de grain différentes

Pour étudier l'influence de la phase cristallographique et de la taille des grains du précurseur de TiO₂ sur la formation de nanorubans de titanates, quatre synthèses ont été réalisées (protocole 2) en utilisant les précurseurs commerciaux (P25 et rutile) et synthétisés au laboratoire (anatase 5-10 nm et anatase 10-15 nm).

Protocole 2

Pour synthétiser des nanorubans de titanates par traitement hydrothermal, 440 mg de précurseur pulvérulent de TiO₂ sont ajoutés à 110 mL d'une solution de soude à 10M. Les conditions de réaction sont une étape de sonication de 30 minutes à la canne à ultrasons (pulse de 2 secondes, puissance 375 Watt), une température de 180°C, un temps de réaction de 20h, une agitation mécanique de 150 tours par minute et une pression autogène de 7 bar.

Les observations MET et MEB montrent que, dans tous les cas, le traitement hydrothermal conduit à la formation de nanorubans (figure 14).

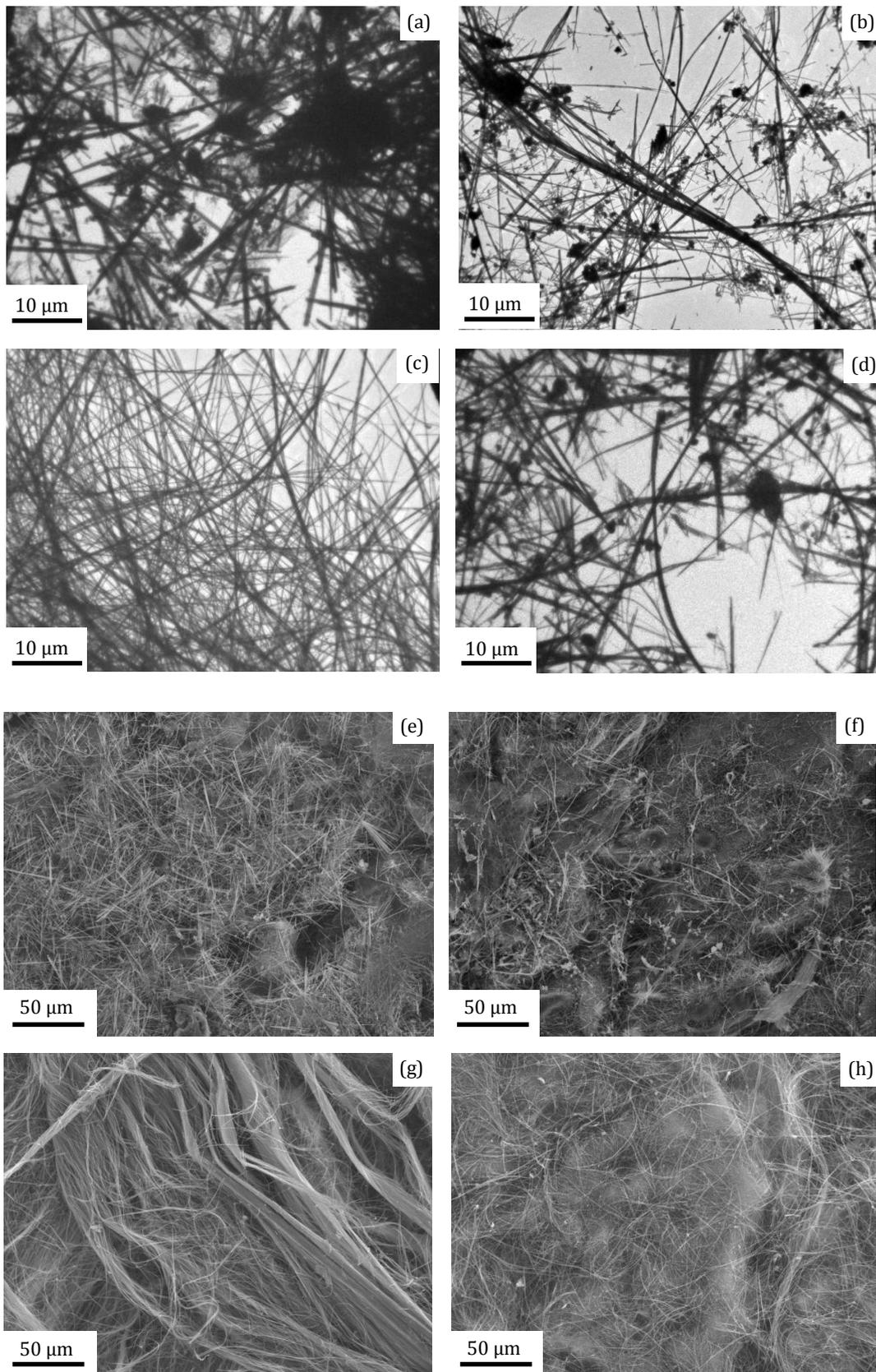


Figure 14 : Clichés (a-d) MET et (e-h) MEB des nanorubans synthétisés à partir de différents précurseurs de TiO_2 : (a et e) anatase 5-10 nm, (b et f) anatase 10-15 nm, (c et g) P25 et (d et h) rutile (440 mg TiO_2 , 110 mL solution de soude 10M, étape de sonication (30 min, 375 W), 180°C, 20h, 7 bar, 150 tours.min⁻¹).

Cependant, les nanorubans synthétisés présentent des dimensions variables en fonction du précurseur de TiO_2 utilisé. L'emploi des précurseurs anatase et rutile conduit à la formation de nanorubans de longueur comprise entre 1 μm et plusieurs dizaines de micromètres pour une largeur variant de 30 à 300 nm. De plus, les nanorubans ne sont pas la seule nanostructure à avoir été synthétisée lors de l'utilisation de ces trois précurseurs (figures 14a, b, d et e, f, h). Des particules non désirées, de forme plus ou moins sphériques, sont présentes en grande proportion dans le produit de synthèse. Leur taux de présence est estimé à 20% en rapport surfacique (annexe 4). Des analyses seront réalisées par la suite pour étudier et caractériser ces particules (paragraphe I.4.2). En revanche, les nanorubans synthétisés à partir du précurseur P25 présentent une longueur avoisinant la centaine de micromètre pour une largeur variant de 100 à 200 nm et s'organisent en formant un réseau (figures 14c et g). Il est très difficile de déterminer avec plus de précision la longueur des nanorubans synthétisés. En effet, dans la majorité des cas, les nanorubans sont tellement longs qu'ils sont contenus dans plusieurs carreaux de grille MET (60 x 60 μm). Il est alors difficile de les suivre sur toute leur longueur pour pouvoir les mesurer. Comme précédemment, la synthèse de nanorubans est accompagnée par la formation de sous produits de synthèse. Cependant, la proportion de ces nanoparticules non désirées est largement moins importante que celle des nanorubans puisqu'elle est évaluée à 10% seulement en rapport de surface.

En ce qui concerne la structure des nanorubans synthétisés, les analyses DRX montrent des signatures particulières selon la nature du précurseur de TiO_2 utilisé lors du traitement hydrothermal (figure 15). Il est également intéressant de remarquer l'absence de précurseur résiduel (TiO_2 anatase et/ou rutile) pour les quatre synthèses.

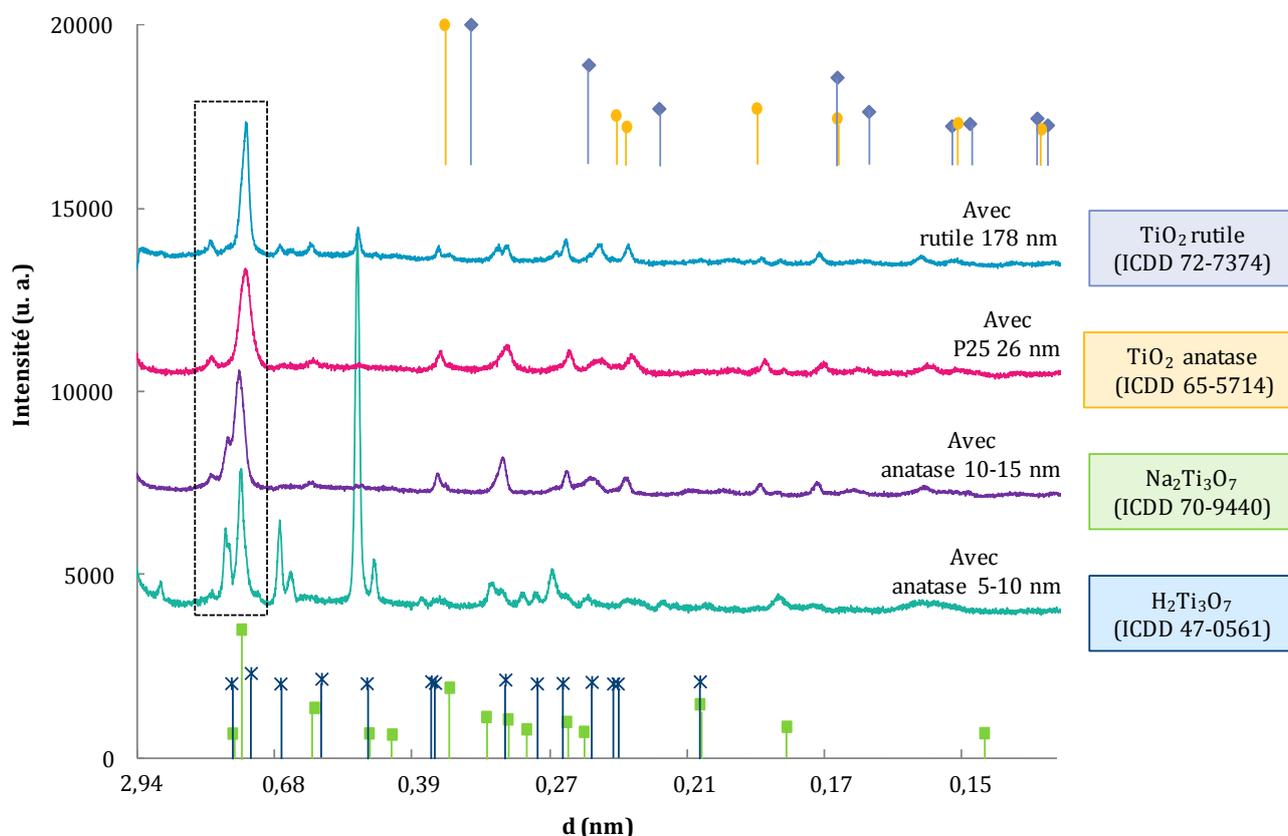


Figure 15 : Diffractogrammes des nanorubans synthétisés par traitement hydrothermal (440 mg TiO_2 , 110 mL solution de soude 10M, étape de sonication (30 min, 375 W), 180°C, 20h, 7 bar, 150 tours.min⁻¹) à partir des précurseurs de TiO_2 anatase 5-10 nm, anatase 10-15 nm, P25 et rutile.

Cependant, ces quatre signatures présentent des similitudes avec deux familles de titanates : le trititanate alcalin $\text{Na}_2\text{Ti}_3\text{O}_7$ (fiche ICDD 70-9440) et le trititanate d'hydrogène $\text{H}_2\text{Ti}_3\text{O}_7$ (fiche ICDD 47-0561). Ainsi, certains pics peuvent être assimilés aux plans atomiques des modèles $\text{H}_2\text{Ti}_3\text{O}_7$ et $\text{Na}_2\text{Ti}_3\text{O}_7$ (tableau 4). Les nanorubans ayant été synthétisés en présence d'une solution de soude, leur structure peut alors être assimilée plus généralement à $\text{Na}_x\text{H}_{2-x}\text{Ti}_3\text{O}_7$ ou à $\text{Na}_y\text{H}_{2-y}\text{Ti}_n\text{O}_{2n+1}, x\text{H}_2\text{O}$ (Sun *et al.* 2003).

Position pic	0,82 nm	0,57 nm	0,36 nm	0,30 nm	0,26 nm
$\text{Na}_2\text{Ti}_3\text{O}_7$	(001)	(101)	(102)	($\bar{3}$ 01)	(112)
$\text{H}_2\text{Ti}_3\text{O}_7$	(200)	(201)	(202)	(003)	(203)

Tableau 4 : Tableau récapitulatif de la concordance entre les pics caractéristiques des nanorubans avec les plans atomiques des modèles $\text{Na}_2\text{Ti}_3\text{O}_7$ (fiche ICDD 70-9440) et $\text{H}_2\text{Ti}_3\text{O}_7$ (fiche ICDD 47-0567).

Une désomation des premiers pics caractéristiques, réalisée à l'aide du logiciel Fityk, montre qu'ils sont constitués de plusieurs contributions (figure 16). Pour la synthèse réalisée à partir du précurseur anatase 5-10 nm, quatre pics placés à $d = 1,06 ; 0,94 ; 0,91$ et $0,84 \pm 0,01$ nm sont visibles. La position de ces pics, calculée en utilisant la loi de Bragg, correspond à la distance interréticulaire entre les plans atomiques formant les nanostructures. Dans le cas des nanotubes, il est communément admis que le premier pic (en général attribué à une seule contribution) correspond à la distance inter-parois formant l'enroulement des tubes. Cette distance est classiquement de $d = 0,75$ nm (Sun *et al.* 2003, Bavykin *et al.* 2005, Wu *et al.* 2005, Khan *et al.* 2006). Lors de la thèse d'Anne-Laure Papa, il a été démontré par couplage de techniques (MET, DRX et Raman) que d'autres contributions, au voisinage de ce premier pic intense, pourraient être attribuées aux nanofeuillets pour $d \approx 1$ nm et aux nanorubans pour $d \approx 0,8$ nm (Papa *et al.* 2009).

Pour chaque synthèse, des nanostructures présentant des distances interréticulaires aux alentours de 1,05 et 0,80 nm sont effectivement présentes. Ces nanostructures correspondraient respectivement aux nanofeuilles (Takezawa *et al.* 2006, Papa. 2009, Nakagawa *et al.* 2011,) et aux nanorubans (Lan *et al.* 2005, Yu *et al.* 2006, Papa. 2009). Les rapports d'aires des pics caractéristiques de ces deux nanostructures indiquent que les nanorubans ont été synthétisés en majorité : leur proportion avoisinerait les 90%.

L'utilisation de précurseurs de phase anatase conduit à la formation de nanostructures présentant des distances interréticulaires aux alentours de 0,90 nm. Ces nanostructures pourraient correspondre aux nanoparticules non désirées observées sur les images MET. Cependant, cette distance n'apparaît pas dans le cas du précurseur rutile, alors qu'une « pollution » identique est observée sur les clichés MET.

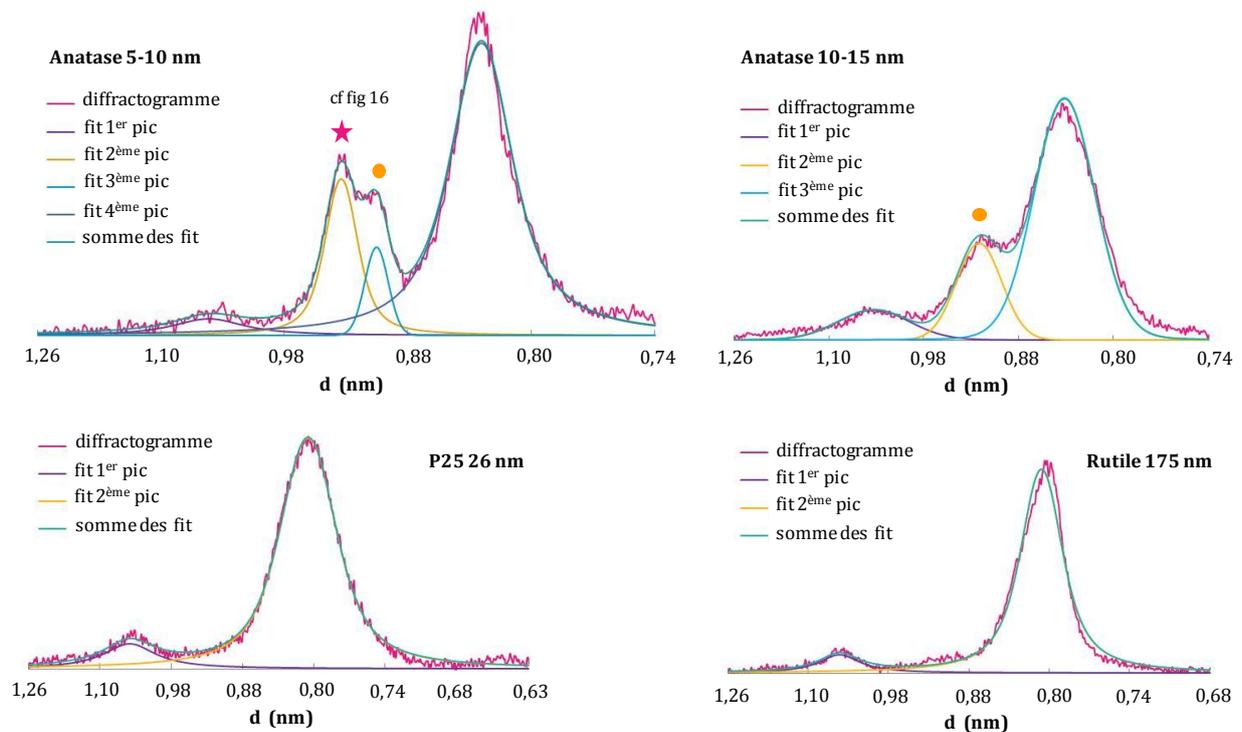


Figure 16 : Désommission des premiers pics caractéristiques des diffractogrammes DRX des nanostructures synthétisées par traitement hydrothermal (440 mg TiO_2 , 110 mL solution de soude 10M, étape de sonication (30 min, 375 W), 180C, 20h, 7 bar, 150 tours.min⁻¹) à partir de précurseur de TiO_2 de phase anatase 5-10 nm, anatase 10-15 nm, P25 et rutile et en utilisant la fonction pseudo-Voigt comme modèle.

Un autre point important mis en évidence par les analyses DRX est l'apparition de pics, parfois très intenses, situés à $d = 3,31 ; 1,86 ; 0,66 ; 0,62 ; 0,47$ et $0,45 \pm 0,01$ nm dans le cas de la synthèse réalisée à partir du précurseur anatase 5-10 nm. Pour expliquer ce phénomène, plusieurs hypothèses sont envisageables :

- **Apparition d'une nouvelle phase** : Une recherche dans la base de donnée ICDD indique que le pic le plus intense situé à $d = 0,47 \pm 0,01$ nm et un autre pic placé à $d = 0,27 \pm 0,01$ nm correspondraient à la structure $\text{Na}_4\text{Ti}_3\text{O}_8$ (fiche ICDD 38-730). Cependant, cette fiche n'est pas indexée et ne présente aucune information pour les distances interréticulaires supérieures à 0,54 nm (pour les faibles 2θ). De plus, elle ne permet pas d'expliquer l'apparition des autres pics. Cette première hypothèse n'est alors pas suffisante pour expliquer la totalité des observations à moins d'envisager un état cristallin nouveau non répertorié dans la base ICDD.
- **Formation d'une surstructure** : La présence de pics à faibles angles de diffraction ($d = 3,31$ et $1,86 \pm 0,01$ nm) plaide en faveur de la formation d'une surstructure (Ustinov *et al.* 2004). Ainsi, un état d'ordre des ions Na^+ et H^+ pourrait se surajouter à l'ordre déjà existant. D'après la loi de Bragg, le pic placé à $d = 0,66 \pm 0,01$ nm serait alors l'harmonique d'ordre 5 du pic situé à $d = 3,31 \pm 0,01$ nm et celui placé à $d = 0,62 \pm 0,01$ nm serait l'harmonique d'ordre 3 du pic situé à $d = 1,86 \pm 0,01$ nm (tableau 5 et figure 17). Des mesures sur un autre dispositif et à des angles de diffraction plus faibles devront cependant être réalisées pour confirmer la position du pic présentant la plus forte distance interréticulaire. Les pics situés à $d = 0,94$ et $0,91 \pm 0,01$ nm et

leurs harmoniques d'ordre 2 placées à $d = 0,47$ et $0,45 \pm 0,01$ nm correspondraient, quant à eux, à d'autres plans de la surstructure ce qui annulerait alors l'hypothèse de la présence de la phase $\text{Na}_4\text{Ti}_3\text{O}_8$.

Position pic (nm)	3,31	1,86	0,94	0,91	0,66	0,62	0,47	0,45
Harmonique d'ordre 2 (nm)	1,57	0,95	0,47	0,45	0,33	0,31	0,23	0,22
Harmonique d'ordre 3 (nm)	1,05	0,62	0,31	0,30	0,22	0,21	0,16	0,15
Harmonique d'ordre 4 (nm)	0,79	0,48	0,23	0,22	0,17	0,16	0,12	0,11
Harmonique d'ordre 5 (nm)	0,66	0,38	0,19	0,18	0,13	0,12	0,09	0,09

Tableau 5 : Tableau récapitulatif des différents pics et de leurs harmoniques d'ordre 2 à 5.

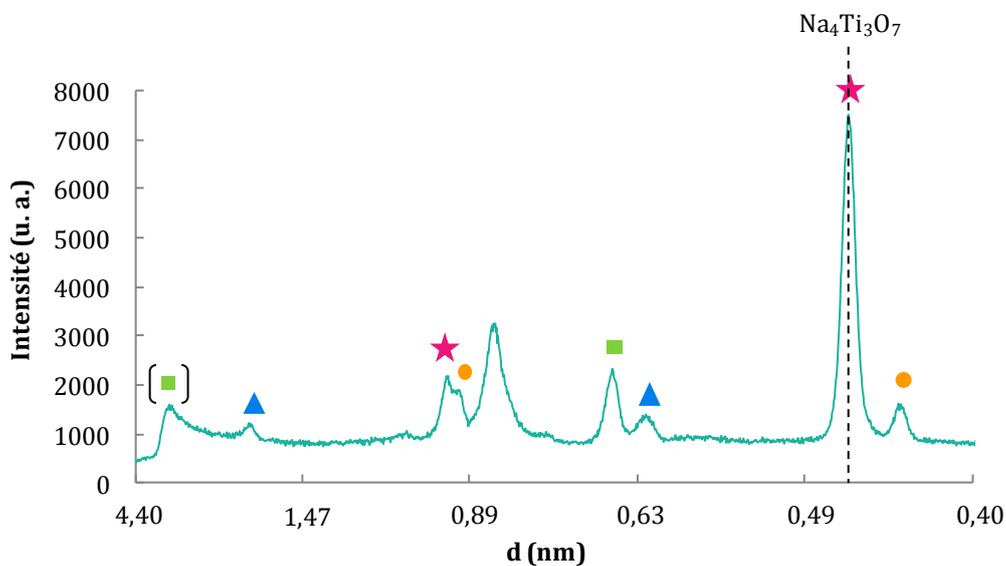


Figure 17 : Partie du diffractogramme des nanorubans synthétisés par traitement hydrothermal à partir des précurseurs de TiO_2 anatase 5-10 nm (440 mg TiO_2 , 110 mL solution de soude 10M, étape de sonication (30 min, 375 W), 180°C, 20h, 7 bar, 150 tours.min⁻¹).

De plus, vu la morphologie des nanoparticules synthétisées et le mode de préparation des échantillons DRX, un **phénomène de texturation**, correspondant à une orientation préférentielle des cristaux, pourrait expliquer les variations spectaculaires d'intensité observées (Ustinov *et al.* 2004). Cependant, le compteur courbe n'étant pas adapté pour la visualisation de phénomènes de texturation, des analyses complémentaires devront être réalisées sur d'autres dispositifs tel que le D5000 disposant d'un montage Bragg-Montano.

Enfin, vu l'organisation sous la forme de feuillets de ces nanostructures et la complexité de la composition chimique non clairement définie, des **défauts d'empilement**, conduisant à des décalages légers des pics de diffraction, sont à envisager (Ustinov *et al.* 2004).

Etant donné la complexité du matériau, un mélange de toutes ces hypothèses semble le plus probable pour expliquer la signature particulière des nanoparticules synthétisées à partir du précurseur TiO_2 anatase 5-10 nm.

Des analyses complémentaires réalisées par spectroscopie Raman (figure 18) confirment les résultats obtenus par DRX (figure 15). L'allure générale des spectres est très proche quelle que soit la nature du précurseur de TiO_2 . La présence des nanorubans est mise en évidence par plusieurs pics placés à 162, 197, 210, 239, 268, 283, 330, 380, 430, 467, 603 et 674 cm^{-1} . Cependant, seuls les deux premiers pics sont réellement caractéristiques de la morphologie des nanorubans puisqu'ils n'apparaissent pas dans la signature des autres nanostructures de titanates comme les nanotubes (Papa *et al.* 2009). D'après la littérature (Kolen'ko *et al.* 2006, Liu *et al.* 2010), le spectre Raman de $\text{Na}_2\text{Ti}_3\text{O}_7$ présente, aux alentours de 280 et 372 cm^{-1} , des pics caractéristiques associés à la vibration des liaisons Ti-O-Na, et aux alentours de 672 cm^{-1} , un pic correspondrait aux vibrations d'élongation des liaisons Ti-O-Ti des couches de titanates constituée d'octaèdres de TiO_6 . La présence de ces pics dans la signature des nanorubans confirme que la structure des nanoparticules synthétisées par traitement hydrothermal peut être assimilée au trititanate $\text{Na}_x\text{H}_{2-x}\text{Ti}_3\text{O}_7$. Comme pour les analyses DRX, les spectres des nanorubans synthétisés à partir des précurseurs P25 et rutile sont assez proches. En revanche, dans le cas des nanorubans synthétisés à partir de précurseur de phase anatase, un pic situé entre 310 et 320 cm^{-1} apparaît et les pics situés aux alentours 430 et 475 cm^{-1} sont beaucoup plus prononcés (figure 18). Enfin, dans le cas de l'utilisation du précurseur anatase de taille de grains comprise entre 10 et 15 nm, un pic supplémentaire est positionné vers 250 cm^{-1} . Ces résultats sont très difficiles à interpréter et la seule chose qui peut être affirmée est qu'il y a des variations structurales en fonction de la nature et de la taille des grains du précurseur de TiO_2 utilisé pour la synthèse de nanorubans. Ces variations sont particulièrement marquées dans le cas de cristallites de TiO_2 de taille inférieure à 25 nm. Notons que la présence d'une surstructure (supputée en DRX) pour l'échantillon obtenu à partir du précurseur anatase 5-10 nm, devrait conduire à l'obtention de pics plus fins voir des pics supplémentaires (Ponosov *et al.* 1999). Ce n'est ici pas le cas. Il ne faut cependant pas perdre de vue que contrairement à la DRX, la spectroscopie Raman est une technique d'analyse locale et que dans le cas d'une hétérogénéité au sein de l'échantillon, il faudrait reprendre ces analyses en d'autres points pour totalement exclure cette hypothèse.

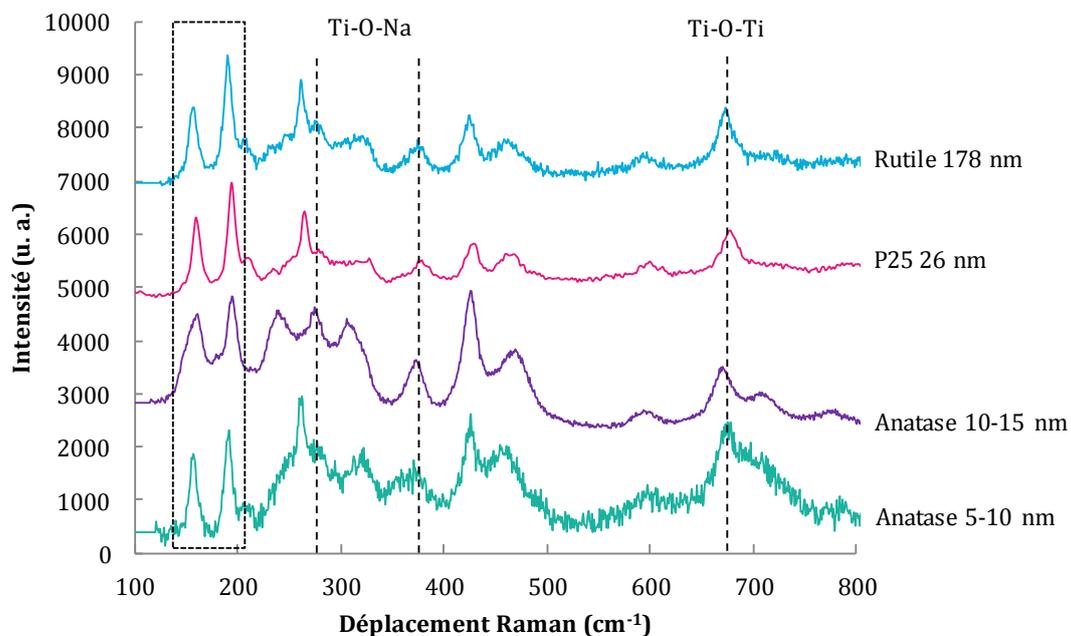


Figure 18 : Spectres Raman des nanorubans synthétisés par traitement hydrothermal (440 mg TiO_2 , 110 mL solution de soude 10M, étape de sonication (30 min, 375 W), 180°C, 20h, 7 bar, 150 tours.min⁻¹) à partir des précurseurs de TiO_2 anatase 5-10 nm, anatase 10-15 nm, P25 et rutile.

La composition chimique des produits de synthèses, appréhendée par analyses XPS, change également beaucoup selon le précurseur de TiO₂ utilisé durant le traitement hydrothermal (tableau 6). Il est tout d'abord important de souligner que ce type d'analyse, classiquement considéré comme une analyse de surface, peut être dans certains cas considéré comme une analyse globale. C'est le cas lors de l'obtention de nanotubes (épaisseur de parois < 3 nm) et nous verrons paragraphe I.4.1 que cela peut aussi être le cas pour les nanorubans les plus fins. Dans les autres cas, seule la surface des nanostructures est analysée.

	Carbone (± 1%)	Sodium (± 1%)	Oxygène (± 1%)	Titane (± 1%)	Na ⁺ /Ti ⁴⁺	O ²⁻ /Ti ⁴⁺
Anatase 5-10 nm	23	6	57	14	0,43	2,71
Anatase 10-15 nm	13	6	50	31	0,19	1,1
P25 26 nm	14	5	48	33	0,15	1
Rutile 175 nm	16	6	50	27	0,22	1,07

	C-C et C-H (± 1%)	C-O (± 1%)	C=O et O-C=O (± 1%)	O ²⁻ (± 1%)	OH ⁻ et C=O (± 1%)	H ₂ O et C-O (± 1%)	Na _{Auger} (± 1%)
Anatase 5-10 nm	13	8	2	38	10	6	3
Anatase 10-15 nm	7	4	2	34	8	5	3
P25 26 nm	8	4	2	33	9	4	1
Rutile 175 nm	7	6	3	29	11	7	3

Tableau 6 : Proportion atomique XPS des différents éléments chimiques constituant les nanoparticules synthétisées par traitement hydrothermal (440 mg TiO₂, 110 mL solution de soude 10M, étape de sonication (30 min, 375 W), 180°C, 20h, 7 bar, 150 tours.min⁻¹) à partir de précurseur de TiO₂ de phase anatase 5-10 nm, anatase 10-15 nm, P25 et rutile.

Dans le cas des nanorubans synthétisés à partir de l'anatase 5-10 nm, la proportion d'oxygène de réseau est presque trois fois plus importante que la teneur en titane. Cette faible teneur en titane était prévisible puisqu'en sortie de synthèse, la solution de soude, initialement incolore, était colorée en jaune (figure 19). La coloration jaune s'explique par la présence d'ions Ti⁴⁺ dans le surnageant (Natarajan *et al.* 1997). En effet, des analyses réalisées en ICP (spectrométrie par torche à plasma) indiquent que le surnageant de synthèse contient une teneur en titane de 0,139 mg.L⁻¹.

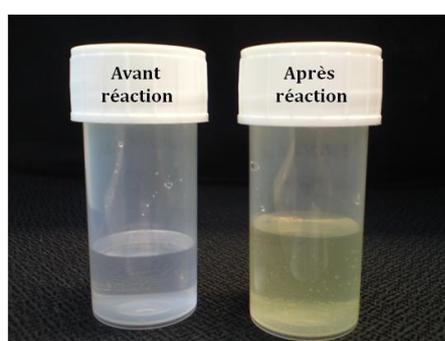


Figure 19 : Photo de la solution de soude avant et après la synthèse de nanorubans de titanates par traitement hydrothermal d'un précurseur de TiO₂ de phase anatase 5-10 nm (440 mg TiO₂, 110 mL solution de soude 10M, étape de sonication (30 min, 375 W), 20h, 180°C, 7 bar, 150 tours.min⁻¹).

Les compositions chimiques des nanorubans synthétisés à partir des précurseurs anatase 10-15 nm, P25 et rutile sont par contre très proches (tableau 6). Ce résultat n'est pas surprenant puisque les nanorubans présentaient déjà une morphologie et une structure proche d'après les analyses MET, DRX et Raman. Une désomation des niveaux 1s du carbone et de l'oxygène (annexe 3) montre que la participation des atomes de carbone aux pollutions de type C-C et aux fonctions C-O et C=O, est proche pour toutes les synthèses. Les participations des atomes d'oxygènes à l'oxygène de structure, aux groupements hydroxyles et à l'eau de structure sont également voisines quelle que soit la nature du précurseur de TiO₂ utilisé. On notera cependant un taux d'oxygène de réseau et de liaisons de type C-C/C-H et C-O plus important dans le cas de l'utilisation du précurseur anatase 5-10 nm. Cette différence de composition est à rapprocher :

- soit de l'état cristallin différent observé par DRX pour les rubans provenant de ce précurseur,
- soit de nanorubans plus fins pour lesquels l'analyse XPS serait ici réellement une analyse globale, alors qu'elle serait plus de surface pour les autres précurseurs.

Pour conclure sur l'influence du type de précurseur, il semble que si tant est que les grains de celui-ci soit de taille supérieure à 10 nm, des nanostructures et des compositions chimiques très semblables sont obtenues. Cependant, les techniques utilisées pour caractériser les nanostructures synthétisées à partir de différents précurseurs de TiO₂ ont montré que le P25 est le précurseur le plus approprié pour obtenir des nanorubans de titanates. En utilisant ce précurseur, les nanorubans présentent des dimensions homogènes (largeur comprise entre 100 et 200 nm et longueur avoisinant les 100µm) et la part de sous produits de synthèse ne dépasse pas les 10% (annexe 4). Leur composition peut être assimilée à Na_yH_{2-y}Ti_nO_{2n+1}, xH₂O. Par la suite, tous les nanorubans seront synthétisés à partir du précurseur de TiO₂ P25.

I.2.2 Influence de la concentration de la solution de soude et de son niveau de carbonatation

I.2.2.1 Influence de la concentration de la solution de soude sur l'obtention de nanorubans de titanates

Pour synthétiser des nanorubans de titanates par traitement hydrothermal, un milieu alcalin est nécessaire. D'après les données bibliographiques, la soude est la base la plus fréquemment utilisée. Cependant, il est possible de synthétiser des nanorubans de titanates en utilisant d'autres bases comme notamment l'hydroxyde de potassium KOH (Wang *et al.* 2003). Des essais de synthèses de nanotubes de titanates à partir de LiOH, NaCl ou NaNO₃ ont mis en avant la nécessité d'utiliser une solution de NaOH afin d'avoir simultanément une forte concentration d'ions OH⁻ et d'ions Na⁺ jouant le rôle de catalyseur et favorisant ainsi la synthèse des nanostructures (Chen *et al.* 2002). Pour synthétiser ces nanorubans, une concentration de solution de soude comprise entre 5 et 15 mol.L⁻¹ serait appropriée pour des températures de traitement hydrothermal comprise entre 180 et 250°C (Yuan *et al.* 2004). En accord avec les données bibliographiques, des solutions de soude de concentration 5, 10 et 15 mol.L⁻¹ ont été testées pour la synthèse de nanorubans de titanates (protocole 2).

Les observations MET (figure 20) indiquent que la synthèse réalisée avec une solution de soude à 5M aboutit à la formation de deux types de nanostructures. L'espèce majoritaire (80% en rapport surfacique) correspond à des nanoparticules sous forme de grains plus ou moins agglomérés. La seconde espèce est constituée de nanorubans de largeur comprise entre 50 et 100 nm pour une longueur de quelques micromètres. Une solution de soude à 10M conduit quant à elle uniquement à la formation de nanorubans de largeur comprise entre 100 et 200 nm et de longueur atteignant plusieurs dizaines de micromètres. Avec une solution de soude à 15M aucun nanoruban n'est synthétisé. Seuls des nanoparticules sous forme de grains fortement agglomérés sont présentes dans le produit de synthèse.

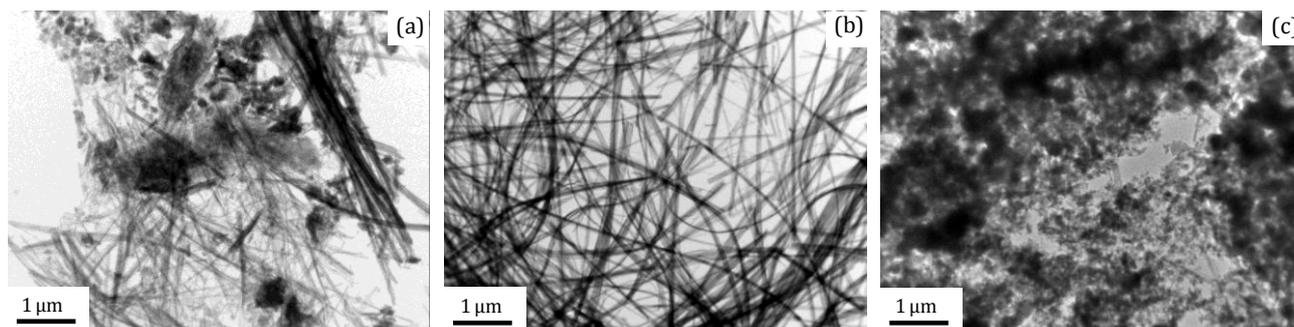


Figure 20 : Clichés MET des nanoparticules synthétisées par traitement hydrothermal (440 mg TiO₂ P25, 110 mL solution de soude, étape de sonication (30 min, 375 W), 180°C, 20h, 7 bar, 150 tours.min⁻¹) avec des concentrations de solution de soude de (a) 5M, (b) 10M et (c) 15M.

Les analyses DRX indiquent que les nanoparticules synthétisées présentent également des structures différentes (figure 21).

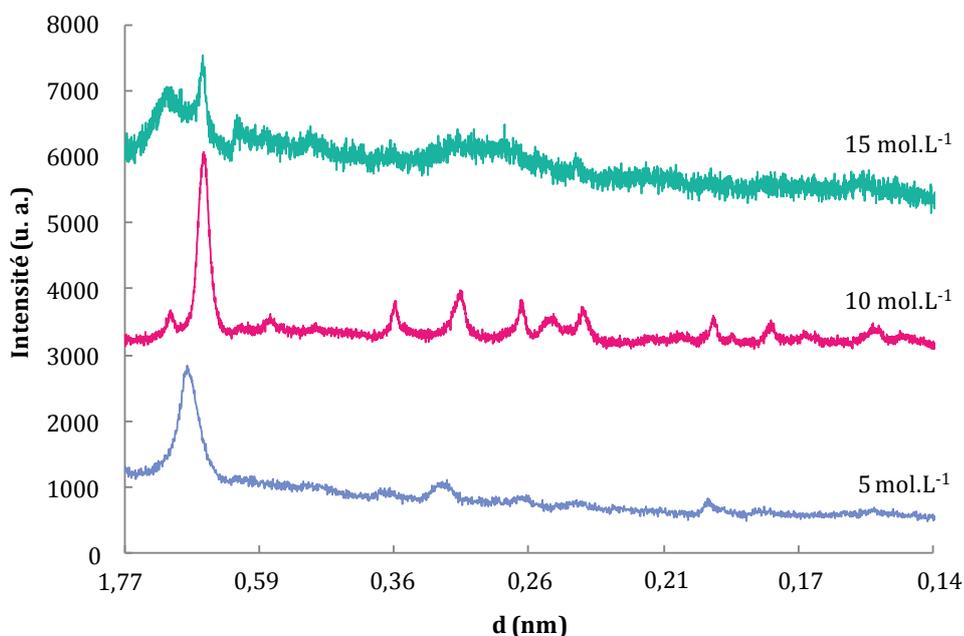


Figure 21 : Diffractogrammes des nanorubans synthétisés par traitement hydrothermal (440 mg TiO₂ P25, 110 mL solution de soude, étape de sonication (30 min, 375 W), 180°C, 20h, 7 bar, 150 tours.min⁻¹) avec des concentrations de solution de soude de 5M, 10M et 15M.

Dans le cas de l'utilisation d'une solution de soude à 5M, le diffractogramme se compose de quatre pics caractéristiques de la morphologie tubulaire situés à $d = 0,95 ; 0,37 ; 0,32$ et $0,19 \pm 0,01$ nm (Torrente-Murciano *et al.* 2009, Papa *et al.* 2009). Les nanoparticules sous forme de grains agglomérés seraient alors des pelotes de nanotubes comme l'indique le cliché MET haute résolution (figure 22).

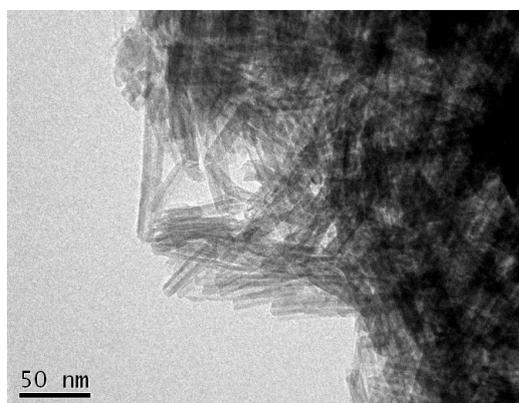


Figure 22 : Cliché MET des pelotes de nanotubes formées lors du traitement hydrothermal en présence d'une solution de soude à 5M (440 mg TiO₂ P25, 110 mL solution de soude, étape de sonication (30 min, 375 W), 180°C, 20h, 7 bar, 150 tours.min⁻¹).

Le diffractogramme de la synthèse réalisée à partir d'une solution de soude à 10M correspond quant à lui à la signature des nanorubans (Zhu *et al.* 2007). Ces nanorubans présentent une structure proche des trititanates Na_yH_{2-y}Ti_nO_{2n+1}, xH₂O (Sun *et al.* 2003). En revanche, lorsque la solution de soude atteint une concentration de 15M, l'allure générale du diffractogramme indique que les nanoparticules synthétisées sont quasiment amorphes. Les deux premiers pics caractéristiques des nanorubans, situés à $d = 1,05$ et $0,81 \pm 0,01$ nm se devinent cependant sur le diffractogramme. Cela laisse penser que la distance interréticulaire entre les plans atomiques constituant les rubans et les grains synthétisés est cependant identique, ou que quelques rubans et feuilletts sont formés au milieu de ces grains amorphes.

Les analyses réalisées par XPS (tableau 7) indiquent par ailleurs que les nanotubes, les nanorubans et les nanograins présentent une composition chimique globale identique. Contrairement à ce qui était attendu, la proportion d'atome de sodium ne varie pas en fonction de la concentration en solution de soude. Les différentes contributions des atomes d'oxygène et de carbone (annexe 3) restent constantes quelle que soit la concentration de la solution de NaOH.

	Carbone (± 1%)	Sodium (± 1%)	Oxygène (± 1%)	Titane (± 1%)	Na ⁺ /Ti ⁴⁺	O ²⁻ /Ti ⁴⁺
Soude 5 M	21	7	58	14	0,5	2,4
Soude 10 M	22	8	55	16	0,5	2,06
Soude 15 M	22	7	57	14	0,5	2,5

	C-C et C-H (± 1%)	C-O (± 1%)	C=O et O-C=O (± 1%)	O ²⁻ (± 1%)	OH· et C=O (± 1%)	H ₂ O et C-O (± 1%)	Na _{Auger} (± 1%)
Soude 5 M	16	5	1	34	12	8	3
Soude 10 M	13	7	2	33	13	7	2
Soude 15 M	16	4	2	35	13	6	3

Tableau 7 : Proportion atomique XPS des différents éléments chimiques constituant les nanoparticules synthétisées par traitement hydrothermal (440 mg TiO₂ P25, 110 mL solution de soude, étape de sonication, 180°C, 20h, 7 bar, 150 tours.min⁻¹) avec des concentrations de solution de soude de 5M, 10M et 15M.

La concentration de la solution de soude influe principalement sur la morphologie et la structure des nanoparticules synthétisées. Pour obtenir des nanorubans en sortie de synthèse, le milieu alcalin doit avoir une concentration de 10M.

1.2.2.2 Le taux de carbonatation de la solution de soude influe-t-il sur la synthèse des nanorubans ?

L'influence de la présence de carbonates dans le milieu réactionnel a été étudiée au sein de l'équipe MaNaPI suite à des problèmes de reproductibilité des synthèses de nanotubes de titanates par traitement hydrothermal. D'après ces travaux, la carbonatation naturelle de la solution de soude, due à l'ancienneté des pastilles de NaOH utilisées, favoriserait la formation des nanotubes. Une carbonatation forcée du milieu alcalin par ajout de CaCO₃ permettrait même de produire des nanotubes plus longs, mieux cristallisés et en plus grande quantité. Les carbonates joueraient ainsi le rôle de catalyseur de la croissance des nanotubes (Papa 2009). Dans le cas des nanorubans de titanates, le taux de carbonatation naturelle de la solution de soude influe également sur la morphologie des particules formées. Lors de l'utilisation de pastilles de soude neuves, la proportion de sous produits de synthèse non désirés est estimée à 20% en rapport de surface (annexe 4). Cette proportion est divisée par deux lorsque des pastilles de sodes plus anciennes sont utilisées lors du traitement hydrothermal (figure 23). La carbonatation naturelle du milieu alcalin favorise ainsi la formation des nanorubans de titanates. Des études complémentaires devront cependant être réalisées pour quantifier le taux de carbonatation naturelle des pastilles de soude dites anciennes et pour évaluer l'impact d'une carbonatation forcée sur les propriétés morphologiques, structurales et chimiques des nanorubans. Par la suite, seules des pastilles de soude « aérées » provenant de pots ayant été ouverts depuis plusieurs mois seront utilisées.

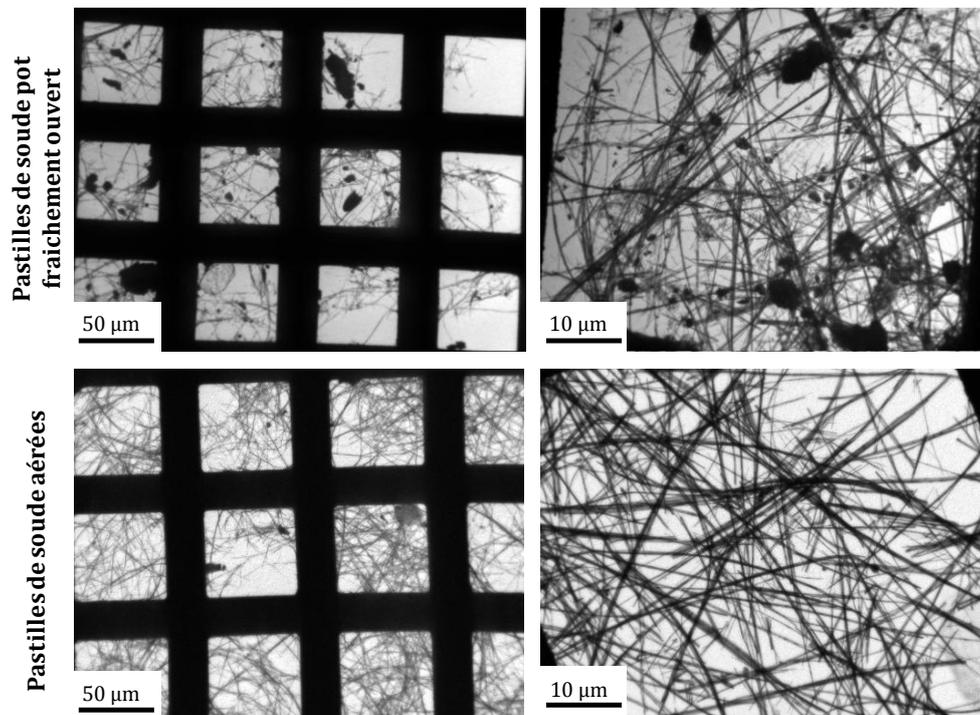


Figure 23 : Clichés MET des nanorubans synthétisés par traitement hydrothermal (440 mg TiO_2 P25, 110 mL solution de soude 10M, étape de sonication, 180°C , 20h, 7 bar, $150 \text{ tours}\cdot\text{min}^{-1}$) à partir de pastilles de sodes provenant d'un pot fraîchement ouvert ou au contraire d'un pot aéré depuis plusieurs semaines.

I.3 Etude de l'influence des différents paramètres de synthèse sur l'obtention des nanorubans de titanates

Lors de la synthèse de nanorubans de titanates par traitement hydrothermal, il est possible de faire varier un grand nombre de paramètres de réaction. L'influence d'un traitement préalable aux ultrasons des réactifs ainsi que l'impact de la température, du temps de réaction et de la vitesse d'agitation sur l'obtention des nanorubans peuvent alors être évalués. L'influence du mode de refroidissement et de lavage des nanorubans de titanates a également été étudiée.

I.3.1 Une étape de sonication aux ultrasons des réactifs : atout ou frein à la formation des nanorubans ?

Il est fréquent de voir dans la littérature qu'un pré-traitement par sonication des réactifs est effectué avant la synthèse de nanorubans d'oxydes de titane par voie hydrothermale (Yu *et al.* 2005). Cette technique permet de dissocier les agglomérats du précurseur de TiO_2 et de le disperser de façon homogène dans la solution de soude de façon à augmenter la zone de contact entre les deux réactifs (figure 24).

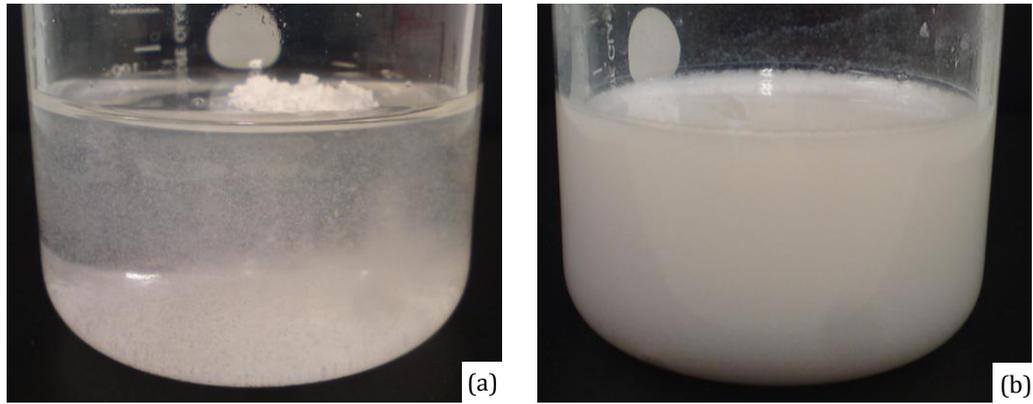


Figure 24 : Photos du précurseur de TiO_2 et de la solution de soude (a) non soniqués et (b) avec une étape de sonication à la canne à ultrasons (30 min, pulses de 2 sec, puissance 375 W).

En plus d'optimiser la dispersion, le traitement par ultrasons permettrait de casser les liaisons Ti-O-Ti du précurseur et favoriserait l'intercalation d'ions Na^+ dans la structure de l'oxyde de titane. Cela créerait des sites de germination permettant d'amorcer la formation des nanostructures (Torrente-Murciano *et al.* 2009). Il a également été démontré, dans le cas d'une synthèse de nanotubes d'oxydes de titane par voie hydrothermale, qu'un traitement de 30 minutes à la canne à ultrasons permet de réduire le temps de réaction de 36h à 24h (Zhu *et al.* 2001) et d'augmenter la longueur des tubes (figure 25) (Viriya-Empikul *et al.* 2008).

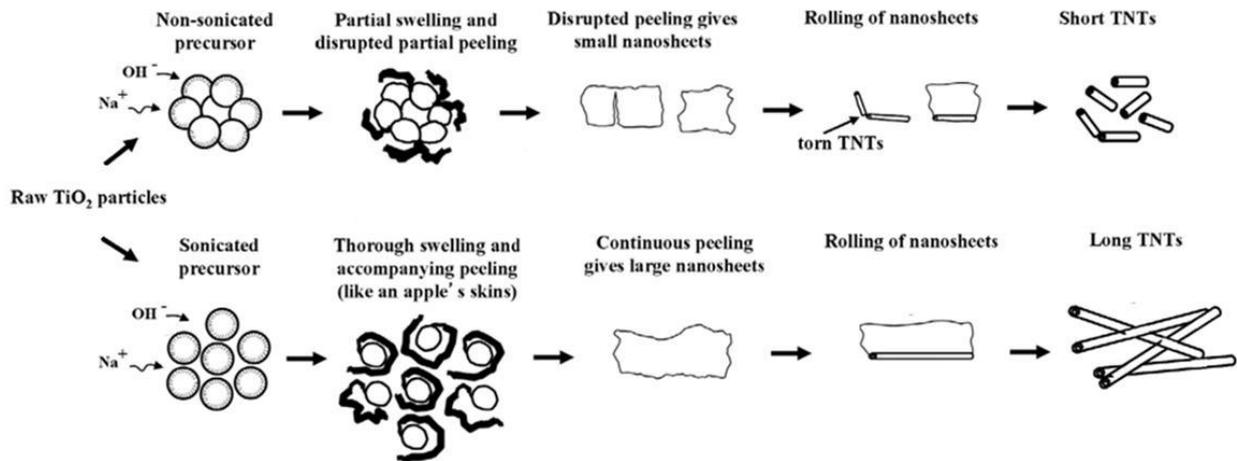


Figure 25 : Schéma expliquant l'impact d'un pré-traitement aux ultrasons sur la longueur des nanotubes d'oxydes de titane d'après (Viriya-Empikul *et al.* 2008).

Il semble donc qu'un traitement aux ultrasons influe énormément sur la synthèse des différentes formes de titanates par traitement hydrothermal. Pour tester l'influence de ce pré-traitement sur la formation de nanorubans de titanates, deux synthèses ont été réalisées (protocole 2) : l'une avec un traitement par sonication de 30 minutes, par pulses de 2 secondes et à une puissance de 375 Watt, et l'autre sans traitement aux ultrasons.

Les différentes analyses réalisées indiquent qu'une étape de sonication des réactifs influe sur la morphologie des nanorubans synthétisés. En effet, d'après les observations MET (figure 26), les dimensions des nanorubans sont profondément modifiées par un traitement aux

ultrasons. Sans étape de sonication, les nanorubans présentent des dimensions plus hétérogènes. Leur largeur est comprise dans une large gamme allant de 20 à 400 nm et leur longueur varie d'une centaine de nanomètres à plusieurs dizaines de micromètres. En revanche, avec une étape de sonication, les nanorubans présentent des dimensions plus homogènes. Leur largeur ne varie plus que de 100 à 200 nm et leur longueur atteint plusieurs dizaines de micromètres.

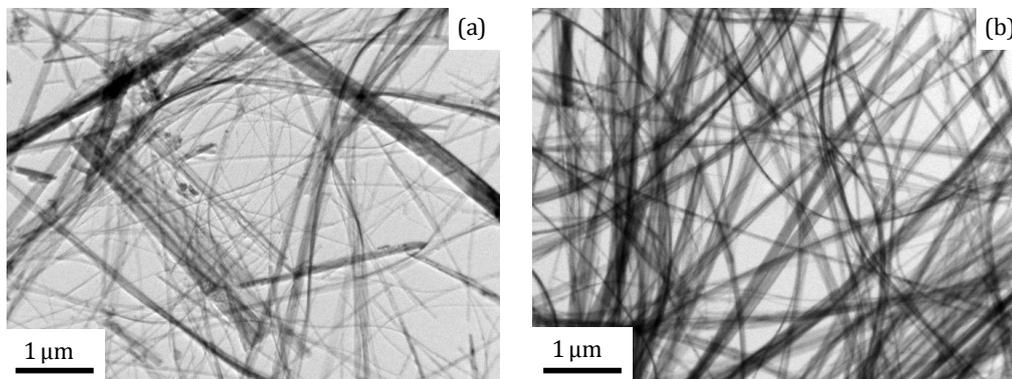


Figure 26 : Clichés MET des nanorubans synthétisés par traitement hydrothermal (440 mg TiO_2 P25, 110 mL solution de soude 10M, 180°C, 20h, 7 bar, 150 tours. min^{-1}) (a) sans et (b) avec une étape de sonication à la canne à ultrasons.

D'après les analyses DRX (figure 27), l'allure générale des diffractogrammes coïncide avec la signature des nanorubans présentant une structure proche de $\text{Na}_y\text{H}_{2-y}\text{Ti}_n\text{O}_{2n+1} \cdot x\text{H}_2\text{O}$. Cependant, sans étape de sonication, les deux premiers pics caractéristiques sont situés à $d = 1,02$ et $0,76 \pm 0,01$ nm alors qu'avec un traitement aux ultrasons, ces pics se situent à $d = 1,05$ et $0,80 \pm 0,01$ nm. Ce décalage implique une augmentation de la distance interréticulaire entre les plans atomiques constituant les nanorubans lorsqu'ils sont synthétisés avec une étape de sonication. Cette augmentation pourrait s'expliquer par le fait qu'un traitement aux ultrasons favorise l'intercalation d'ions Na^+ entre les plans atomiques constituant la structure des nanorubans tel que prétendu dans la littérature (Torrente-Murciano *et al.* 2009).

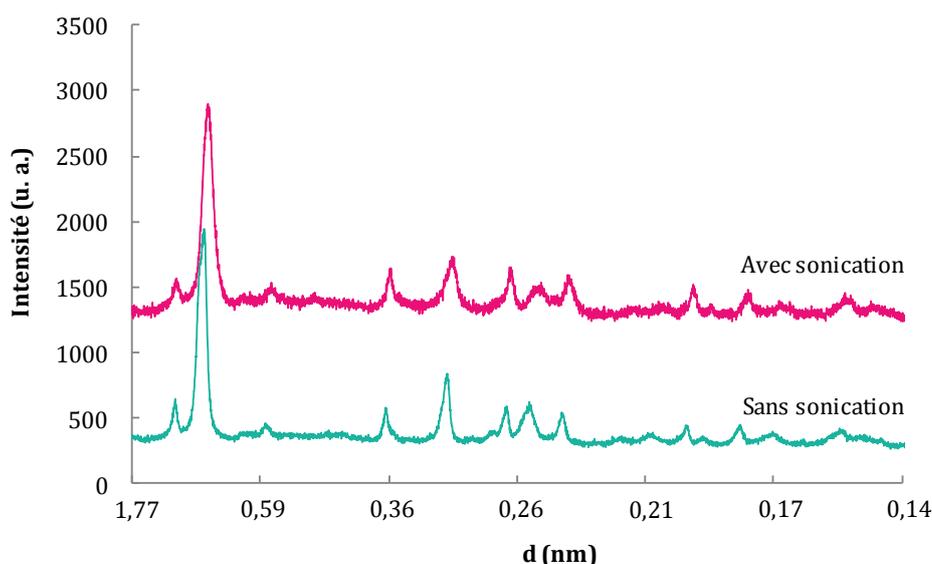


Figure 27 : Diffractogrammes des nanorubans synthétisés par traitement hydrothermal (440 mg TiO_2 P25, 110 mL solution de soude 10M, 180°C, 20h, 7 bar, 150 tours. min^{-1}) avec et sans étape de sonication.

L'étude de la composition chimique des nanorubans par XPS (tableau 8), indique que la proportion d'atomes de sodium est en effet quasiment trois fois plus importante lorsqu'une étape de sonication est appliquée. Cela confirme qu'un traitement aux ultrasons favorise l'intercalation d'ions Na⁺ dans la structure des nanorubans. Les teneurs en atomes de titane, d'oxygène et de carbone restent quant à elles très proches avec ou sans sonication. Les différentes contributions des atomes d'oxygène et de carbone (annexe 3) restent également semblables avec ou sans traitement aux ultrasons.

	Carbone (± 1%)	Sodium (± 1%)	Oxygène (± 1%)	Titane (± 1%)	Na ⁺ /Ti ⁴⁺	O ²⁻ /Ti ⁴⁺
Sans sonication	24	4	57	15	0,27	2,33
Avec sonication	20	11	55	14	0,79	2,36

	C-C et C-H (± 1%)	C-O (± 1%)	C=O et O-C=O (± 1%)	O ²⁻ (± 1%)	OH· et C=O (± 1%)	H ₂ O et C-O (± 1%)	Na _{Auger} (± 1%)
Sans sonication	14	8	2	35	15	6	1
Avec sonication	13	7	2	33	13	4	5

Tableau 8 : Proportion atomique XPS des différents éléments chimiques constituant les nanorubans synthétisés par traitement hydrothermal (440 mg TiO₂ P25, 110 mL solution de soude 10M, 20h, 180°C, 7 bar, 150 tours.min⁻¹) avec et sans étape de sonication.

Une étape de sonication est nécessaire à la synthèse de nanorubans de titanates par traitement hydrothermal. Ce traitement aux ultrasons offre notamment l'avantage de former des nanorubans présentant des dimensions homogènes. Il conduit par ailleurs à des titanates riches en sodium.

I.3.2 La température de réaction : un paramètre clé

D'après la littérature, la température du traitement hydrothermal est un paramètre qui influe énormément sur la morphologie des nanostructures. En effet, une température aux alentours de 150°C serait idéale pour synthétiser des nanotubes d'oxydes de titane alors que des températures plus élevées, comprise entre 180 et 220°C, permettrait la formation de nanorubans (Yuan *et al.* 2004, Lan *et al.* 2004, Pavasupree *et al.* 2005). Pour confirmer ou non cette tendance, deux températures ont été testées pour la synthèse des nanorubans (protocole 2) : 150°C et 180°C. Le réacteur du laboratoire ayant une limite de pression interne de 15 bar, il est alors impossible de tester une température de réaction supérieure à 180°C.

Les clichés MET (figure 28) montrent que la synthèse, réalisée à 150°C, a abouti à la formation de nanotubes. Malgré la présence de quelques nanorubans, la morphologie tubulaire est largement majoritaire puisqu'elle correspond en rapport surfacique à environ à 80% des nanostructures formées. Les nanotubes, organisés sous forme d'agglomérats, présentent une longueur moyenne de 150 nm, un diamètre externe autour de 10 nm et une cavité interne comprise entre 3 et 4 nm.

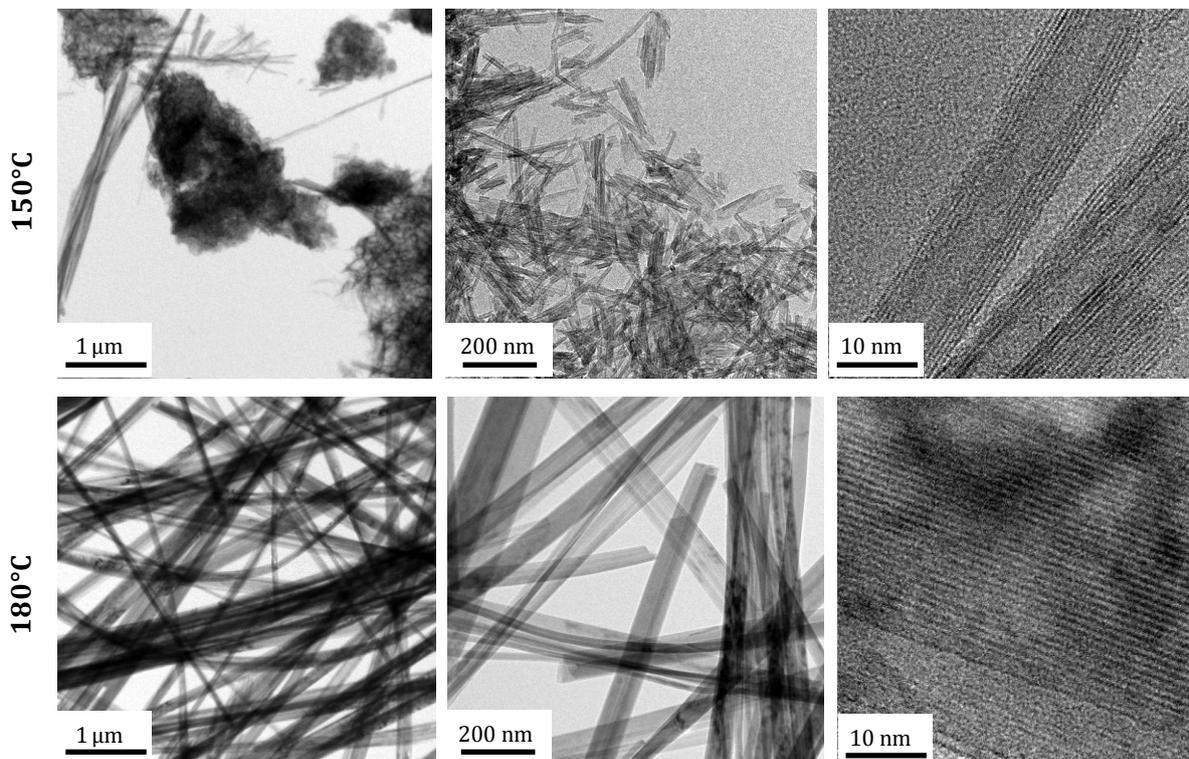


Figure 28 : Clichés MET des nanoparticules synthétisées par traitement hydrothermal (440 mg TiO_2 P25, 110 mL solution de soude 10M, étape de sonication (30 min, 375 W), 20h, 3 à 7 bar, 150 tours. min^{-1}) à une température de 150°C et de 180°C.

En revanche, pour un traitement hydrothermal à une température de 180°C, les nanoparticules obtenues présentent une morphologie totalement différente : la synthèse a conduit à la formation de nanorubans. Ces nanorubans présentent la particularité de s'organiser en formant un réseau 3D. Au niveau de leurs dimensions, comme déjà indiqué précédemment, leur largeur est comprise entre 100 et 200 nm et leur longueur atteint plusieurs dizaine de micromètres (figure 29).

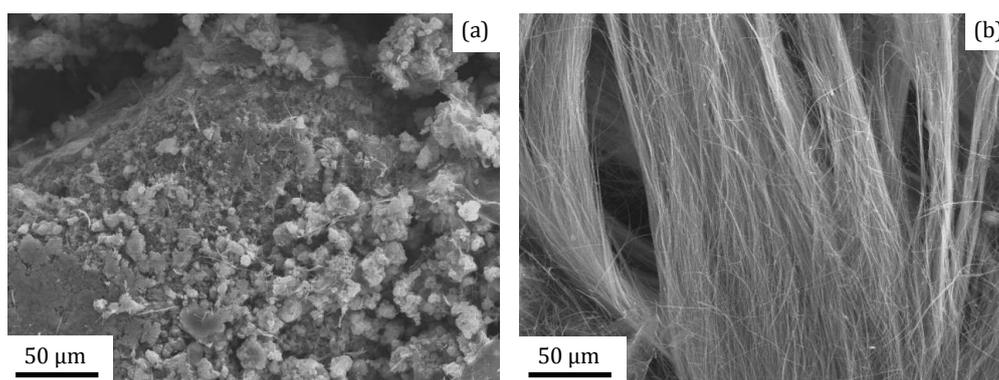


Figure 29 : Clichés MEB des nanoparticules synthétisées par traitement hydrothermal (440 mg TiO_2 P25, 110 mL solution de soude 10M, étape de sonication (30 min), 20h, 3 à 7 bar, 150 tours. min^{-1}) à une température (a) de 150°C (b) et de 180°C.

D'après les analyses DRX (figure 30), la variation de la température du traitement hydrothermal influe également sur la structure des nanoparticules synthétisées.

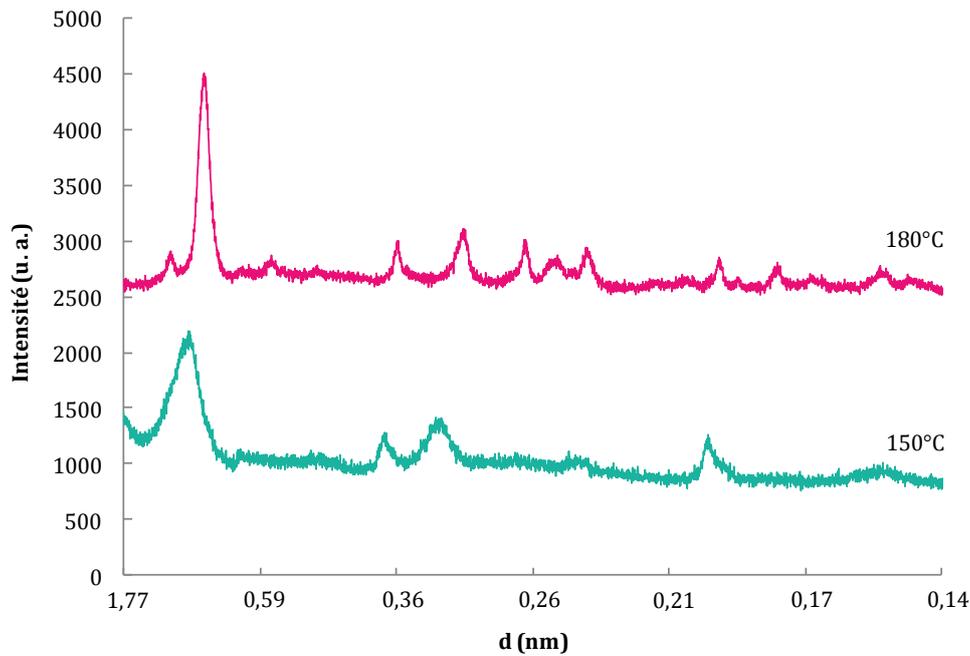


Figure 30 : Diffractogrammes des nanoparticules synthétisées par traitement hydrothermal (440 mg TiO_2 P25, 110 mL solution de soude 10M, étape de sonication (30 min, 375 W), 20h, 3 à 7 bar, 150 tours. min^{-1}) à une température de 150°C et de 180°C.

A une température de réaction de 150°C, le diffractogramme présente quatre pics caractéristiques. Ces pics, situés à $d = 0,95$; $0,37$; $0,32$ et $0,19 \pm 0,01$ nm, ainsi que l'allure générale du diffractogramme correspondent à la signature des nanotubes (Torrente-Murciano *et al.* 2009, Papa *et al.* 2009). Ainsi, la position du premier pic caractéristique calculé à partir de la loi de Bragg représente la distance entre deux plans atomiques formant les parois des nanotubes. Cette distance ($d = 0,95 \pm 0,01$ nm) ne coïncide pas avec celle mesurée sur les clichés MET haute résolution ($d = 0,76 \pm 0,02$ nm) ni avec les valeurs trouvées dans la littérature (Sun *et al.* 2003, Bavykin *et al.* 2005, Wu *et al.* 2005, Khan *et al.* 2006). Pour expliquer cette différence, une désommission du premier pic a été réalisée à l'aide du logiciel Fityk (figure 31).

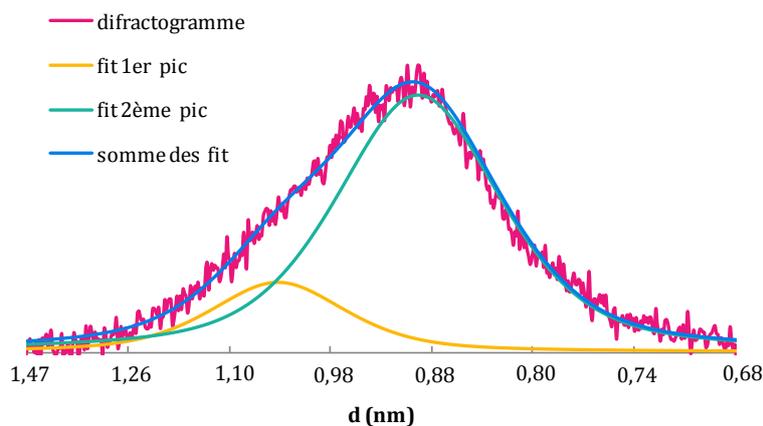


Figure 31 : Désommission du 1^{er} pic caractéristique du diffractogramme des nanoparticules synthétisées par traitement hydrothermal (440 mg TiO_2 P25, 110 mL solution de soude 10M, étape de sonication (30 min, 375 W), 20h, 3 à 7 bar, 150 tours. min^{-1}) à une température de 150°C et en utilisant des fonctions pseudo-Voigt.

Les résultats montrent que ce pic est en réalité composé de deux contributions ce qui confirme que plusieurs morphologies ont été synthétisées. La première contribution, située à $d = 1,04 \pm 0,01$ nm correspondrait aux nanofeuilles (Takezawa *et al.* 2006, Papa *et al.* 2009, Nakagawa *et al.* 2011) et la seconde, située à $d = 0,90 \pm 0,01$ nm peut être attribuée aux nanotubes, la morphologie majoritaire. Une fois de plus, la distance interréticulaire des parois des nanotubes ne coïncide pas avec les données bibliographiques. Cet écart peut sans doute s'expliquer par l'intercalation de molécules d'eau lors de l'enroulement en spirale des feuilles de titanates entraînant la formation des nanotubes (figure 32). La présence des molécules d'eau augmente ainsi la distance inter-parois. Lorsque les nanotubes subissent un traitement thermique (200-300°C) ou lorsqu'ils sont placés sous des conditions de vide poussé nécessaires à des observations MET, les molécules d'eau sont en partie éliminées. La distance interréticulaire des parois des tubes se réduit alors à des valeurs avoisinant les 0,75 nm. En revanche, lorsque les nanotubes ne subissent ni traitement thermique, ni vide poussé, ils présentent des distances interparois proche de 0,9 nm (Suzuki *et al.* 2004), ce qui expliquerait les différences observées entre MEB et DRX.

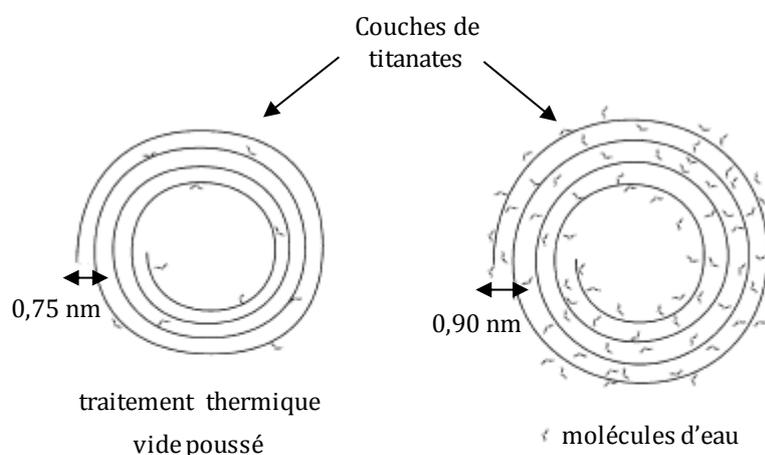


Figure 32 : Schéma de la section transverse de nanotubes d'oxydes de titanes présentant une distance interréticulaire de 0,75 nm lorsqu'ils ont été traités thermiquement où lorsqu'ils sont sous des conditions de vide nécessaires aux observations MET, ainsi que des nanotubes présentant une distance interréticulaire de 0,9 nm en sortie de traitement hydrothermal d'après (Suzuki *et al.* 2004).

Le diffractogramme de la synthèse réalisée à 180°C, déjà présentée figures 14, 20 et 26, correspond à la signature des nanorubans (Zhu *et al.* 2007).

Des analyses complémentaires, réalisées en spectroscopie Raman, confirment les résultats précédents (figure 33).

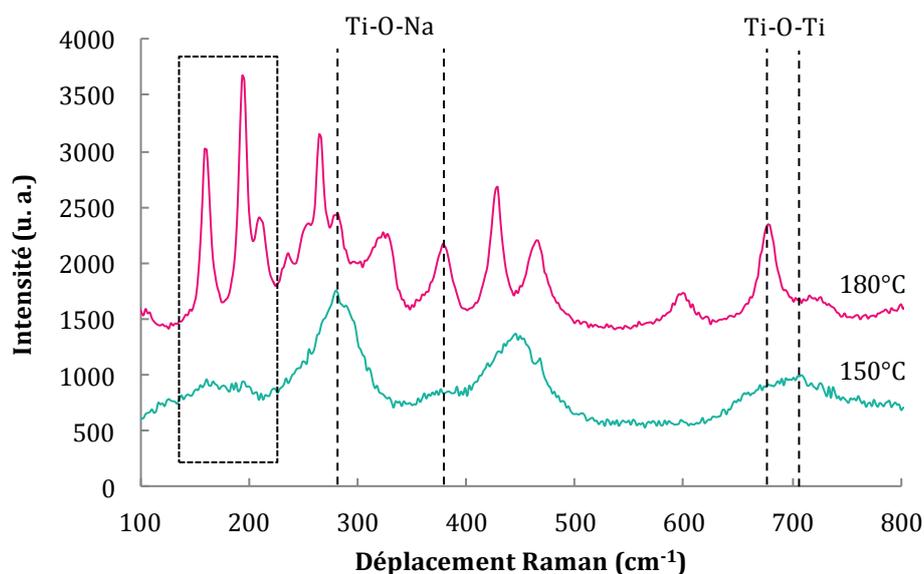


Figure 33 : Spectres Raman des nanoparticules synthétisées par traitement hydrothermal (440 mg TiO_2 P25, 110 mL solution de soude 10M, étape de sonication (30 min, 375 W), 20h, 3 à 7 bar, 150 tours.min⁻¹) à une température de 150°C et de 180°C.

Pour la synthèse réalisée à 150°C, l'allure générale du spectre et la position des pics correspondent à la signature des nanotubes. En effet, les pics placés à 283, 451 et 700 cm^{-1} sont caractéristiques de la morphologie tubulaire (Cortes-Jacome *et al.* 2007). Lorsque le traitement hydrothermal a été réalisé à une température de 180°C, l'allure générale du spectre est totalement différente et atteste de la présence des nanorubans tel que déjà discuté via la figure 17. Les pics caractéristiques des vibrations des liaisons Ti-O-Na et Ti-O-Ti situés à 280, 375 et 672 cm^{-1} se retrouvent dans la signature des nanorubans et des nanotubes.

Malgré d'importantes différences de morphologie et de structure, les nanotubes synthétisés à 150°C et les nanorubans synthétisés à 180°C, présentent une composition chimique globale semblable (tableau 9). Leur composition chimique, déterminée par XPS, est également proche de celle du précurseur de TiO_2 de type P25 utilisé pour les synthétiser. Cependant, dans le cas des nanotubes et des nanorubans, la proportion de titane est moins importante alors que la teneur en sodium devient notable. Malgré des compositions chimiques globales très proches, pour la synthèse réalisée à 180°C, la désomation du niveau 1s de l'oxygène (annexe 3) indique que la participation des atomes d'oxygène aux groupements hydroxyle est deux fois supérieure à celle obtenue pour une synthèse réalisée à 150°C et à celle du précurseur TiO_2 . Cela laisse penser que les nanorubans seraient plus facilement fonctionnalisables que les nanotubes et les sphères de TiO_2 car ils présentent un plus grand nombre d'hydroxyles en leur surface. Ce point sera repris au cours du deuxième chapitre de cette thèse. Cette particularité est très importante car la présence de ces groupements OH^- va permettre de combiner par la suite, les nanorubans avec des molécules biologiques.

	Carbone (± 1%)	Sodium (± 1%)	Oxygène (± 1%)	Titane (± 1%)	Na ⁺ /Ti ⁴⁺	O ²⁻ /Ti ⁴⁺	OH ⁻ /Ti ⁴⁺
TiO ₂ P25	23	-	56	21	-	2,29	0,38
Tubes 150°C	21	7	56	16	0,44	2,5	0,56
Rubans 180°C	22	8	55	16	0,5	2,06	1

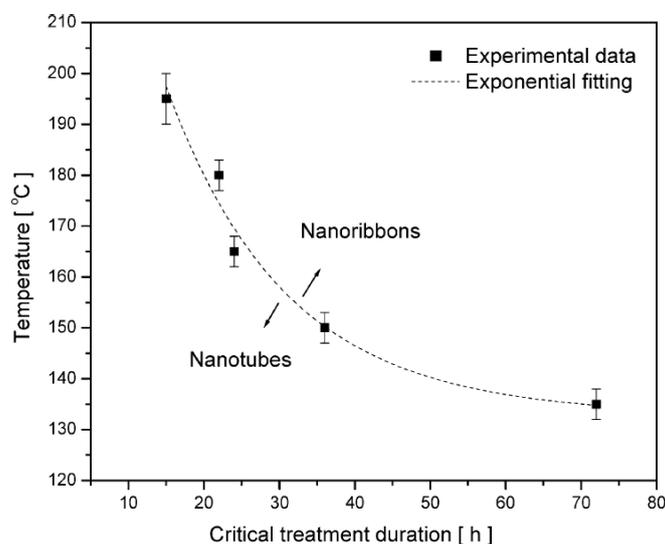
	C-C et C-H (± 1%)	C-O (± 1%)	C=O et O-C=O (± 1%)	O ²⁻ (± 1%)	OH ⁻ et C=O (± 1%)	H ₂ O et C-O (± 1%)	Na _{Auger} (± 1%)
TiO ₂ P25	19	3	1	48	8	-	-
Tubes 150°C	14	5	2	40	9	4	3
Rubans 180°C	13	6	3	31	16	6	2

Tableau 9 : Proportion atomique XPS des différents éléments chimiques constituant les nanoparticules synthétisées par traitement hydrothermal (440 mg TiO₂ P25, 110 mL solution de soude 10M, étape de sonication (30 min, 375 W), 20h, 3 à 7 bar, 150 tours.min⁻¹) à une température de 150°C et de 180°C.

La température est un paramètre clé du traitement hydrothermal car il influe énormément sur la morphologie, la structure et la composition chimique des nanoparticules synthétisées. Les différentes analyses réalisées montrent qu'une température de 180°C est nécessaire à l'obtention des nanorubans de titanates.

I.3.3 Effet du temps de réaction : sur les traces du mécanisme de formation des nanorubans

D'après certaines études, la durée du traitement hydrothermal est un paramètre essentiel à maîtriser pour avoir un contrôle sur la morphologie des nanoparticules synthétisées (Yuan *et al.* 2004, Horvath *et al.* 2007, Peng *et al.* 2009). En effet, à une température de 180°C, un traitement hydrothermal d'une durée inférieure à 20h conduirait à la formation de nanotubes alors qu'une durée supérieure à 20h serait nécessaire pour l'obtention de nanorubans (figure 34) (Elsanousi *et al.* 2007). Cette étude très intéressante porte cependant peu d'attention aux mécanismes de transformation des nanotubes en nanorubans.

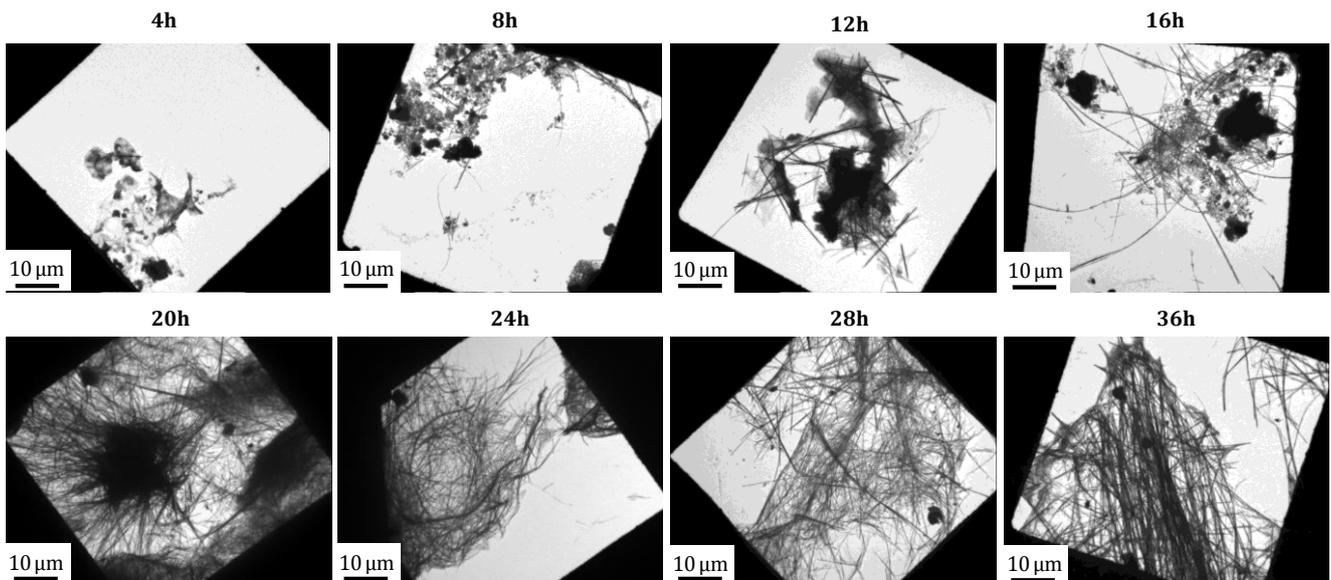


Temps	Température	Morphologie	Largeur	longueur
5h-15h	180°C	Tubes	10 nm	~ 100 nm
22h	180°C	Tubes + Rubans	10 nm 50 à 200 nm	~ 100 nm Quelques μm
48h	180°C	Rubans	50 à 500 nm	Plusieurs μm
72h	180°C	Rubans	50 à 500 nm	Dizaine de μm

Figure 34 : Diagramme présentant la température et le temps nécessaires à l'obtention de nanotubes et de nanorubans par traitement hydrothermal et tableau récapitulatif des différentes morphologies obtenues et de leurs dimensions d'après (Elsanousi *et al.* 2007).

Pour vérifier l'influence de la durée du traitement hydrothermal sur la morphologie des nanoparticules synthétisées et pour avoir une idée du mécanisme de formation des nanorubans de titanates, huit synthèses ont été réalisées (protocole 2) pour différentes durées variant de 4h à 36h.

Les observations MET de ces huit synthèses (figure 35) montrent qu'après 4h de traitement hydrothermal, la synthèse conduit à la formation de nanotubes. Leur longueur est comprise entre 50 et 200 nm et leur diamètre externe avoisine les 10 nm. Contrairement aux données bibliographiques, quelques nanorubans très fins, d'une largeur proche de 50 nm, sont déjà présents dans le produit de synthèse mais leur proportion est largement minoritaire puisqu'elle ne dépasse pas les 10% en rapport de surface. Après 8h de réaction, la morphologie majoritairement synthétisée est toujours les nanotubes. Cependant, la part de nanorubans présente dans le produit de synthèse est de plus en plus importante puisqu'elle dépasse les 30% en rapport surfacique. De plus, les dimensions des nanorubans sont plus imposantes puisque leur largeur est proche de 150 nm. Après 12h de traitement, les nanorubans deviennent la morphologie synthétisée en majorité. Ils présentent des dimensions hétérogènes puisque leur largeur est comprise entre 50 et 200 nm et leur longueur varie de 500 nm à quelques micromètres. Quelques nanotubes sont encore présents dans le produit de synthèse mais leur proportion n'excède pas les 20%.



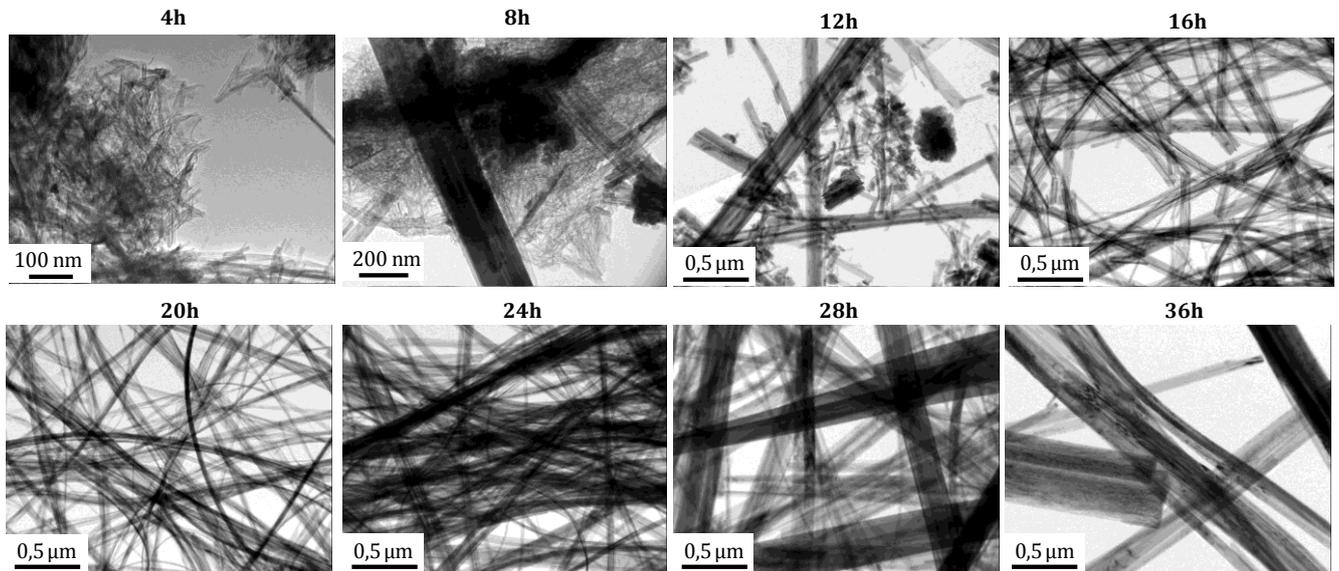


Figure 35 : Clichés MET des nanoparticules synthétisées par traitement hydrothermal (440 mg TiO_2 P25, 110 mL solution de soude 10M, étape de sonication (30 min, 375 W), 180°C , 7 bar, $150 \text{ tours}\cdot\text{min}^{-1}$) durant différents temps de réaction variant de 4h à 36h.

Pour une durée de 16h à 36h, les nanorubans sont la seule morphologie synthétisée. Après 16h de réaction, les nanorubans présentent une longueur variant de quelques micromètres à plus d'une dizaine de micromètres et une largeur comprise entre 50 et 200 nm. Avec un traitement hydrothermal de 20h et 24h, les dimensions des nanorubans deviennent homogènes. Leur largeur ne varie plus que de 100 à 200 nm et leur longueur atteint plusieurs dizaine de micromètres. Après 28h et 36h de traitement, la longueur des nanorubans atteint toujours plusieurs dizaine de micromètres mais leur largeur augmente puisqu'elle est comprise entre 100 et 600 nm. Cette augmentation pourrait s'expliquer par le fait que les nanorubans ont tendance avec le temps à se juxtaposer les uns à cotés des autres pour former de plus gros rubans (figure 36).

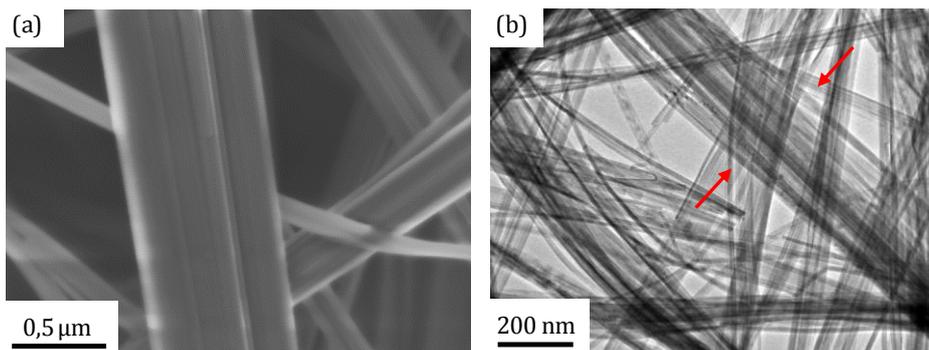
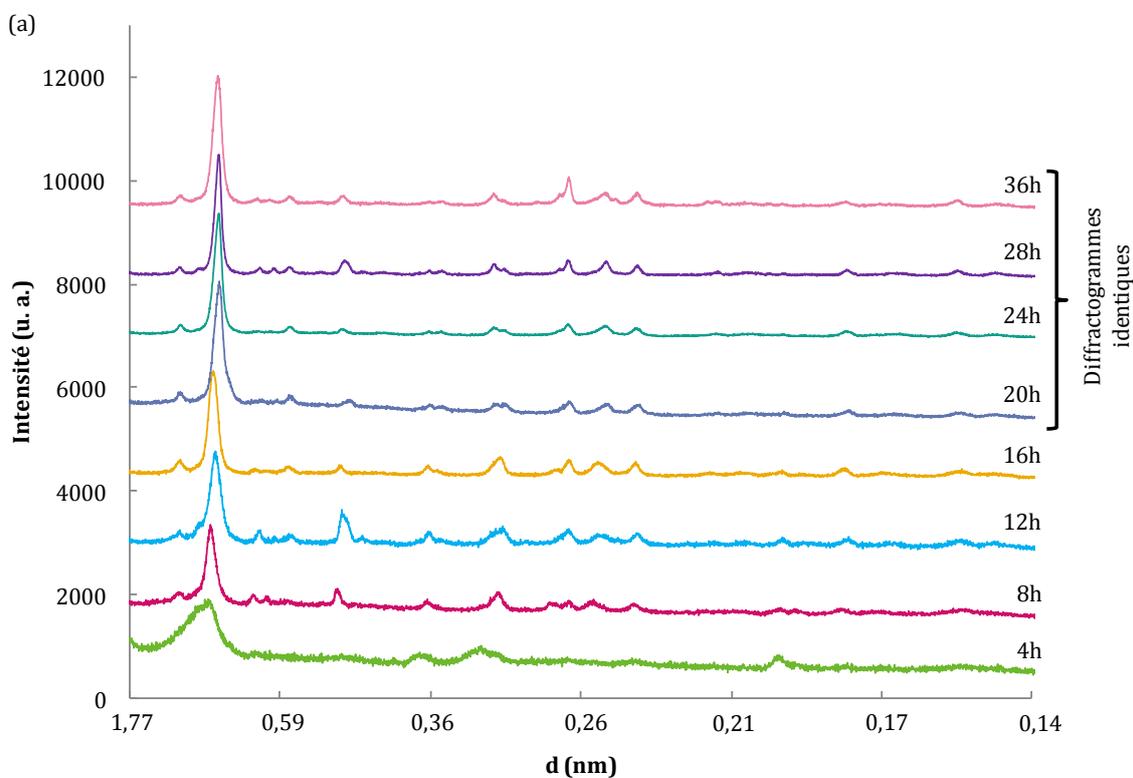


Figure 36 : Clichés (a) MEB et (b) MET illustrant la juxtaposition des nanorubans pour former une nanostructure plus large (440 mg TiO_2 P25, 110 mL solution de soude 10M, étape de sonication (30 min, 375 W), 180°C , 20h, 7 bar, $150 \text{ tours}\cdot\text{min}^{-1}$).

Toutes ces observations vont à l'encontre de la « théorie de l'enroulement » qui affirme que les nanorubans sont la première morphologie à se former lors d'un traitement hydrothermal et qu'ensuite, ils s'enroulent pour former des nanotubes (Liu *et al.* 2011). Dans notre cas, l'inverse se produit : les nanotubes se forment en premier et les nanorubans en second.

Les analyses réalisées en DRX et en spectroscopie Raman apportent des résultats assez difficiles à interpréter. D'après les observations MET, la morphologie des nanoparticules synthétisées varie énormément au cours du temps (figure 35). Or, il est difficile de visualiser des changements morphologiques par DRX et spectroscopie Raman. En effet, ses techniques sont plus appropriées pour illustrer les variations d'environnement autour d'un atome. Cependant, il est tout de même possible de confirmer certains points mis en avant par les observations microscopiques. Après 4h de réaction, le diffractogramme coïncide avec la signature des nanotubes puisque les quatre pics caractéristiques de la morphologie tubulaire sont présents ($d = 0,92 ; 0,37 ; 0,32$ et $0,19 \pm 0,01$ nm) (figure 37a). De même pour la spectroscopie Raman, l'allure générale du spectre et la position des pics caractéristiques ($283, 451$ et 700 cm^{-1}) correspondent à la signature des nanotubes (figure 37b). De 8h à 16h de réaction, bien que les observations MET indiquent que le produit de synthèse se compose d'un mélange de tube et de rubans, seule la signature des nanorubans est présente en DRX et spectroscopie Raman (figures 37a et b). Cela s'explique par le fait que la signature des tubes se compose de pics larges et faiblement intenses illustrant une structure peu ordonnée induite par un enroulement irrégulier des nanofeuillets. En revanche, la signature des rubans se compose de pics fins et intenses illustrant une structure ordonnée et homogène. Ils sont donc plus facilement visibles par ces deux techniques. Cependant, entre 8h et 16h de réaction, les pics caractéristiques de la morphologie des rubans ne sont pas clairement définis et une évolution de la forme des pics est notable. Cela laisse penser que la structure des nanorubans évolue car leur croissance n'est pas terminée. A partir de 20h de réaction, les signatures DRX et Raman des nanorubans se composent de pics bien définis qui conservent leur position et leur forme jusqu'à 36h de réaction (figures 37a et b). Cela laisse supposer qu'un temps minimum de 20h est nécessaire à la synthèse de nanorubans de titanates.



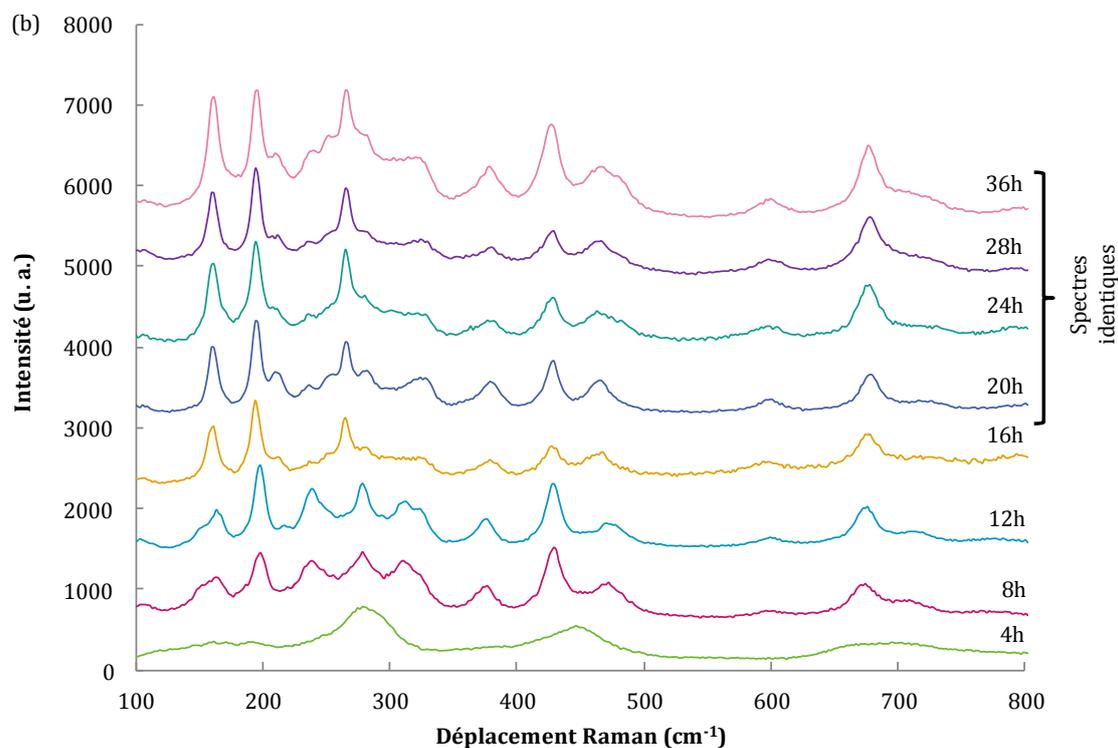


Figure 37 : (a) Diffractogrammes et (b) spectres Raman des nanoparticules synthétisées par traitement hydrothermal (440 mg TiO₂ P25, 110 mL solution de soude 10M, étape de sonication (30 min, 375 W), 180°C, 7 bar, 150 tours.min⁻¹) durant différents temps de réaction variant de 4h à 36h.

Pour expliquer le mécanisme de formation des nanorubans par traitement hydrothermal, plusieurs hypothèses sont rencontrées dans la littérature. Selon la première, les nanorubans, formés par plusieurs couches de nanofeuilles de titanates, cristalliseraient rapidement sous l'effet de la température du traitement hydrothermal (> 170°C) et deviendraient trop rigides pour s'enrouler et former des nanotubes. Les nanorubans garderaient alors leur morphologie (Yuan *et al.* 2004). Cette théorie n'est pas étayée par nos observations. En effet, les analyses MET, DRX et Raman ont montré que des nanotubes se forment en premier lors du traitement hydrothermal et qu'ils se transforment ensuite en nanorubans. Le passage de la morphologie tubulaire à la morphologie « rubans » pourrait alors s'expliquer par une ouverture des tubes suivie d'une croissance cristalline. Un phénomène similaire, responsable de la transition entre les nanotubes et les nanorubans de graphène a été expliqué par des réactions d'oxydation et d'intercalation (Dhakate *et al.* 2011, Jiao *et al.* 2011). Pour s'intéresser à ce type d'hypothèse, des analyses de composition chimique par XPS ont été réalisées (tableau 10).

	Carbone (± 1%)	Sodium (± 1%)	Oxygène (± 1%)	Titane (± 1%)	Na ⁺ /Ti ⁴⁺	O ²⁻ /Ti ⁴⁺	OH ⁻ /Ti ⁴⁺
4h	20	9	56	15	0,60	2,33	0,87
8h	20	9	58	13	0,69	2,38	1,08
12h	26	5	58	11	0,45	3,09	0,91
16h	21	8	57	14	0,57	2,64	0,86
20h	22	8	55	16	0,50	2,19	0,75
24h	25	4	58	13	0,31	2,69	0,77
28h	19	4	61	16	0,25	2,63	0,75
36h	22	5	56	17	0,29	2,18	0,72

	C-C et C-H (± 1%)	C-O (± 1%)	C=O et O-C=O (± 1%)	O ²⁻ (± 1%)	OH- et C=O (± 1%)	H ₂ O et C-O (± 1%)	Na _{Auger} (± 1%)
4h	13	6	1	35	13	6	2
8h	10	16	4	31	14	9	4
12h	10	12	4	34	10	13	1
16h	15	5	1	37	12	6	2
20h	13	7	2	35	12	7	1
24h	11	11	3	35	10	10	3
28h	13	4	2	42	12	6	1
36h	15	5	2	47	12	4	3

Tableau 10 : Proportion atomique XPS des différents éléments chimiques constituant les nanoparticules synthétisées par traitement hydrothermal (440 mg TiO₂ P25, 110 mL solution de soude 10M, étape de sonication (30 min, 375 W), 180°C, 7 bar, 150 tours.min⁻¹) pour des temps de réaction variant de 4h à 36h.

La composition chimique globale des nanoparticules synthétisées entre 4h et 36h est assez proche. Il n'y a pas de variation importante de la proportion de carbone, d'oxygène et de titane. Seule la teneur en sodium diminue au cours du temps. La désomation du niveau 1s de l'oxygène indique que la teneur en O²⁻ de réseau est stable puis augmente pour 28h et 36h de réaction. Cependant, elle ne permet pas d'expliquer l'ouverture des nanotubes par un phénomène d'oxydation.

A partir de tous ces résultats, un mécanisme de formation des nanorubans de titanates par traitement hydrothermal peut être cependant proposé (figure 39). Entre 0 et 4h de réaction, le précurseur TiO₂ de type P25 se dissoudrait dans le milieu alcalin et conduirait à la formation de nanofeuilles de titanates de sodium. Ces feuilles, sous l'effet de l'environnement chimique, s'enrouleraient ensuite pour former des nanotubes de Na_xH_{2-x}Ti₃O₇ (Bavykin *et al.* 2009) (figure 38a). Entre 8h et 12h de réaction, les différentes liaisons se rompraient rendant les nanotubes instables dans la solution alcaline. Ils se fragmenteraient alors, constatation étayée par la figure 38b notamment, et des ions Ti⁴⁺ se libéreraient dans la solution de soude. D'après les travaux réalisés par Bavykin, la présence d'ions titane libres dans le milieu alcalin conduirait à la formation de monotitanates TiO₂(OH)₂²⁻ (Bavykin *et al.* 2004). Le titane en solution agirait comme nutriment pour la formation et la croissance des nanorubans.

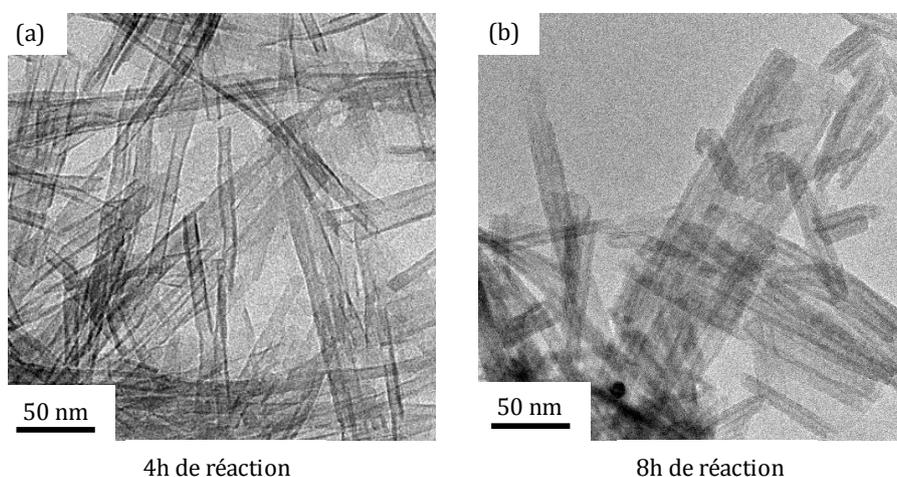


Figure 38 : Clichés MET (a) des nanotubes après 4h de réaction et (b) des fragments de nanotubes après 8h de réaction.

A partir de 12h de réaction, les fragments de nanotubes s'assembleraient pour former des liaisons Ti-O-Ti. De 16h à 36h de réaction, les nouvelles structures, beaucoup plus stables dans le milieu alcalin que les nanotubes, continueraient leur croissance et formeraient des nanorubans.

Des travaux similaires, réalisés en parallèle de cette étude par l'équipe Sheng *et al.*, ont récemment aboutit à la parution d'une publication proposant un mécanisme de formation des nanorubans de titanates très proche de celui-ci (Sheng *et al.* 2011).

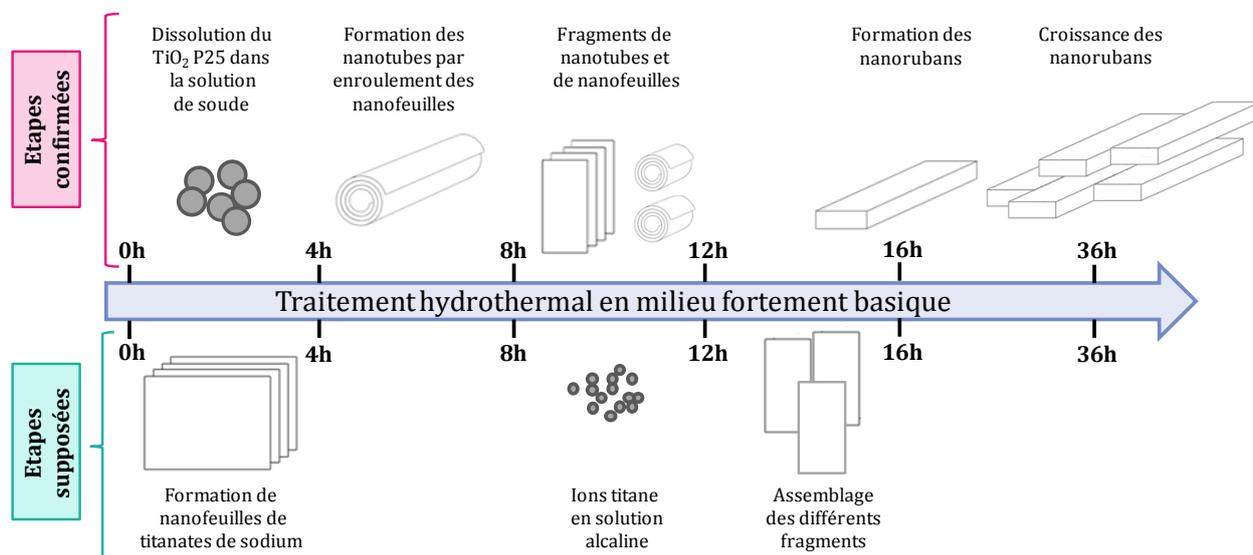


Figure 39 : Schéma des différentes étapes expliquant la formation des nanorubans par traitement hydrothermal.

Le mécanisme de formation des nanorubans de titanates proposé n'est qu'une ébauche (figure 39). Il sera donc nécessaire de l'approfondir par des analyses complémentaires. Il serait notamment judicieux de réaliser une synthèse de 2h pour confirmer la formation de nanofeuilles de titanates de sodium. De plus, pour évaluer les variations du taux d'ions Ti^{4+} en solution au cours du temps, les surnageants des différentes synthèses réalisées devront être dosés par ICP. Cela permettrait de confirmer la libération des ions titane au sein du milieu réactionnel à $t < 4h$ et $t \approx 12h$.

1.3.4 Impact de la vitesse d'agitation sur la synthèse des nanorubans de titanates

Dans les données bibliographiques, peu de détails apparaissent sur le mode et la vitesse d'agitation du milieu réactionnel lors de la synthèse de nanorubans de titanates par traitement hydrothermal. D'après certaines études, il est possible de synthétiser des nanorubans de titanates sans aucune agitation (Hong *et al.* 2003). L'application d'une faible vitesse d'agitation de $60 \text{ tours} \cdot \text{min}^{-1}$ permet également de former des nanorubans (Horvath *et al.* 2006). Une étude sur la synthèse des nanotubes d'oxydes de titane a montré que la vitesse d'agitation du milieu réactionnel influe énormément sur la morphologie des nanoparticules et particulièrement sur leurs dimensions (Kukovecz *et al.* 2005, Papa *et al.* 2009). Pour savoir si la vitesse d'agitation influe sur la synthèse des nanorubans de titanates (protocole 2), trois vitesses ont été testées : 50 , 150 et $300 \text{ tours} \cdot \text{min}^{-1}$.

Les observations MET (figure 40) indiquent que la vitesse d'agitation influe énormément sur la morphologie des nanoparticules synthétisées. A faible vitesse, la synthèse aboutit à la formation de nanorubans de dimensions très variables. Leur largeur est comprise entre 50 et 400 nm et leur longueur varie de plusieurs centaines de nanomètres à quelques dizaines de micromètres. Les nanorubans présentant de faibles dimensions (longueur et largeur) semblent être des fragments de nanorubans ou des nanorubans n'ayant pas fini leur croissance. D'autres nanoparticules, présentant une morphologie proche de celle de grains agglomérés, ont également été synthétisées dans un taux estimé à 30% en rapport de surface (annexe 4). En revanche, avec des vitesses d'agitation plus importantes de 150 tours.min⁻¹ et de 300 tours.min⁻¹, les nanorubans formés présentent des dimensions homogènes. Leur largeur est comprise entre 100 et 200 nm et leur longueur atteint plusieurs dizaines de micromètres. Cependant, pour une vitesse de 150 tours.min⁻¹ la proportion de nanoparticules non désirées n'atteint plus que 10% en rapport surfacique alors que pour une vitesse de 300 tours.min⁻¹, elle est de nouveau de 30%.

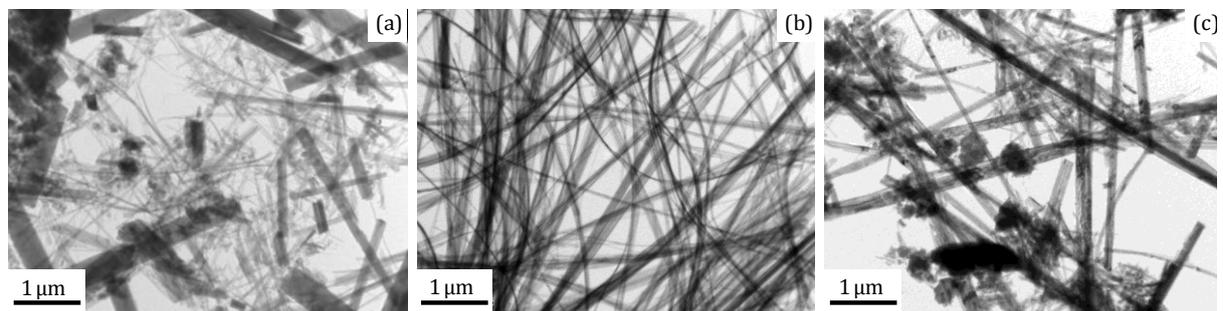


Figure 40 : Clichés MET des nanoparticules synthétisées par traitement hydrothermal (440 mg TiO₂ P25, 110 mL solution de soude 10M, étape de sonication (30 min, 375 W), 20h, 180°C, 7 bar) sous agitation mécanique de (a) 50 tours.min⁻¹, (b) 150 tours.min⁻¹ et (c) 300 tours.min⁻¹.

Des investigations menées en DRX (figure 41), indiquent que la vitesse d'agitation modifie également la structure des objets synthétisés. L'allure générale des diffractogrammes coïncide avec la signature des nanorubans. Cependant, dans le cas d'une faible vitesse d'agitation, des pics situés à $d = 1,86 ; 0,66 ; 0,62 ; 0,47$ et $0,44 \pm 0,01$ nm apparaissent. Ces pics, également présents lors de la synthèse de nanorubans de titanates à partir du précurseur anatase 5-10 nm, ne correspondent pas à du TiO₂ de phase rutile ou anatase. Ces pics, fins et intenses, peuvent alors être considérés comme la marque d'un nouvel état cristallin induit par une faible vitesse d'agitation ou un précurseur de départ anatase à grains très fins (5-10 nm). L'hypothèse de la formation d'une surstructure a déjà été envisagée paragraphe I.2.1.4.

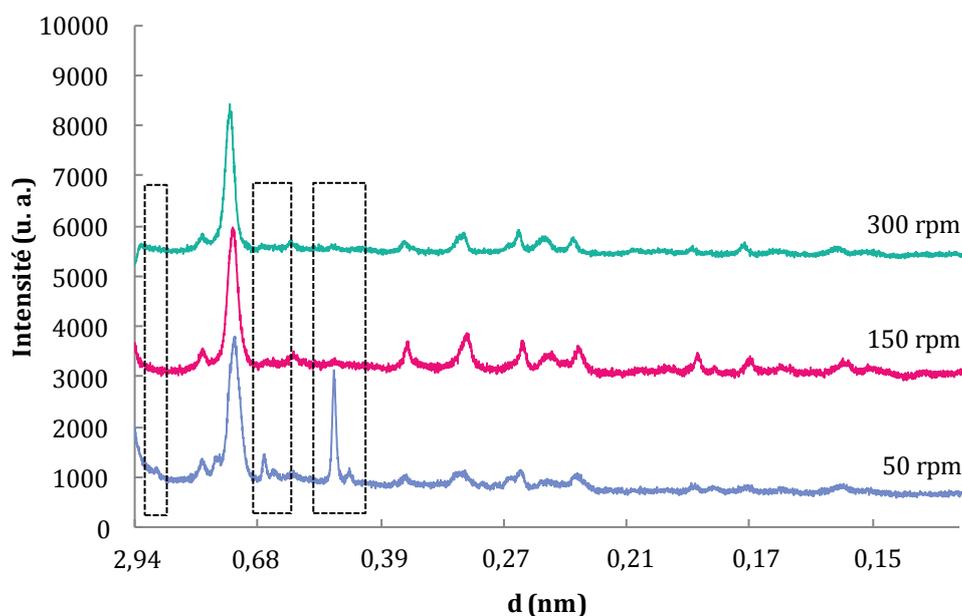


Figure 41 : Diffractogrammes des nanoparticules synthétisées par traitement hydrothermal (440 mg TiO₂ P25, 110 mL solution de soude 10M, étape de sonication, 180°C, 20h, 7 bar) sous agitation mécanique de 50, 150 et 300 tours.min⁻¹.

L'étude de la composition chimique des nanoparticules par XPS indique que la vitesse d'agitation n'a aucun impact sur la teneur en titane, en oxygène, en sodium et en carbone contenue dans les nanorubans. Les différentes contributions des atomes d'oxygène et de carbone sont également très proches quelle que soit la vitesse d'agitation appliquée lors du traitement hydrothermal.

La vitesse d'agitation du milieu réactionnel est un paramètre qui influe énormément sur la morphologie et la structure des nanorubans de titanates. A 50 tours.min⁻¹, les nanorubans présentent des dimensions hétérogènes. De plus, la synthèse aboutit à la formation d'une autre morphologie parasite sous forme de grains, de même que pour une agitation à 300 tours.min⁻¹. Une vitesse d'agitation de 150 tours.min⁻¹ est par conséquent plus appropriée.

I.3.5 Le type de refroidissement en sortie de synthèse joue-t-il un rôle important ?

L'influence du mode et du temps de refroidissement sur l'obtention des nanorubans n'a jamais été étudié. Dans certains cas, le refroidissement du précipité se fait à température ambiante pendant une durée indéterminée (Hong *et al.* 2003). Le réacteur commercial utilisé au laboratoire pour la synthèse des nanorubans de titanates est équipé d'un serpentin permettant le refroidissement forcé du milieu réactionnel par circulation d'eau froide. Ce mode de refroidissement, semblable à un système de trempe, permet de refroidir le milieu réactionnel contenu dans le réacteur en Téflon en quelques minutes. En utilisant cette option, il est possible d'étudier l'impact d'un refroidissement brutal (vitesse de refroidissement de 31°C.min⁻¹) sur la synthèse de nanorubans (protocole 2) et de le comparer à un refroidissement lent de plusieurs heures (vitesse de refroidissement de 1,3°C.min⁻¹).

Le type de refroidissement utilisé en sortie de synthèse n'a aucune influence sur la morphologie des nanoparticules (figure 42). Dans les deux cas, les nanorubans, organisés sous forme de matrice, présentent des dimensions homogènes avec une largeur comprise entre 100 et 200 nm pour une longueur de plusieurs dizaines de micromètres.

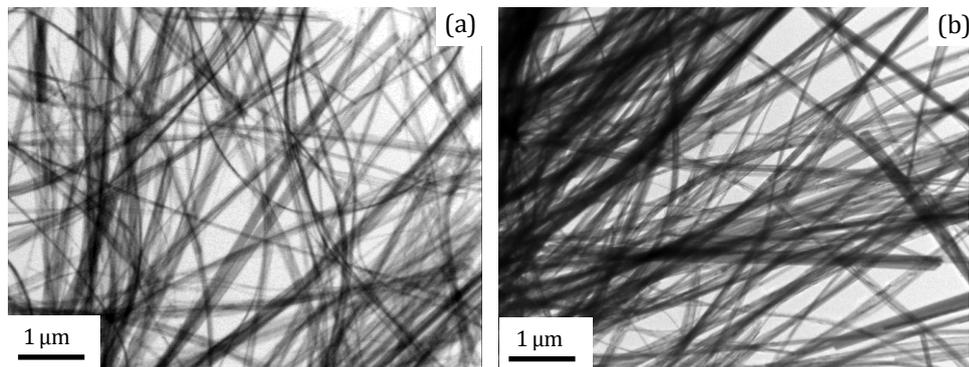


Figure 42 : Clichés MET des nanoparticules synthétisées par traitement hydrothermal (440 mg TiO_2 P25, 110 mL solution de soude 10M, étape de sonication (30 min, 375 W), 180°C , 20h, 7 bar, $150 \text{ tours}\cdot\text{min}^{-1}$) et refroidies (a) de manière lente et (b) brutale.

En revanche, la structure des nanorubans est complètement modifiée lorsqu'un refroidissement brutal est imposé. En effet, des pics situés à $d = 1,86 ; 0,66 ; 0,62 ; 0,47$ et $0,44 \pm 0,01$ nm apparaissent dans le diagramme de diffraction (figure 43). Ces pics fins et intenses, également présents lors de la synthèse de nanorubans par traitement hydrothermal d'un précurseur de TiO_2 anatase 5-10 nm et lors de l'application d'une faible vitesse d'agitation du milieu réactionnel ($50 \text{ tours}\cdot\text{min}^{-1}$), indiquent qu'un refroidissement brutal modifie considérablement la structure des nanorubans. De plus, un pic caractéristique supplémentaire à $d = 0,91 \pm 0,01$ nm apparaît. Une fois de plus, l'hypothèse de la formation d'un nouvel état cristallin ou d'une surstructure peut être envisagée.

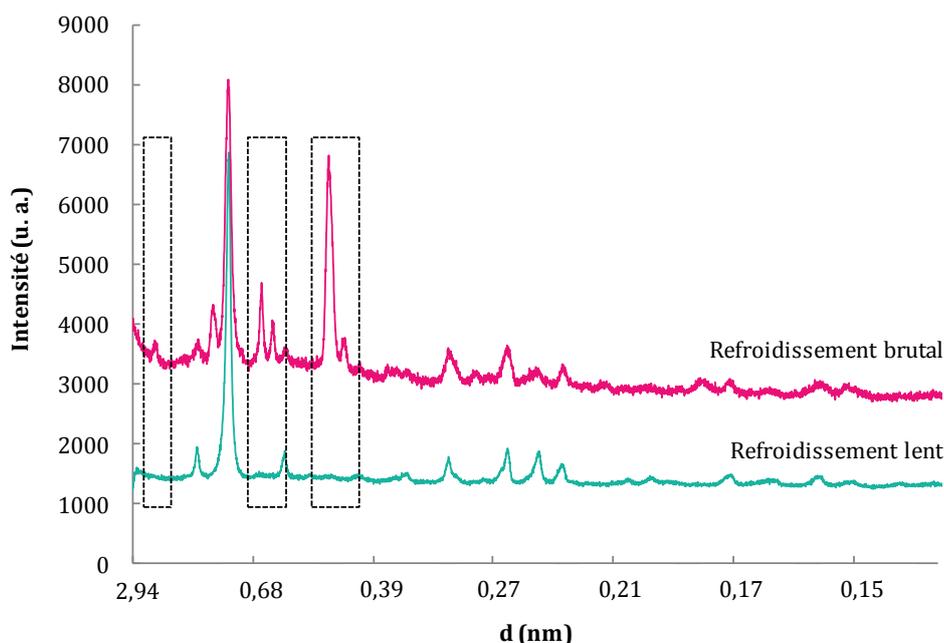


Figure 43 : Diffractogrammes des nanoparticules synthétisées par traitement hydrothermal (440 mg TiO_2 P25, 110 mL solution de soude 10M, étape de sonication (30 min, 375 W), 180°C , 20h, 7 bar, $150 \text{ tours}\cdot\text{min}^{-1}$) et refroidies de manière lente et brutale.

Les analyses réalisées en spectroscopie Raman (figure 44) permettent de mieux comprendre les changements de structure induits par un refroidissement brutal. Les pics caractéristiques des liaisons Ti-O-Na situés à 280 et 375 cm^{-1} disparaissent ce qui laisse penser que la teneur en sodium des rubans est fortement diminuée par le refroidissement brutal. De plus, le pic caractéristique des liaisons Ti-O-Ti placé à 672 cm^{-1} est exacerbé laissant supposer une proportion élevée de titane dans la composition chimique des nanorubans obtenus par refroidissement brutal.

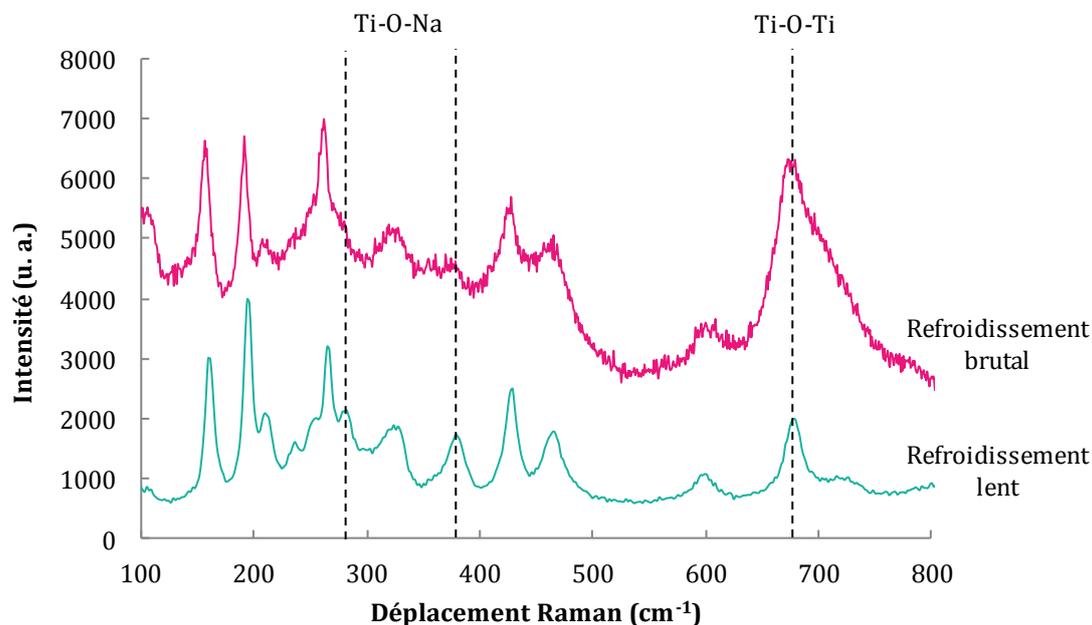


Figure 44 : Spectres Raman des nanoparticules synthétisées par traitement hydrothermal (440 mg TiO_2 P25, 110 mL solution de soude 10M, étape de sonication (30 min, 375 W), 180°C, 20h, 7 bar, 150 tours.min⁻¹) et refroidies de manière lente et brutale.

L'étude de la composition chimique des nanorubans par XPS (tableau 11) confirme ces hypothèses. Dans le cas d'un refroidissement brutal, la teneur en titane est 2 fois plus importante et celle en sodium est considérablement diminuée. Ces variations pourraient s'expliquer par le fait que les ions Ti^{4+} encore en solution auraient tendance à précipiter sous l'effet de la diminution brutale de la température du milieu réactionnel. Cette variation brusque de température pourrait également être responsable de la libération des ions Na^+ intercalés entre les plans atomiques formant la structure des rubans. Les proportions d'atomes de carbone et d'oxygène, ainsi que leurs différentes contributions, ne sont quant à elles, pas autant modifiées par un refroidissement brutal.

	Carbone ($\pm 1\%$)	Sodium ($\pm 1\%$)	Oxygène ($\pm 1\%$)	Titane ($\pm 1\%$)	$\text{Na}^+/\text{Ti}^{4+}$	$\text{O}^{2-}/\text{Ti}^{4+}$	$\text{OH}^-/\text{Ti}^{4+}$
Refroidissement brutal	18	2	49	31	0,06	1,06	0,26
Refroidissement lent	22	8	55	16	0,5	2,06	0,81

	C-C et C-H (± 1%)	C-O (± 1%)	C=O et O-C=O (± 1%)	O ²⁻ (± 1%)	OH ⁻ et C=O (± 1%)	H ₂ O et C-O (± 1%)	Na _{Auger} (± 1%)
Refroidissement brutal	8	8	2	33	8	8	-
Refroidissement lent	13	6	3	33	13	7	2

Tableau 11 : Proportion atomique XPS des différents éléments chimiques constituant les nanoparticules synthétisées par traitement hydrothermal (440 mg TiO₂ P25, 110 mL solution de soude 10M, étape de sonication (30 min, 375 W), 180°C, 20h, 7 bar, 150 tours.min⁻¹) et refroidies de manière lente et brutale.

Le mode de refroidissement appliqué au précipité en sortie de synthèse n'a aucune influence sur la morphologie des nanorubans. En revanche, leur structure et leur composition chimique sont considérablement modifiées lorsqu'un refroidissement brutal est imposé. Un refroidissement lent et naturel est recommandé pour contrôler la structure et la composition chimique des nanoparticules synthétisées.

I.3.6 Influence d'un traitement post synthèse par lavage acide sur les propriétés physico-chimique des rubans

La synthèse de nanorubans de titanates par traitement hydrothermal se déroule en milieu fortement basique. Dans le but de revenir à un pH neutre, un lavage des nanorubans par traitement acide est une étape fréquemment utilisée (Yuan *et al.* 2002, Yu *et al.* 2005, Horvath *et al.* 2007). En plus de diminuer le pH, le lavage acide permet également d'augmenter les propriétés photovoltaïques des nanorubans (Nakahira *et al.* 2010). Dans certains cas, le traitement acide favorise même la transformation des nanorubans en nanotubes (Papa. 2009). Les nanorubans de titanates synthétisés au laboratoire étant destinés à être utilisés dans le domaine biomédical, il est nécessaire de les ramener à un pH physiologique. Actuellement, le mode de lavage utilisé pour éliminer les ions Na⁺ et OH⁻ est la dialyse. Pour comparer ces techniques de lavage, deux synthèses de nanorubans de titanates ont été réalisées (protocole 2) puis les précipités formés ont été lavés par dialyse à l'eau déionisée seule ou suivie de lavages par une solution d'acide chlorhydrique à 0,1M (protocole 3).

Protocole 3

Pour réaliser un lavage acide, 200 mg de nanorubans sous forme de poudre lyophilisée ont été introduits dans un bain de 50 mL d'acide chlorhydrique de concentration 0,1 mol.L⁻¹. La suspension a été laissée 30 minutes sous agitation magnétique à 150 tours.min⁻¹ pour favoriser l'échange entre les ions Na⁺ et H⁺. Pour séparer les rubans de la solution acide, un cycle de centrifugation de 10 minutes à 15000 tours.min⁻¹ (10847 ×g) a été réalisé. Puis, les nanorubans ont été lavés plusieurs fois à l'eau déionisée par cycle de centrifugation pour revenir à un pH neutre.

Les observations MET (figure 45) montrent qu'un lavage acide ne modifie pas la morphologie des nanoparticules synthétisées. Les nanorubans obtenus en sortie de synthèse restent sous forme de nanorubans après l'étape de traitement par une solution d'acide chlorhydrique. Cependant, leurs dimensions sont modifiées. Leur largeur, comprise entre 100 et 200 nm avant le lavage acide, diminue et s'étend de 50 à 150 nm après le lavage acide. Malgré cela, le lavage acide ne semble pas avoir détérioré ni endommagé la surface des nanorubans.

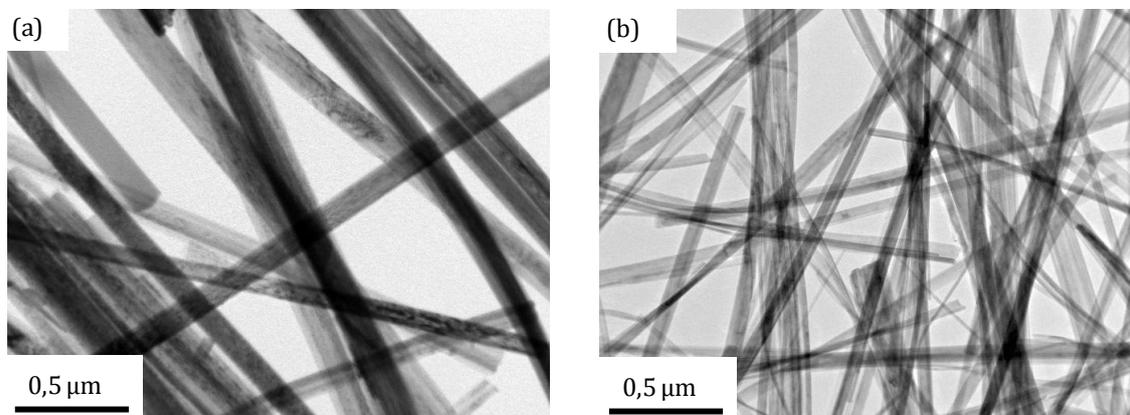


Figure 45 : Clichés MET des nanoparticules synthétisées par traitement hydrothermal (440 mg TiO_2 P25, 110 mL solution de soude 10M, étape de sonication (30 min, 375 W), 180°C, 20h, 7 bar, 150 tours.min⁻¹) et lavés (a) par dialyse et (b) par traitement acide (solution HCl 0,1M).

Les analyses réalisées par DRX (figure 46) indiquent qu'un lavage acide modifie considérablement la structure des nanorubans. Premièrement, les deux premiers pics caractéristiques sont décalés ce qui prouve qu'un lavage acide modifie la distance interréticulaire des plans atomiques constituant la structure des nanorubans. Sans lavage acide, les nanofeuilles, en faible proportion, et les nanorubans présentent des distances interréticulaires de $d = 1,05 \pm 0,01$ nm et $d = 0,79 \pm 0,01$ nm respectivement. Après lavage acide, la distance interréticulaire des nanofeuilles se maintient à $d = 1,06 \pm 0,01$ nm alors que celle des nanorubans diminue pour atteindre une valeur de $d = 0,74 \pm 0,01$ nm. Ces valeurs, calculées à partir de la position des pics et en utilisant la loi de Bragg, coïncident assez bien avec les distances interréticulaires mesurées sur les clichés MET haute résolution (figure 47). En effet, la distance interréticulaire mesurée sur les nanorubans non traités vaut $d = 0,78 \pm 0,02$ nm et $d = 0,72 \pm 0,02$ nm dans le cas des nanorubans lavés par acide. Cette diminution de l'espace entre les plans atomiques constituant les nanorubans s'explique par le fait que les ions Na^+ ont été substitués par des ions H^+ , de plus petites tailles, lors du traitement acide. Cet échange a entraîné une modification de l'espace entre les plans atomiques. De plus, les autres pics présents sur le diffractogramme des nanorubans disparaissent lors d'un lavage acide. L'échange des ions Na^+ par des ions H^+ entraîne des modifications profondes de la cristallinité des nanorubans.

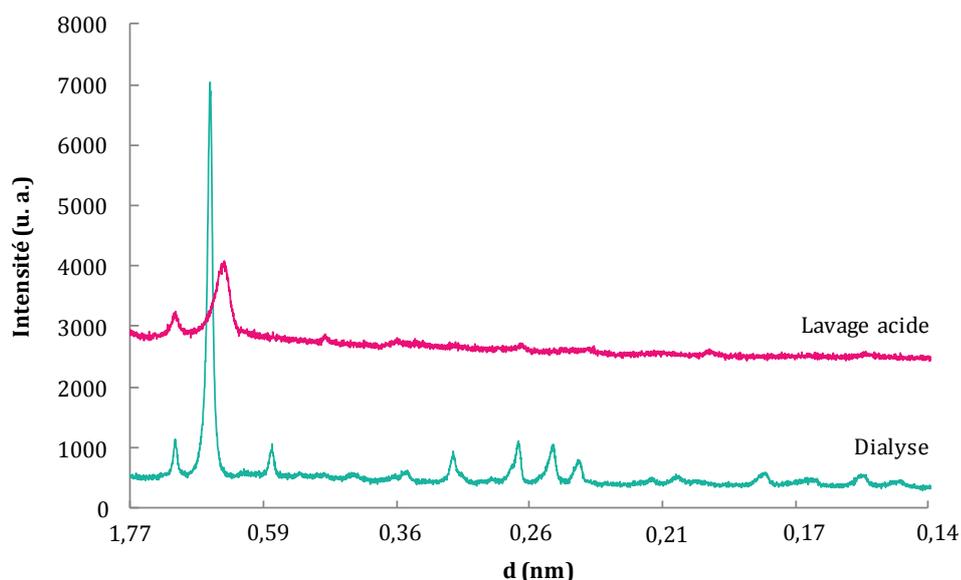


Figure 46 : Diffractogrammes des nanoparticules synthétisées par traitement hydrothermal (440 mg TiO₂ P25, 110 mL solution de soude 10M, étape de sonication (30 min, 375 W), 180°C, 20h, 7 bar, 150 tours.min⁻¹) et lavés par dialyse et par traitement acide (solution HCl 0,1M).

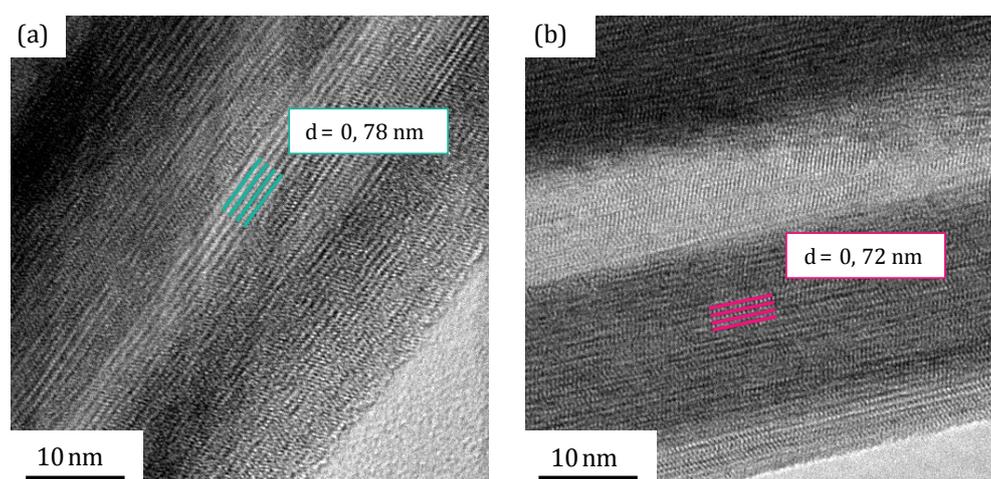


Figure 47 : Clichés MET haute résolution des nanorubans de titanates (a) lavés par dialyse et (b) par traitement acide (solution HCl 0,1M).

Des analyses complémentaires réalisées par spectroscopie Raman (figure 48) confirment qu'un lavage acide modifie la structure des nanorubans. Dans le cas d'un lavage acide, les pics caractéristiques des liaisons Ti-O-Na, situés à 280 et 375 cm⁻¹, disparaissent. Cela prouve que les ions Na⁺ ont bien été échangés par des ions H⁺ lors du traitement. De plus, les deux premiers pics caractéristiques des nanorubans présentent des formes moins définies et précises traduisant une modification de la structure des nanorubans. En effet, l'élargissement de ces pics laisse supposer que les nanorubans présentent une structure plus désordonnée.

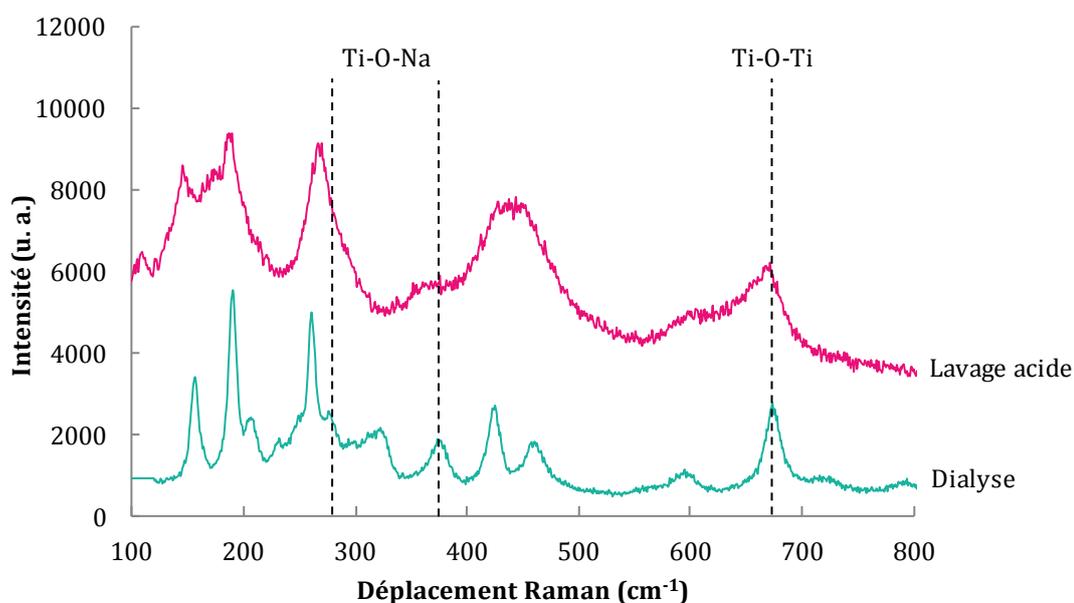


Figure 48 : Spectres Raman des nanoparticules synthétisées par traitement hydrothermal (440 mg TiO₂ P25, 110 mL solution de soude 10M, étape de sonication (30 min, 375 W), 180°C, 20h, 7 bar, 150 tours.min⁻¹) avant et après un lavage acide par une solution de HCl à 0,1M.

Au niveau de la composition chimique, les analyses XPS montrent que les nanorubans, avant et après le lavage acide présentent une proportion de carbone, d'oxygène et de titane proche. Seule la proportion d'atomes de sodium devient nulle dans le cas d'un traitement acide (tableau 12). La désomation du niveau 1s de l'oxygène met également en évidence qu'avec un lavage acide, la participation des atomes d'oxygène aux groupements hydroxyles est plus faible et leur contribution à l'oxygène de structure est plus importante.

	Carbone (± 1%)	Sodium (± 1%)	Oxygène (± 1%)	Titane (± 1%)	Na ⁺ /Ti ⁴⁺	O ²⁻ /Ti ⁴⁺	OH ⁻ /Ti ⁴⁺
Avec lavage acide	20	-	61	19	-	2,52	0,42
Sans lavage acide	22	8	55	16	0,5	2,06	0,81

	C-C (± 1%)	C-O (± 1%)	C=O et O-C=O (± 1%)	O ²⁻ (± 1%)	OH ⁻ et C=O (± 1%)	H ₂ O et C-O (± 1%)	Na _{Auger} (± 1%)
Avec lavage acide	13	6	1	48	8	5	-
Sans lavage acide	13	6	3	33	13	7	2

Tableau 12 : Proportion atomique XPS des différents éléments chimiques constituant les nanoparticules synthétisées par traitement hydrothermal (440 mg TiO₂ P25, 110 mL solution de soude 10M, étape de sonication (30 min, 375 W), 180°C, 20h, 7 bar, 150 tours.min⁻¹) avant et après un lavage acide par une solution de HCl à 0,1M.

Le lavage par traitement acide n'est pas la meilleure technique pour ramener les nanorubans de titanates à pH physiologique puisqu'elle modifie leurs dimensions, leur structure et leur composition chimique. La dialyse dans de l'eau déionisée est une technique de lavage moins agressive qui permet de conserver les nanorubans dans leur état initial.

I.4 Analyse morphologique fine des nanorubans de titanates

Des mesures directes sur les clichés MET et MEB ont permis de déterminer leur largeur (entre 100 et 200 nm) ainsi que leur longueur (plusieurs dizaine de μm). En revanche, l'épaisseur des nanorubans de titanates est difficile à évaluer et il n'existe aucune donnée dans la littérature concernant la détermination ou la mesure de cette dimension. L'absence de données nous a alors poussé à développer des méthodes originales pour déterminer l'épaisseur de ces nanorubans ou à adapter à nos nanoparticules, des techniques employées pour mesurer l'épaisseur d'autres objets. Toutes les techniques que nous allons développer dans ce paragraphe I.4 mettent à profit les nombreuses possibilités offertes par un microscope électronique en transmission performant.

I.4.1 Détermination de l'épaisseur des rubans - une première mondiale

I.4.1.1 Détermination de l'épaisseur des nanorubans par mesure directe

Sur certains clichés MET, il arrive parfois de voir des nanorubans présentant une largeur supérieure à 200 nm. Généralement, dans ce cas, plusieurs rubans se sont juxtaposés les uns à côté des autres pour former une nanoparticule de plus grande dimension (figure 36). Il arrive également de voir des nanorubans présentant une largeur nettement inférieure à 100 nm (figures 49a, b et c). Dans ce cas, il est probable que les nanorubans ne se soient pas déposés à plat sur la grille MET mais sur leur tranche. La distance mesurée sur le cliché ne correspondrait alors pas à sa largeur mais à son épaisseur. C'est sur cette première constatation et hypothèse que nous nous sommes basés pour déterminer l'épaisseur de nos rubans.

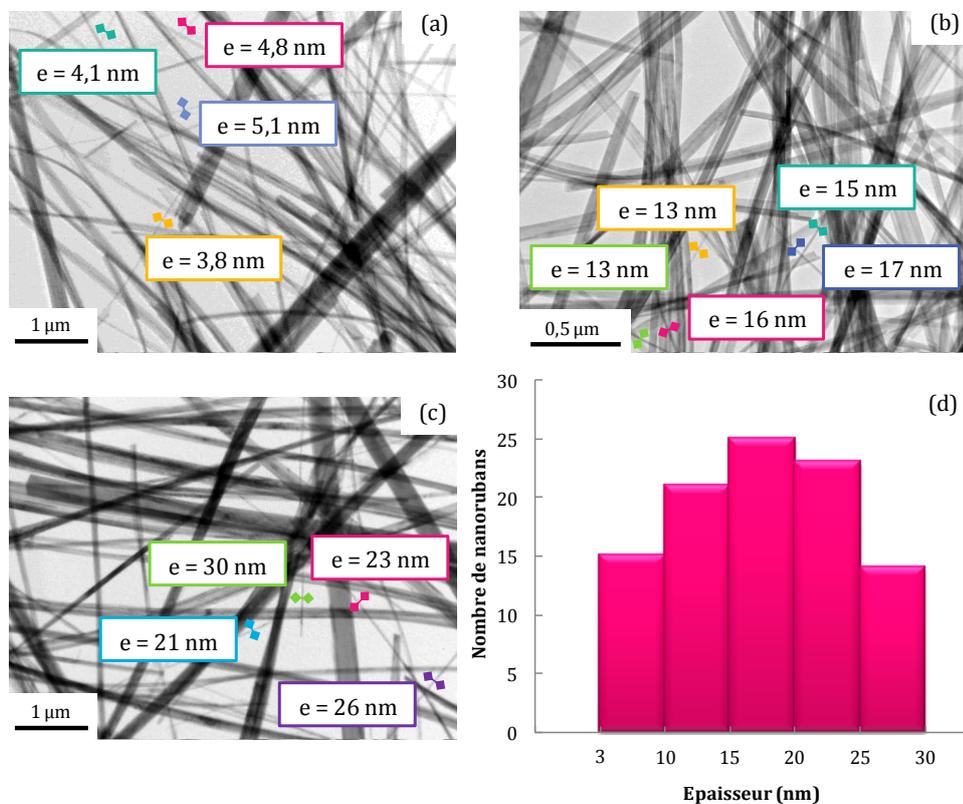


Figure 49 : (a, b et c) Clichés MET de nanorubans de titanates vraisemblablement disposés sur leurs tranches permettant de mesurer leur épaisseur. (d) Histogramme représentant la distribution des nanorubans en fonction de leur épaisseur (mesures réalisées sur 100 nanorubans).

Plusieurs mesures, réalisées à l'aide du logiciel Digital Micrograph, sur des clichés MET de différentes synthèses, donnent des valeurs d'épaisseur de nanorubans comprises entre 3 et 30 nm (figure 49d). Pour le moment, il est difficile de savoir si les nanorubans présentent une distribution d'épaisseur large ou si cette méthode est imprécise. L'imprécision de cette technique pourrait s'expliquer par le fait que, en réalité, certains nanorubans ne seraient pas déposés précisément sur leur tranche mais seraient légèrement inclinés. La mesure de la projection ne correspondrait alors pas exactement à l'épaisseur des nanorubans et fausserait ainsi les résultats.

1.4.1.2 Détermination de l'épaisseur des nanorubans par tilt et mesure de projection

Pour confirmer ou infirmer les résultats donnés par la première méthode, une deuxième méthode de détermination de l'épaisseur des nanorubans par tilt et mesure de projection a été mise en place (figure 50). La première étape de cette méthode consiste à trouver un ruban isolé et placé dans l'axe de tilt de la platine. Pour obtenir des résultats les plus précis possible, il est également judicieux de sélectionner un ruban présentant un défaut (débris superposé par exemple) servant de repère pour réaliser les mesures exactement au même endroit. Dans l'exemple choisi, le nanoruban présente une largeur « l » de 143 nm (figure 51a). Pour savoir si ce ruban est déposé à plat sur la grille MET, il est tilté d'un angle de +30 puis de -30 degrés.

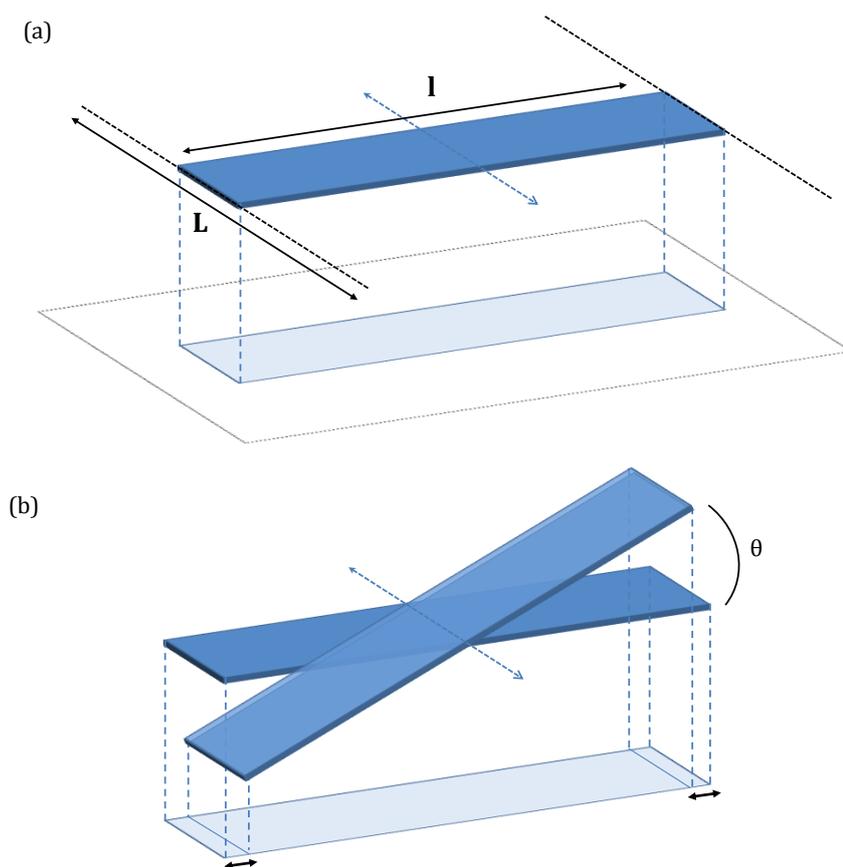


Figure 50 : Schémas 3D d'un nanoruban et de sa projection lorsqu'il se trouve (a) à plat et (b) lorsqu'il est incliné d'un certain angle. L représente la longueur du ruban et l sa largeur. Seule une tranche de ruban est par conséquent ici représentée.

Dans le cas d'un angle de tilt de +30 degrés (figure 51b), la mesure de la projection vaut 134 nm et cette valeur ne vaut plus que 122 nm lorsque le nanoruban est tilté d'un angle de -30 degrés (figure 51c). La mesure de la projection n'étant pas égale sous les deux angles de tilt, le nanoruban n'est alors pas à plat lorsque la platine n'est pas tiltée.

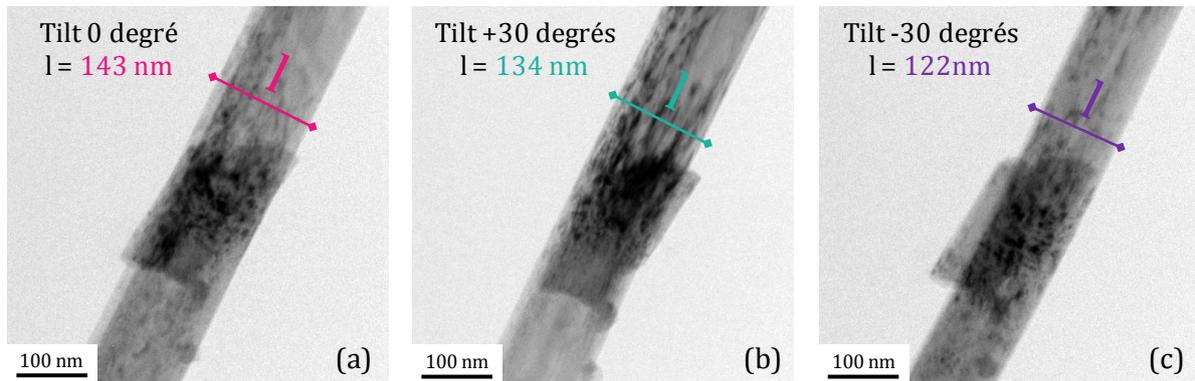


Figure 51 : Clichés MET d'un nanoruban lorsque (a) la platine n'est pas tiltée, (b) lorsqu'elle est tiltée d'un angle de +30 degrés et (c) lorsqu'elle est tiltée d'un angle de -30 degrés.

En revanche, la mesure de la projection est identique et atteint une valeur de 134 nm lorsque le nanoruban est tilté d'un angle de +30 degrés et de -18 degrés (figure 52a). Le nanoruban a alors été tilté d'un angle total de 48 degrés. Pour avoir un angle de tilt de 24 degrés de chaque côté, la platine doit être placée à un angle de 6 degrés (figure 52b). A cette position, le nanoruban est à plat. La mesure de la projection correspond alors exactement à la largeur du nanoruban. Dans ce cas, elle vaut $l = 145$ nm (figure 52c).

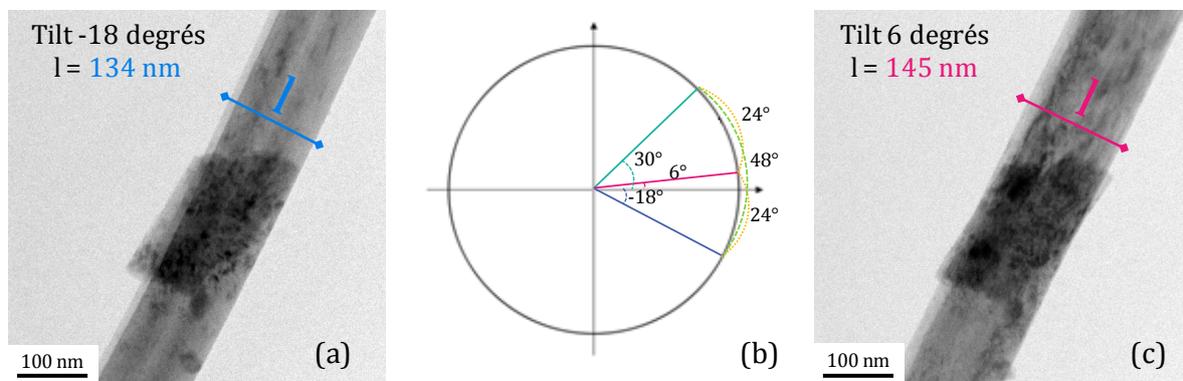


Figure 52 : Clichés MET du nanoruban lorsque (a) la platine est tiltée d'un angle de -18 degrés et (c) lorsqu'elle est tiltée d'un angle de +6 degrés. (b) Schéma d'un cercle trigonométrique permettant de déterminer l'angle de tilt de la platine pour que le nanoruban soit à plat.

Lorsque ce nanoruban est tilté d'un angle de 24 degrés, d'après les règles trigonométriques, la mesure théorique de la projection vaut 132,5 nm (figure 53a). Or, sur les clichés MET haute résolution, la projection mesurée expérimentalement vaut 134,8 nm (figure 53b).

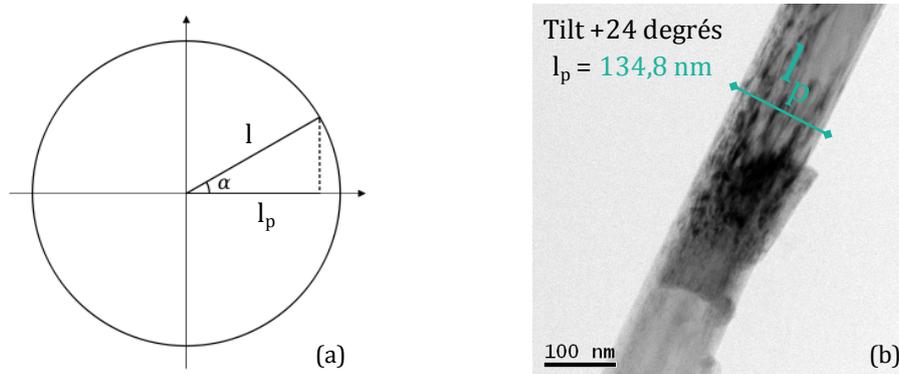


Figure 53 : (a) Schéma d'un cercle trigonométrique permettant de déterminer la mesure théorique de la projection du nanoruban lorsqu'il est tilté d'un angle de 24 degrés et (b) cliché MET haute résolution du nanoruban sous un angle de 24 degrés.

La mesure expérimentale de la projection est plus importante que la valeur théorique. Cet écart de 2,3 nm s'explique par le fait que la valeur théorique a été calculée dans le cas où le nanoruban a une épaisseur négligeable (figure 54a). En réalité, les nanorubans présentent trois dimensions et leur épaisseur est à prendre en compte. Avec cette épaisseur, la projection du nanoruban lorsqu'il est tilté d'un angle de 24 degrés devient plus importante (figure 54b).

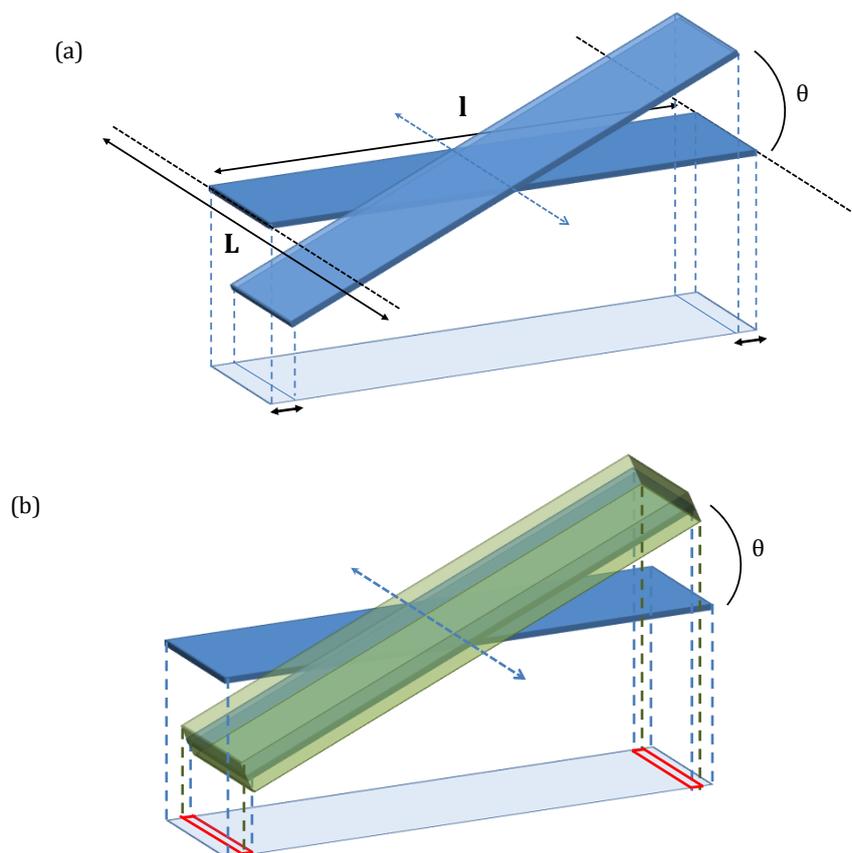


Figure 54 : Schémas 3D (a) d'un nanoruban d'épaisseur négligeable et (b) d'un nanoruban d'épaisseur non négligeable ainsi que de leur projection lorsqu'ils sont à plat et lorsqu'ils sont inclinés d'un certain angle.

Pour remonter à la valeur de l'épaisseur du ruban à partir de la différence de mesure de projection, les règles trigonométriques ont été appliquées (figure 55). Les calculs indiquent alors que le nanoruban présente une épaisseur de $5,7 \pm 0,8$ nm.

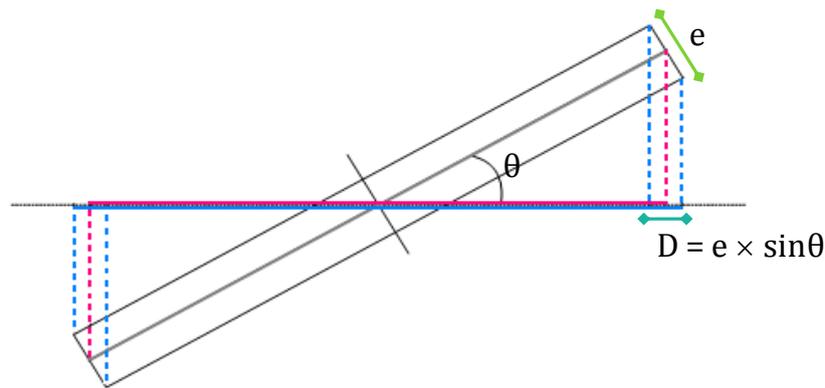


Figure 55 : Schéma en 2 dimensions d'un nanoruban d'épaisseur nulle (en rouge) et d'un nanoruban d'épaisseur non négligeable (en bleu) inclinés d'un certain angle θ .

Cette technique permettant de déterminer l'épaisseur a été appliquée sur trois nanorubans différents (tableau 13). Dans chaque cas, les valeurs de l'épaisseur sont du même ordre de grandeur puisqu'elles varient de 3 à 6 nm. Ces valeurs sont également en accord avec les valeurs les plus faibles déterminées par mesure directe sur les clichés MET (paragraphe I.4.1.1). La cohérence de ces résultats laisse penser que la méthode de tilt et de mesure de projection est une technique appropriée pour la détermination de l'épaisseur des nanorubans.

	Angle de tilt ruban à plat	Mesure l ruban à plat	Angle de tilt	Calcul projection	Mesure exp projection	Différence	Epaisseur ($\pm 0,8$ nm)
1	6°	145 nm	24°	132,5 nm	134,8 nm	2,3 nm	5,7 nm
2	-15°	190 nm	20°	178,5 nm	180,4 nm	1,9 nm	5,5 nm
3	7,5°	127 nm	22,5°	117,3 nm	118,5 nm	1,2 nm	3,1 nm

Tableau 13 : Récapitulatif des mesures de détermination de l'épaisseur de trois nanorubans par la technique de tilt et mesure de projection.

I.4.1.3 Détermination de l'épaisseur des nanorubans par observation en coupe transverse

Pour confirmer les résultats obtenus par la méthode de tilt et de mesure de projection, une autre technique a été utilisée pour déterminer l'épaisseur des nanorubans de titanates. Cette technique, qui repose sur l'observation des nanoparticules en coupe transverse, a prouvé son efficacité pour la détermination de l'épaisseur de nanotubes d'oxydes de vanadium (Krumeich *et al.* 2000) et a donc été adaptée pour les nanorubans de titanates. Pour pouvoir observer les nanorubans sur leur coupe transverse, une préparation particulière des échantillons est nécessaire (figure 56). Pour cela, des nanorubans sous forme de poudre ont été déposés sur un wafer en silicium. Ils ont ensuite été recouverts par quelques gouttes de résine G1, fréquemment utilisée pour la préparation d'échantillon MET, et par un deuxième wafer de

silicium dans le but de créer un sandwich de 500 μm d'épaisseur. La formation du sandwich de silicium permet d'imposer une orientation précise aux nanorubans. Le sandwich a alors été placé à l'intérieur d'un tube en laiton de 3 mm de diamètre et a été maintenu par de la résine. Après une journée de séchage, des rondelles de 250 μm de d'épaisseur ont été découpées à la scie à fil. Les rondelles ont par la suite été polies des deux côtés à l'aide d'un papier de verre (400) jusqu'à ce que leurs épaisseurs atteignent 100 μm . Une étape de meulage concave avec de la pâte diamantée de 3 μm et de la poudre d'alumine a permis de réduire l'épaisseur au centre des rondelles à 20 μm . Enfin, les rondelles ont été amincies ioniquement pendant une demie heure et avec une tension d'accélération des ions argon de 4,5 keV.

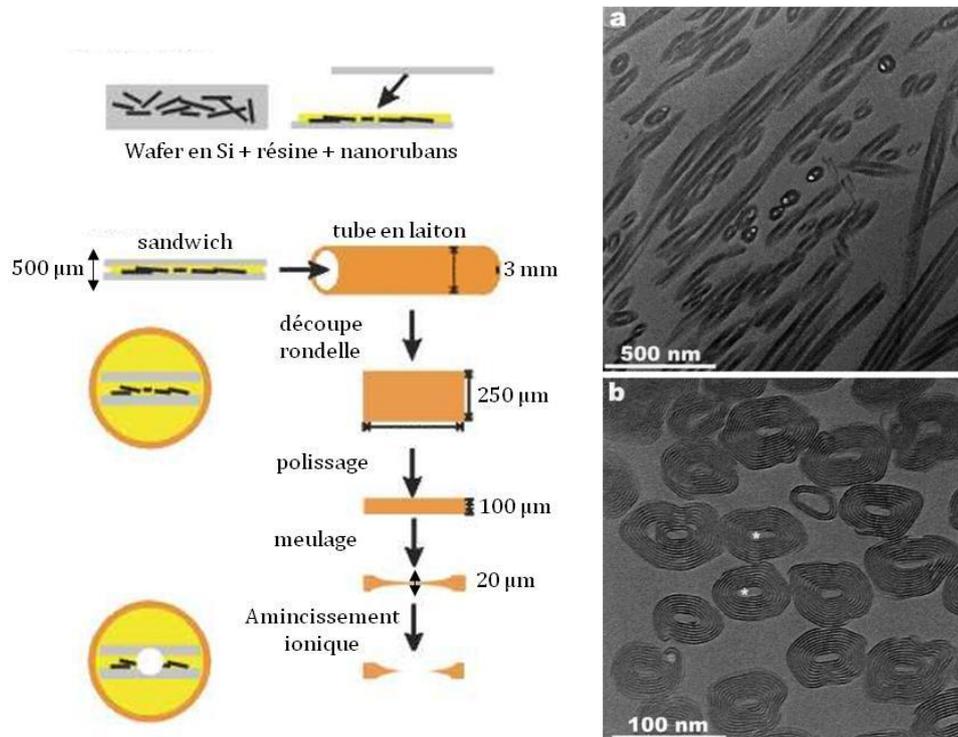
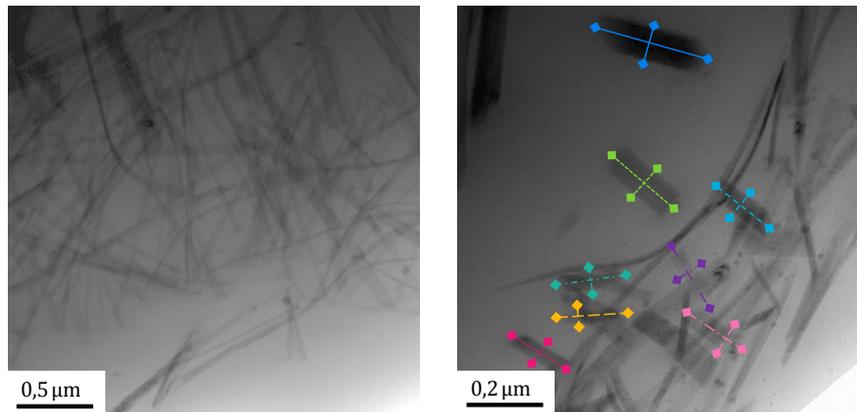


Figure 56 : Schéma des différentes étapes à réaliser pour la préparation d'échantillons de nanorubans observables en coupe transverse et clichés MET de nanotubes de vanadium préparés par cette technique d'après (Krumeich *et al.* 2000).

Les observations MET des échantillons (figure 57) montrent que dans la majorité des cas, les nanorubans ne se sont pas déposés suivant l'orientation imposée. Ils ne sont alors que rarement visibles sur leur coupe transverse. Des mesures réalisées sur huit nanorubans indiquent que leur épaisseur serait comprise entre 36 et 84 nm (figure 57). Ces valeurs très élevées ne sont pas en accord avec celles obtenues par les deux techniques utilisées précédemment. Cet écart peut s'expliquer par le fait que la distance mesurée correspondrait en réalité à l'épaisseur de plusieurs nanorubans superposés les uns au dessus des autres. De plus, il est difficile de savoir si les mesures ont été réalisées réellement sur des nanorubans en coupe transverse ou sur des fragments de rubans placés dans des orientations non contrôlées. La détermination de l'épaisseur par coupe transverse ne semble pas une méthode appropriée dans le cas de nanorubans de titanates.



	1	2	3	4	5	6	7	8
Largeur (nm)	250	203	169	163	151	152	150	144
Épaisseur (nm)	84	82	55	42	41	36	62	48

Figure 57 : Clichés MET des nanorubans de titanates préparés pour être observés en coupe transverse et tableau de valeurs des épaisseurs mesurées.

1.4.1.4 Détermination de l'épaisseur des nanorubans par tomographie et reconstruction 3D

L'épaisseur des nanorubans de titanate a également été déterminée par tomographie et reconstruction 3D. Pour cette technique, il est nécessaire de réaliser l'acquisition du plus grand nombre d'images de nanorubans sous différents angles de tilt (figure 58a). Pour obtenir le plus de clichés possibles, un premier essai a été réalisé sur le campus Jussieu à Paris VI qui possède un MET (JEOL JEM 2100 LaB₆) équipé d'une platine capable de tilter d'un angle de +60 à -60 degrés. Cent quinze images de nanorubans ont alors été réalisées avec un angle de tilt variant de -55 à +59 degrés. Le logiciel de reconstruction utilisé pour le traitement des images est le logiciel Fiji équipé du plug in TomoJ. La reconstruction 3D du premier nanoruban analysé indique que son épaisseur vaut 15 nm (figure 58b).

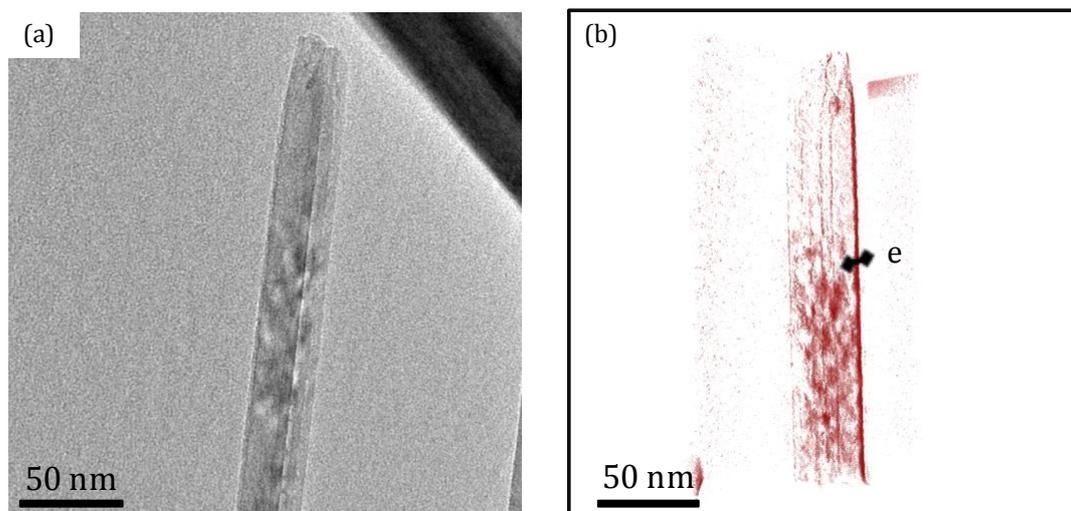
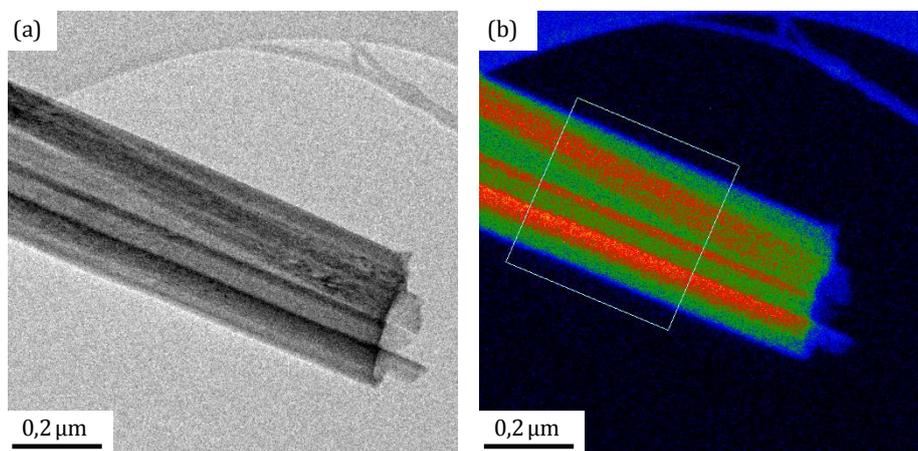


Figure 58 : (a) Cliché MET d'un nanoruban de titanates à plat et (b) image de la reconstruction 3D de ce même nanoruban obtenu à l'aide du logiciel Fiji et du plug in TomoJ.

La détermination de l'épaisseur des nanorubans par tomographie et reconstruction 3D apporte des résultats encourageants. La valeur de l'épaisseur obtenue par cette technique est en accord avec les valeurs déterminées par mesure directe et est légèrement supérieure à celles obtenues par tilt et mesure de projection. Cependant, ce résultat est à optimiser. En effet, durant les 2h nécessaires à l'acquisition des 115 images, un dépôt de carbone, dû à la migration des résidus carbonés sous le faisceau d'électrons, se forme autour du nanoruban. Ce dépôt, pris en compte lors de la reconstruction, va alors fausser la valeur de l'épaisseur en la surestimant. De plus, le logiciel de reconstruction utilisé est un logiciel gratuit qui présente des capacités limitées. Enfin, la tomographie et la reconstruction 3D sont de nouvelles techniques utilisées pour la première fois au sein de notre laboratoire. Des optimisations restent donc à effectuer.

1.4.1.5 Technique EELS (Electron Energy Loss Spectroscopy)

Cette méthode permet de déterminer l'épaisseur par mesure de perte d'énergie (annexe 5). Pour cela, l'échantillon à analyser doit être préparé sur une grille MET à membrane à trous pour éviter que la mesure ne soit faussée par la présence de la membrane de carbone. La structure des nanorubans étant indéterminée, le libre parcours moyen de l'électron dans le matériau a été estimé égal à celui de $\text{Na}_2\text{Ti}_3\text{O}_7$. Dans l'exemple, pour vérifier que les différences de gris sur le cliché MET du ruban choisi (figure 59a) correspondent bien à une variation d'épaisseur et non à des défauts d'empilement des plans atomiques suite à la formation d'une macule par exemple, une cartographie a été réalisée. Cette cartographie présente des variations de couleurs allant du bleu au rouge (figure 59b). Cela confirme que le ruban ne présente pas une épaisseur homogène. Les zones bleues, situées sur les bords du ruban correspondent aux zones les plus fines. Les zones rouges représentent quant à elles les zones les plus épaisses. Le profil d'épaisseur réalisé confirme également qu'il y a des variations d'épaisseur au sein du ruban (figure 59c).



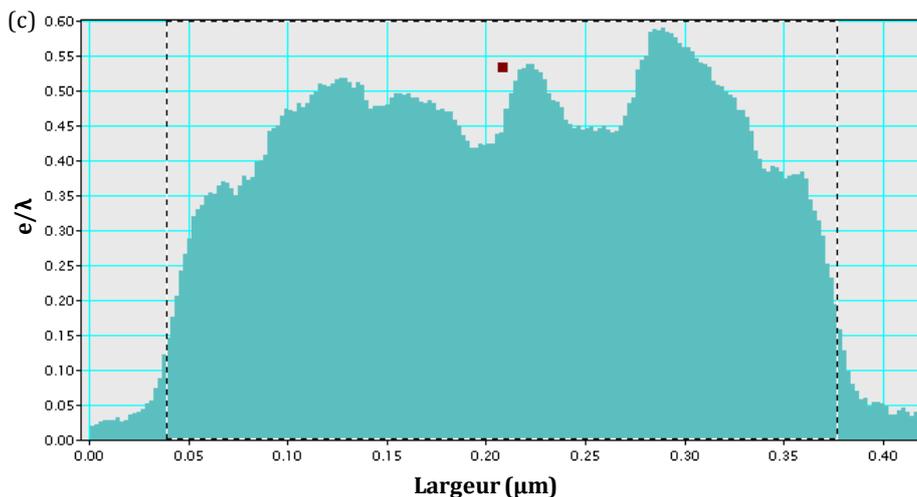


Figure 59 : (a) Cliché MET, (b) cartographie et (c) profil d'épaisseur déterminés par EELS du nanoruban utilisé en exemple.

A partir de ces données, il est possible de remonter par calcul à la valeur de l'épaisseur (Malis *et al.* 1988) (annexe 5). Dans cet exemple, le nanoruban présente une épaisseur moyenne de 27 ± 4 nm. Des mesures réalisées sur quatre échantillons différents indiquent que l'épaisseur des nanorubans varie de 30 à 60 nm ce qui correspond environ à 10% de leur largeur (tableau 14).

Ruban	λ $\text{Na}_2\text{Ti}_3\text{O}_7$ calculé	Largeur (l) (± 1 nm)	$\frac{e}{\lambda}$	Epaisseur (e) (± 4 nm)	$\frac{e}{l}$
1	90,2 nm	217 nm	0,304	27 nm	12,6%
2	90,2 nm	137 nm	0,317	29 nm	20,9%
3	90,2 nm	339 nm	0,453	41 nm	12,1%
4	90,2 nm	750 nm	0,643	58 nm	7,8%

Tableau 14 : Tableau récapitulatif de l'épaisseur de quatre nanorubans différents déterminée par la méthode EELS.

Ces valeurs, relativement élevées, en comparaison à celles obtenues par mesure directe et tilt/projection, associées aux variations observées au sein même d'un ruban, seront rediscutées paragraphe I.4.2.

I.4.1.6 Autres techniques pouvant être développées

La technique CBED (Convergent Beam Electron Diffraction) de détermination de l'épaisseur en faisceau convergent est difficilement applicable dans le cas des nanorubans (annexe 6). En effet, pour cette méthode, il est nécessaire de connaître précisément la structure de l'échantillon pour pouvoir déterminer son coefficient d'extinction. Les nanorubans de titanates ayant une structure indéterminée, il faudrait approximer leur coefficient d'extinction à celui du $\text{Na}_2\text{Ti}_3\text{O}_7$ ce qui engendrerait une erreur importante sur la détermination de leur épaisseur. De plus, les clichés MET haute résolution réalisés sur les nanorubans montrent qu'ils présentent des défauts d'empilements dans leur structure rendant l'obtention de clichés de

diffraction difficile. Enfin, une étude réalisée sur du silicium pur a montré que cette technique n'est pas adaptée pour des épaisseurs inférieures à 45 nm (Delille *et al.* 2001). D'après les premiers résultats obtenus, les nanorubans de titanates présenteraient une épaisseur comprise entre 3 et 30 nm. Ils sont alors trop fins pour être analysés par CBED.

Le principe de la méthode du grain de café repose quant à elle sur la mesure de l'épaisseur par contamination au carbone à la surface supérieure et inférieure de l'échantillon au niveau du point d'analyse (annexe 7). Cette méthode semble applicable dans le cas des nanorubans de titanates et devrait être testée prochainement.

1.4.1.7 Conclusion sur l'épaisseur des nanorubans de titanates

Les différentes techniques de microscopie utilisées ont permis de déterminer pour la première fois l'épaisseur des nanorubans de titanates. Celle-ci est comprise entre 3 et 40 nm ce qui correspond à environ 10 à 20% de leur largeur. La détermination de l'épaisseur par tilt et mesure de projection, tomographie et reconstruction 3D et EELS apportent les résultats les plus fiables. Pour que cette étude soit complète, des mesures supplémentaires devront néanmoins être réalisées sur un panel de cent rubans. De plus, il serait judicieux de déployer ces différentes techniques sur un même ruban pour obtenir une valeur d'épaisseur plus précise.

1.4.2 Détermination de l'intégrité des rubans

Bien que cela n'ait jamais été sous-entendu dans la bibliographie, il semblerait, d'après le mécanisme de formation proposé (paragraphe I.3.3) ainsi que les observations réalisées au MEB à fort grandissement (figures 60a et b) et par EELS (figure 59), que les nanorubans de titanates soient des super-structures constituées d'un assemblage de plusieurs rubans plus petits juxtaposés et superposés les uns sur les autres.

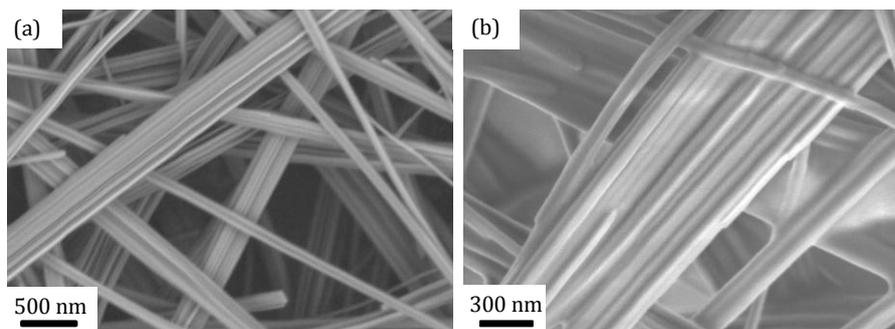


Figure 60 : (a et b) Clichés MEB illustrant la structure particulière des nanorubans de titanates basée sur l'assemblage de plusieurs rubans pour former une nanostructure de dimensions plus importante (440 mg TiO_2 P25, 110 mL solution de soude 10M, étape de sonication (30 min, 375 W), 180°C, 20h, 7 bar, 150 tours.min⁻¹).

Pour évaluer leur intégrité, les nanorubans de titanates en suspension dans l'eau déionisée (1 mg.mL⁻¹) ont été soumis à différentes techniques de dispersion. Dans un premier temps, les suspensions de rubans ont été homogénéisées par table vibrante (300 secousses.min⁻¹), agitation manuelle, agitation magnétique (300 tours.min⁻¹), bain à ultrason et canne à ultrason (375 W) pendant une courte durée d'une minute. D'après les observations MEB

et MET, les nanorubans présentent toujours une largeur comprise entre 100 et 200 nm pour une longueur de plusieurs dizaines de micromètres (mesures MET et MEB réalisées sur 100 rubans) lorsqu'ils sont dispersés par table vibrante, agitation manuelle et agitation magnétique (figures 61 et 62b, c, d, g, h et i). Ces modes de dispersion ne semblent donc pas affecter la morphologie des rubans.

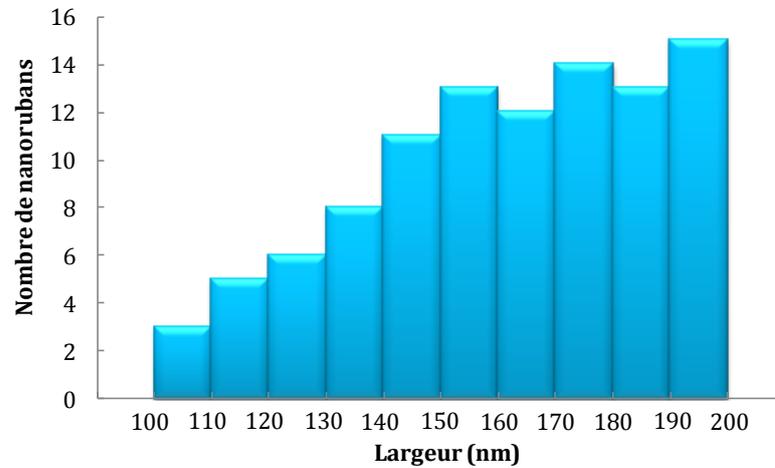
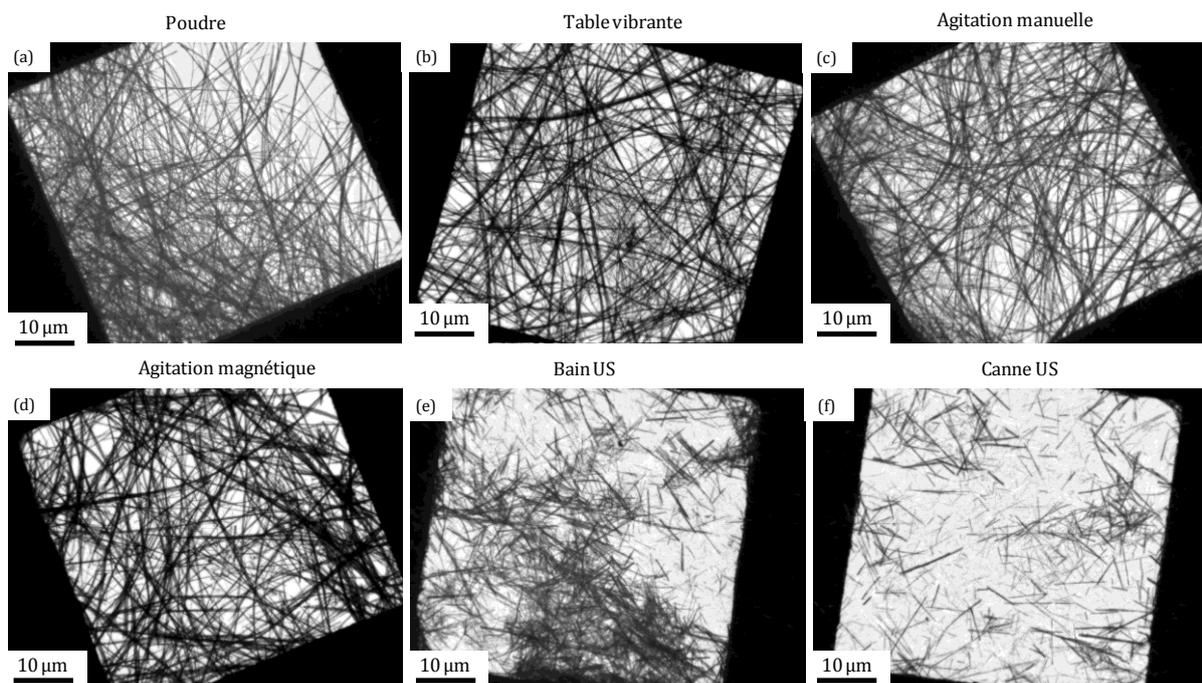


Figure 61 : Histogramme représentant la distribution de taille en largeur des nanorubans en suspension dispersés par agitation manuelle (mesures MET et MEB réalisées sur 100 nanorubans). Les histogrammes des rubans dispersés par table vibrante et l'agitation magnétique ($300 \text{ tours} \cdot \text{min}^{-1}$) sont identiques.



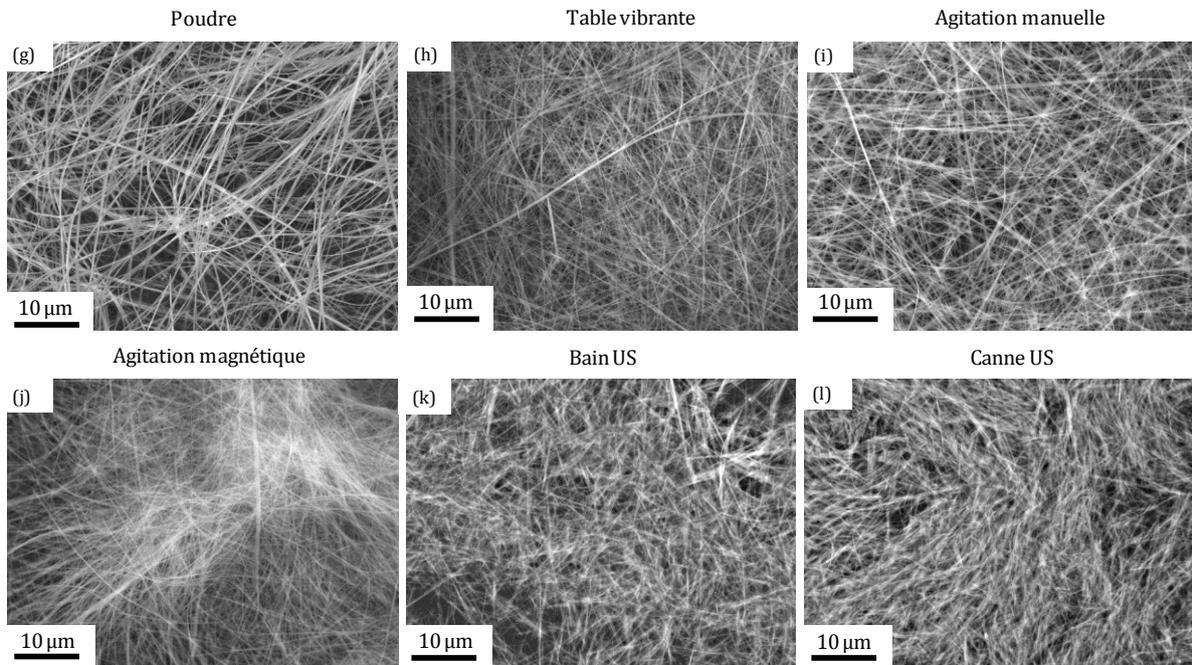


Figure 62 : (a-f) Clichés MET et (g-l) clichés MEB des nanorubans de titanates (a et g) en poudre et en suspensions homogénéisées par (b et h) table vibrante ($300 \text{ secousses.min}^{-1}$), (c et i) agitation manuelle, (d et j) agitation magnétique ($300 \text{ tours.min}^{-1}$), (e et k) bain US et (f et l) canne US (375 W) pendant une durée d'une minute.

En revanche, lorsque les nanorubans sont dispersés par un traitement aux ultrasons, leur longueur ne varie plus que de 500 nm à $15 \text{ }\mu\text{m}$ (figures 62e, f, k et l et 63a). Leur largeur est quant à elle toujours comprise entre 100 et 200 nm mais une grande majorité d'entre eux présentent une largeur inférieure à 150 nm (figures 62e, f, k et l et 63b).

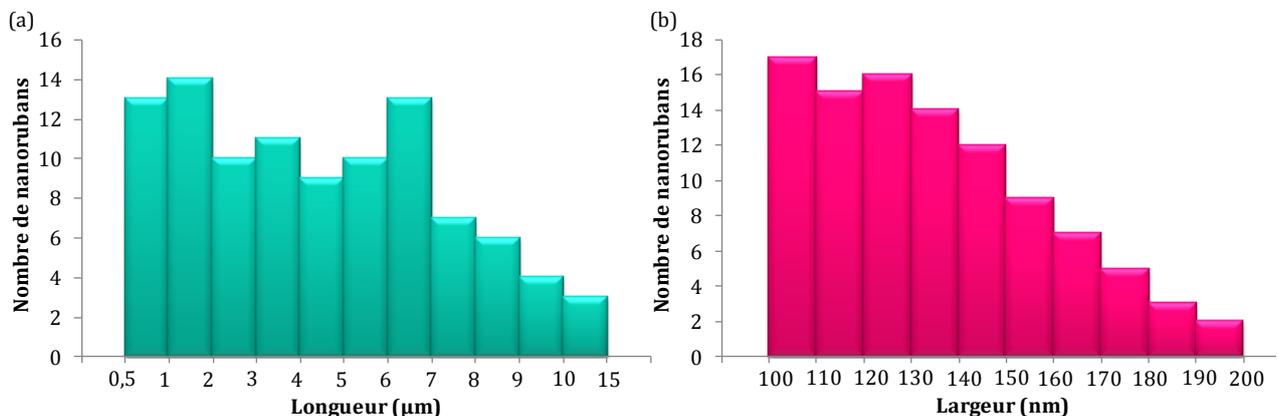


Figure 63 : Histogrammes représentant la distribution de taille (a) en longueur et (b) en largeur des nanorubans en suspension dispersés par traitement à la canne à ultrasons. Les histogrammes des rubans dispersés par bain US sont identiques.

Pour expliquer ces variations de dimensions, deux hypothèses sont envisageables. Selon la première, les nanorubans seraient particulièrement fragiles et auraient tendance à se briser (figure 64a) et à se déchirer sous l'effet des ultrasons (figures 64b et c). Malgré des clichés MET montrant des nanorubans pouvant corroborer cette hypothèse, cette théorie semble peu probable. En effet, l'épaisseur des nanorubans, déterminée au cours du paragraphe précédent,

semble trop importante pour qu'ils puissent se rompre sous l'effet des ultrasons. De plus, la durée du traitement ainsi que sa puissance semblent insuffisantes pour détériorer une telle structure à base d'oxydes donc constituée de liaisons iono-covalentes fortes.

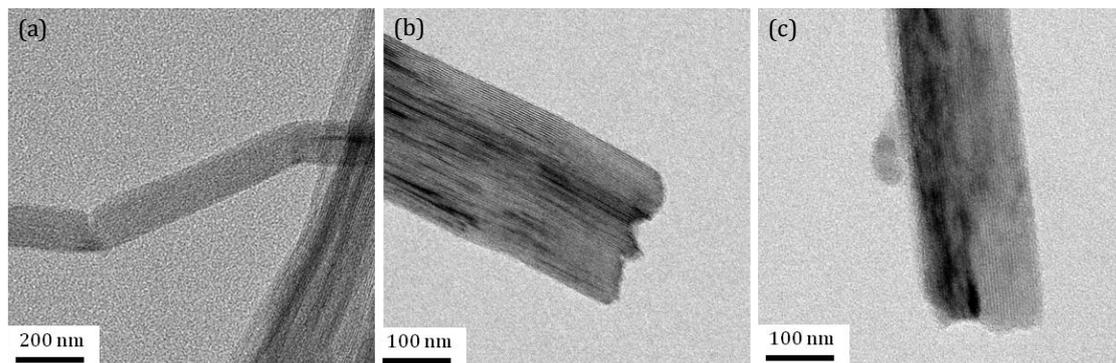


Figure 64 : Clichés MET des nanorubans (a) disloqués et (b et c) déchirés par un traitement aux ultrasons.

Selon la seconde théorie, l'assemblage de rubans de dimensions variables constituant la structure des nanorubans se séparerait sous l'effet des ultrasons. Pour confirmer cette hypothèse, des mesures d'épaisseur par la méthode EELS ont été réalisées sur des nanorubans ayant subi un traitement à la canne à ultrasons (figure 65a).

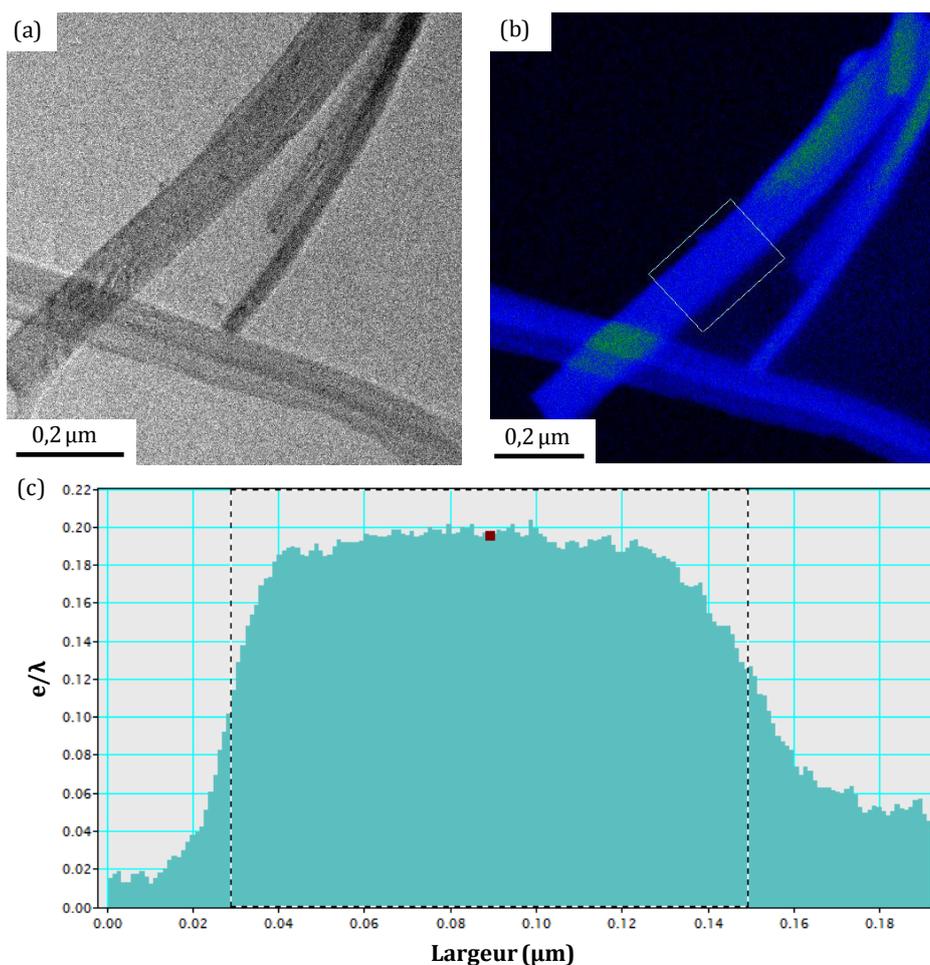


Figure 65 : (a) Cliché MET, (b) cartographie et (c) profil d'épaisseur déterminés par EELS d'un nanoruban ayant subi un traitement à la canne à ultrasons (1 min, 375 W).

Les analyses réalisées indiquent que l'épaisseur des nanorubans soniqués est fine et homogène puisque la cartographie ne présente qu'une seule couleur : le bleu (figure 65b). Ces résultats ont été confirmés par le profil d'épaisseur qui ne présente quasiment aucune variation (figure 65c). Des mesures réalisées sur quatre échantillons différents indiquent que l'épaisseur des nanorubans, initialement déterminée entre 30 et 60 nm (tableau 14), ne varie plus que de 10 à 18 nm lorsqu'ils subissent un traitement aux ultrasons (tableau 15).

Ruban	$\lambda \text{ Na}_2\text{Ti}_3\text{O}_7$ calculé	Largeur (l) (± 1 nm)	$\frac{e}{\lambda}$	Epaisseur (e) (± 4 nm)	$\frac{e}{l}$
1	90,2 nm	120,4 nm	0,160	14 nm	12%
2	90,2 nm	53,3 nm	0,145	13 nm	24,6%
3	90,2 nm	90,6 nm	0,203	18 nm	20,3%
4	90,2 nm	141,9 nm	0,643	11 nm	7,4%

Tableau 15 : Tableau récapitulatif de l'épaisseur de quatre nanorubans différents déterminée par la méthode EELS.

I.4.3 Conclusion sur la morphologie des nanorubans de titanates

L'étude de l'intégrité des nanorubans de titanates a permis de confirmer les hypothèses concernant leur morphologie particulière. Les observations MET ainsi que les mesures d'épaisseur par EELS, avant et après une étape de sonication à la canne à ultrasons, indiquent que les nanorubans de titanates sont en réalité une super-structure constituée d'un assemblage de rubans de plus faibles dimensions qui se séparent sous l'effet des ultrasons (figure 66).

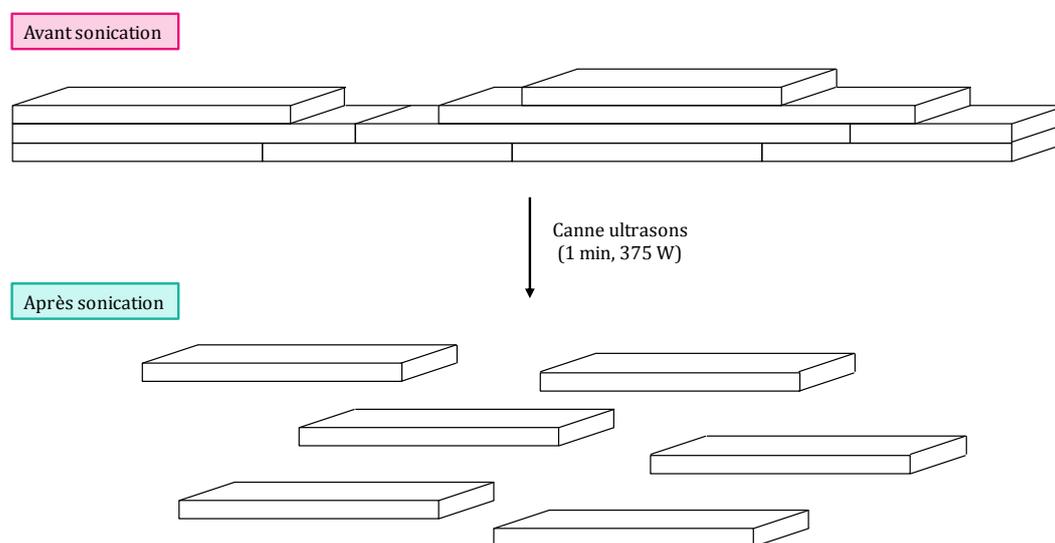


Figure 66 : Schéma illustrant la séparation des nanorubans assemblés en super-structure des nanorubans de titanates sous l'effet d'un traitement aux ultrasons.

La réalisation de clichés de diffraction sur des nanorubans avant et après l'étape de sonication confirme également la super-structure des nanorubans de titanates. Avant le traitement aux ultrasons, le cliché de diffraction se compose d'anneaux indiquant que le nanoruban analysé est polycristallin (figures 67a et b). En revanche, après le traitement aux

ultrasons, le cliché de diffraction du nanoruban correspond à celui d'un matériau monocristallin (figures 67c et d).

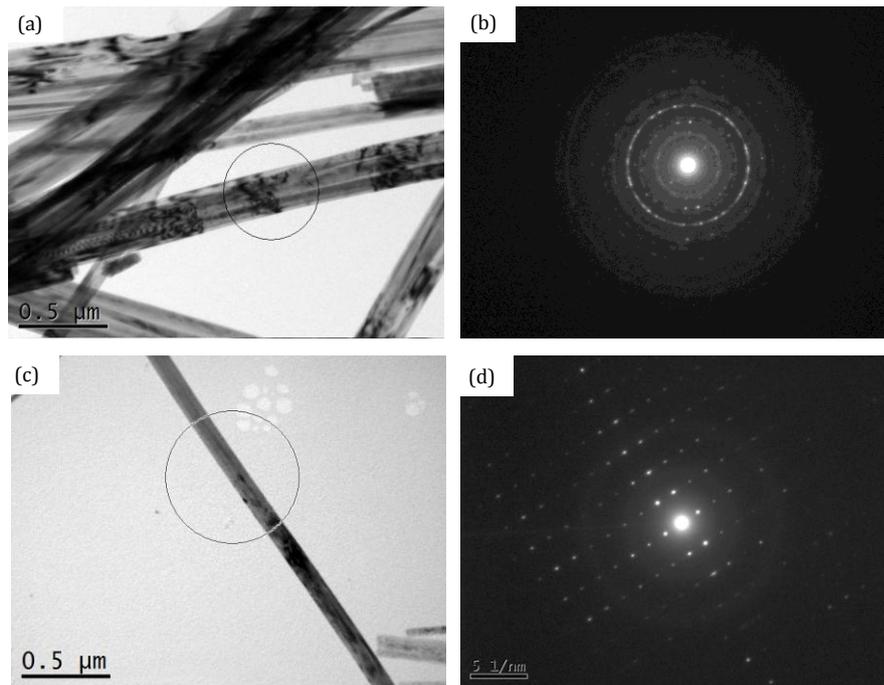


Figure 67 : (a) Cliché MET et (b) cliché de diffraction des nanorubans de titanates non soniqués. (c) Cliché MET et (d) cliché de diffraction d'un nanoruban de titanates ayant subi un traitement à la canne à ultrasons (1 min, 375 W).

I.5 Vers la commercialisation des nanorubans dans le domaine biomédical

La collaboration avec l'entreprise NVH Medicinal a apporté une autre dimension à ce travail de thèse. Du point de vue de l'industriel, l'un des objectifs principaux lors de l'élaboration et de la conception d'un produit, est de pouvoir à terme le commercialiser. Seulement, pour pouvoir être commercialisés dans le domaine biomédical, les nanorubans doivent répondre à certaines normes particulièrement strictes au niveau de la maîtrise de la reproductibilité et de la pureté.

I.5.1 Maîtrise de la reproductibilité de la synthèse de nanorubans

Pour tester la reproductibilité, huit synthèses de nanorubans de titanates ont été réalisées exactement dans les mêmes conditions. Pour les réactifs, 440 mg de précurseur pulvérulent de TiO_2 de type P25 ont été introduits dans 110 mL d'une solution de soude de concentration 10 mol.L^{-1} . Dans le but d'appliquer des conditions identiques d'une synthèse à l'autre, le précurseur de TiO_2 utilisé provenait du même lot (Degussa) et les pastilles de soude provenaient de deux pots du même fournisseur (Sigma Aldrich) ayant des dates d'ouverture proches pour éviter les variations de carbonatation. Pour chaque synthèse, les conditions du traitement hydrothermal ont été une étape de sonication de 30 minutes à la canne à ultrasons, une température de 180°C , une durée de 20h, une pression autogène d'environ 7 bar et une

agitation mécanique de 150 tours.min⁻¹. Les précipités formés lors de toutes les synthèses ont ensuite été séparés des surnageants par un cycle de centrifugation de 10 minutes à 15000 tours.min⁻¹ (10847 ×g), puis lavés par dialyse pendant 3 jours avant d'être lyophilisés. Les nanorubans obtenus en sortie de synthèse n'ont pas subi de traitements aux ultrasons.

Les observations réalisées au MET (figure 68) montrent que la morphologie des nanorubans de titanates est identique d'une synthèse à l'autre. Dans tous les cas, les nanorubans, organisés en réseau, présentent une largeur comprise entre 100 et 200 nm pour une longueur variant de quelques micromètres à plusieurs de dizaine de micromètres (pour chaque synthèse, 20 nanorubans ont été mesurés).

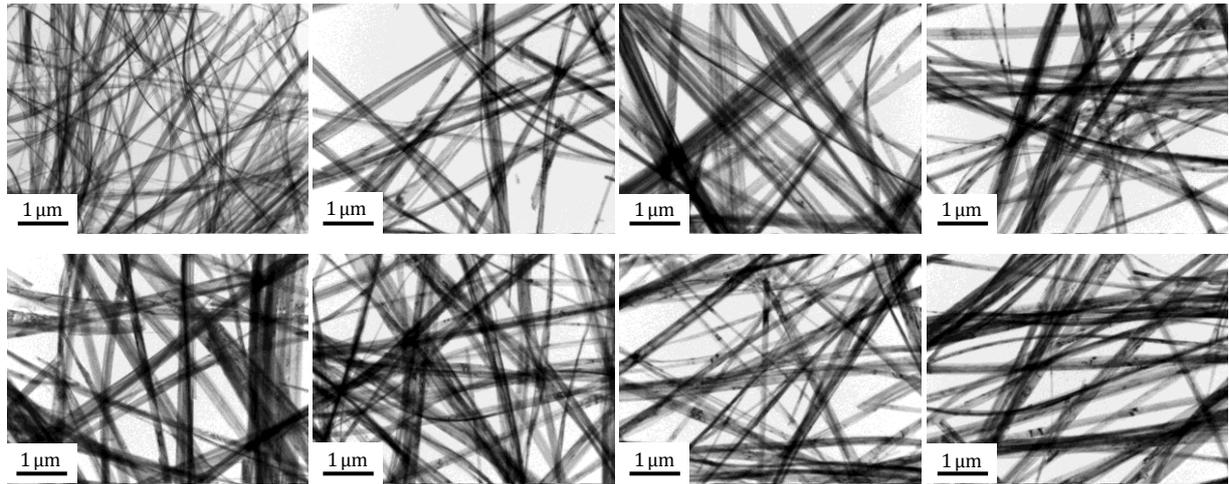


Figure 68 : Clichés MET des huit synthèses de nanorubans de titanates réalisées dans les mêmes conditions (440 mg TiO₂ P25, 110 mL solution soude 10M, étape de sonication (30 min, 375 W), 180°C, 20h, 7 bar, 150 tours.min⁻¹).

D'après les analyses réalisées en DRX (figure 69), les nanorubans présentent également des structures identiques d'une synthèse à l'autre. Pour chaque synthèse, le diffractogramme correspond à la signature des nanorubans pouvant être assimilés à Na_xH_{2-x}Ti₃O₇ ou à Na_yH_{2-y}Ti_nO_{2n+1}, xH₂O. Les deux premiers pics caractéristiques, correspondant à la part de nanofeuilles et de nanorubans synthétisés, indiquent que la distance interréticulaire des plans atomiques constituant ses deux nanostructures vaut $d = 1,05 \pm 0,01$ nm et $d = 0,81 \pm 0,01$ nm pour toutes les synthèses. En revanche, de faibles variations d'intensité sur les autres pics caractéristiques sont notables. Cela laisse penser que la cristallinité des nanorubans de titanates fluctue légèrement d'une synthèse à l'autre.

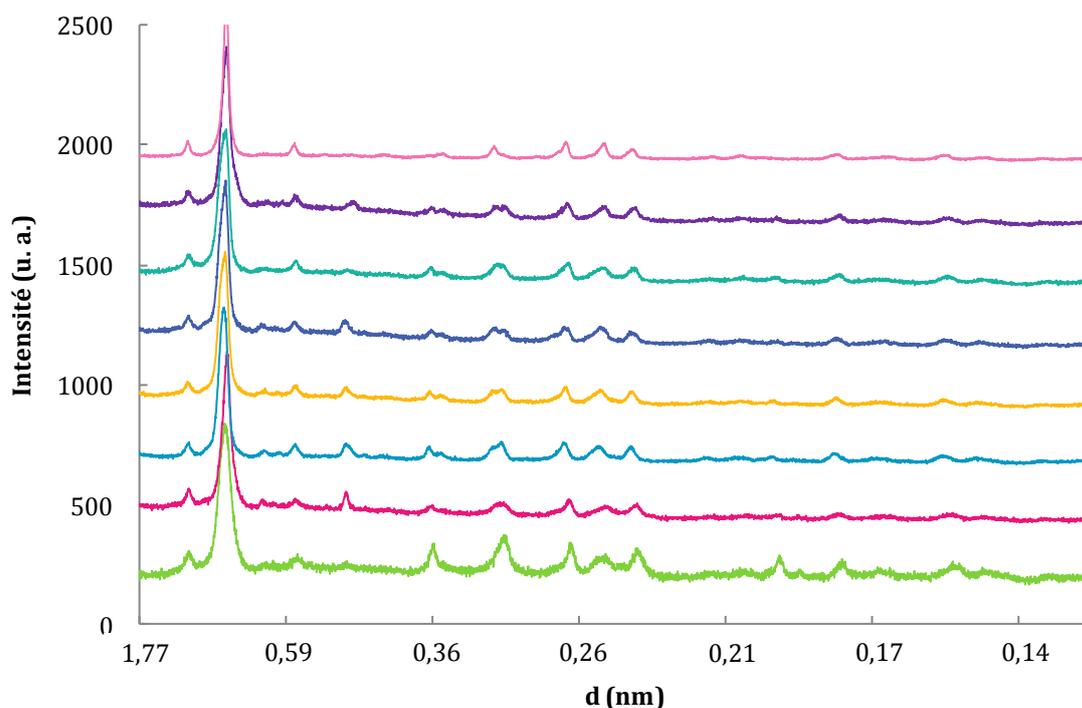


Figure 69 : Diffractogrammes des nanorubans de titanates synthétisées par traitement hydrothermal (440 mg TiO₂ P25, 110 mL solution de soude 10M, étape de sonication (30 min, 375 W), 180°C, 20h, 7 bar, 150 tours.min⁻¹).

Au niveau de la composition chimique, les analyses réalisées en XPS montrent que la synthèse idéale de nanorubans de titanates par traitement hydrothermal est reproductible. En effet, pour toutes les synthèses, la teneur en titane est de $15 \pm 2\%$, la proportion d'oxygène de $58 \pm 3\%$, la part de carbone atteint les $21 \pm 1\%$ et la teneur en sodium équivaut à $6 \pm 1\%$. La participation des atomes de carbone aux pollutions de type C-C et C-H ainsi qu'aux liaisons C-O et C=O est identique d'une synthèse à l'autre. La participation des atomes O²⁻ à l'oxygène de structure, aux groupements hydroxyles et à l'eau de structure reste également constante pour toutes les synthèses.

Les différentes analyses réalisées ont montré que la synthèse de nanorubans de titanates par traitement hydrothermal est reproductible sur le plan morphologique, structural et chimique. Cependant, la synthèse de nanorubans par traitement hydrothermal reste sensible. Il est alors impératif de se placer à chaque fois dans des conditions rigoureusement identiques.

I.5.2 Elimination des contaminants et sous produits de synthèse présents

La commercialisation de nanoparticules dans le domaine biomédicale impose des normes de qualité strictes, notamment au niveau de la pureté du produit. Le taux d'impuretés maximum toléré est de 3% et s'il dépasse les 1%, il est impératif de connaître la nature et la taille de ces impuretés (Eaton. 2011).

L'observation au MET de la synthèse idéale de nanorubans de titanates par traitement hydrothermal, indique la présence d'impuretés dans un taux estimé à 10% en rapport de surface (figures 70a, b et c). Ces impuretés, sous forme de boulettes, présentent des dimensions comprises entre 0,5 et 10 μm .

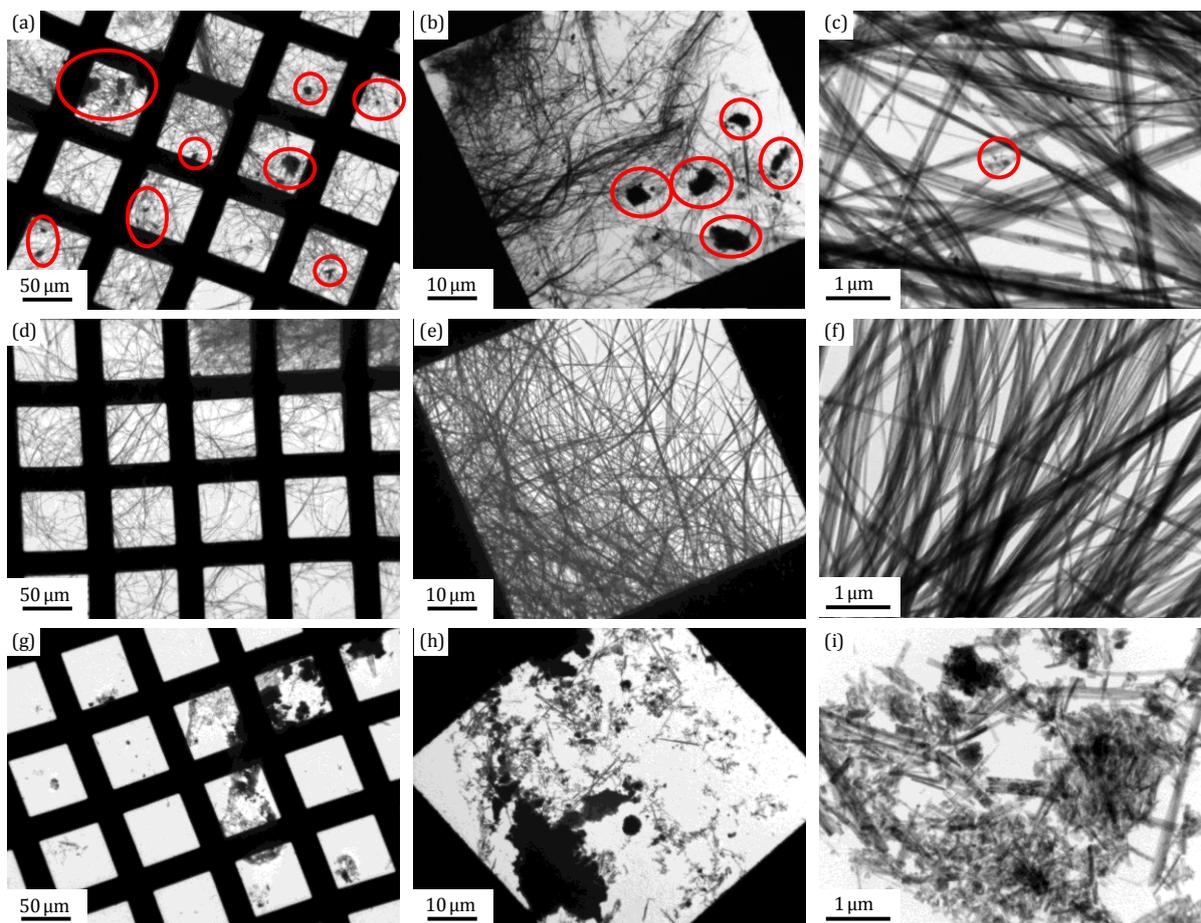


Figure 70 : Clichés MET (a, b et c) du précipité entier, (d, e et f) de la partie filandreuse du précipité et (g, h et i) de la partie granuleuse du précipité obtenus en sortie de synthèse de nanorubans de titanates après les étapes de lavage et de lyophilisation (440 mg TiO_2 P25, 110 mL solution soude 10M, étape de sonication (30 min, 375 W), 180°C, 20h, 7 bar, 150 tours.min^{-1}).

D'après les analyses chimiques localisées réalisées par EDS, ces impuretés ne correspondent pas à du précurseur de TiO_2 non transformé puisqu'elles ont exactement la même composition chimique que les nanorubans. Cependant, ces impuretés sont tellement denses qu'il est très difficile de savoir, même en haute résolution, si elles sont constituées de nanorubans fortement agglomérés entre eux, ou s'il s'agit de nanostructures à part entière. Leur taux de présence étant largement supérieur au seuil toléré, il devient indispensable d'éliminer les impuretés présentes dans le produit de synthèse. Pour tenter de réduire la proportion d'impuretés, les deux aspects, filandreux et granuleux, du précipité ont été séparés en sortie de synthèse juste avant les étapes de lavage et de lyophilisation. Il est assez facile de dissocier les deux aspects du précipité puisque la partie filandreuse se dépose sur les éléments plongeants du réacteur ainsi que sur les parois du bol en Téflon. La partie granuleuse reste quant à elle, en suspension dans la solution de soude (figure 71).

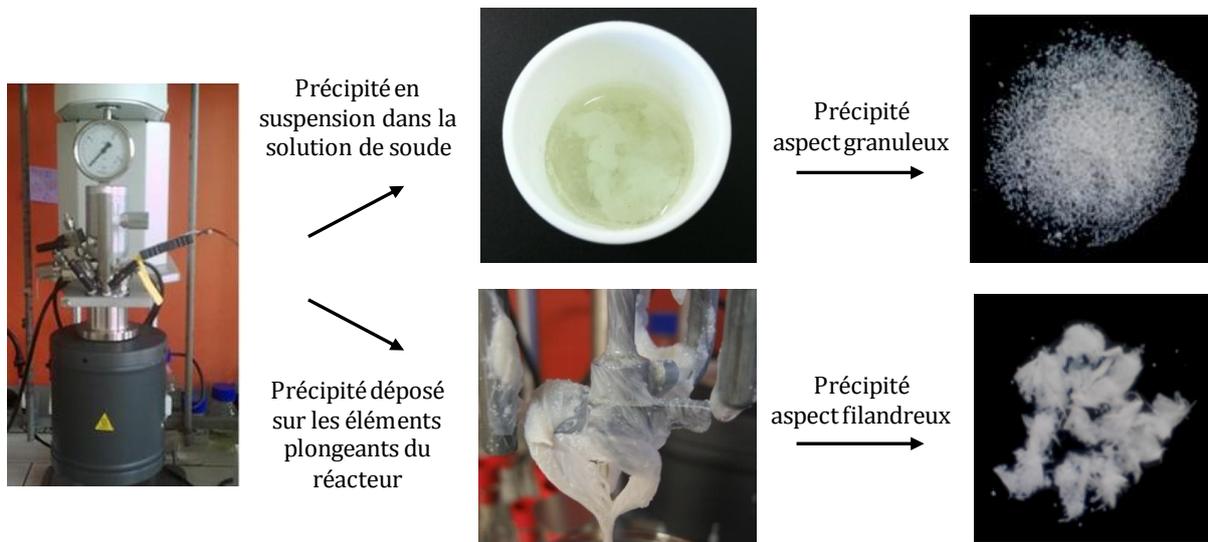


Figure 71 : Photos de l'aspect granuleux et filandreux du précipité obtenu en sortie du traitement hydrothermal juste avant les étapes de lavage et de lyophilisation.

Les observations réalisées au MET indiquent que la partie filandreuse du précipité est constituée de nanorubans et contient un taux d'impuretés inférieur à 1% en rapport de surface (figures 70d, e et f) alors qu'en revanche, la partie granuleuse du précipité ne contient quasiment que des impuretés ainsi que quelques fragments de nanorubans (figures 70g, h et i).

Pour pouvoir utiliser les nanorubans de titanates dans le domaine biomédical, il est alors nécessaire de conserver uniquement la partie filandreuse du précipité formé. Bien que le taux d'impuretés soit désormais inférieur à 1% en rapport de surface, des analyses plus approfondies ont tout de même été réalisées, dans le but d'en savoir un peu plus sur la structure et la composition chimique de ces impuretés. Des analyses réalisées par DRX, montrent que la signature de la partie filandreuse du précipité coïncide avec celle des nanorubans (figure 72). La partie granuleuse du précipité, correspondant d'après les observations MET aux impuretés, présente également une signature semblable à celle des nanorubans. Les impuretés seraient alors sans doute des nanorubans fortement agglomérés sous forme de pelotes. La signature de la partie granuleuse présente cependant trois pics caractéristiques, situés à $d = 0,66$; $0,62$ et $0,47 \pm 0,01$ nm, qui n'apparaissent pas dans la signature de la partie filandreuse. Les nanorubans présenteraient alors une structure légèrement différente lorsqu'ils sont organisés en réseaux et lorsqu'ils sont fortement agglomérés. La signature de la totalité du précipité coïncide quant à elle, à la somme des signatures des deux aspects du précipité. Les pics caractéristiques de la partie granuleuse se retrouvent sur la signature du précipité en entier, preuve supplémentaire que le taux d'impuretés est significatif dans le produit de synthèse.

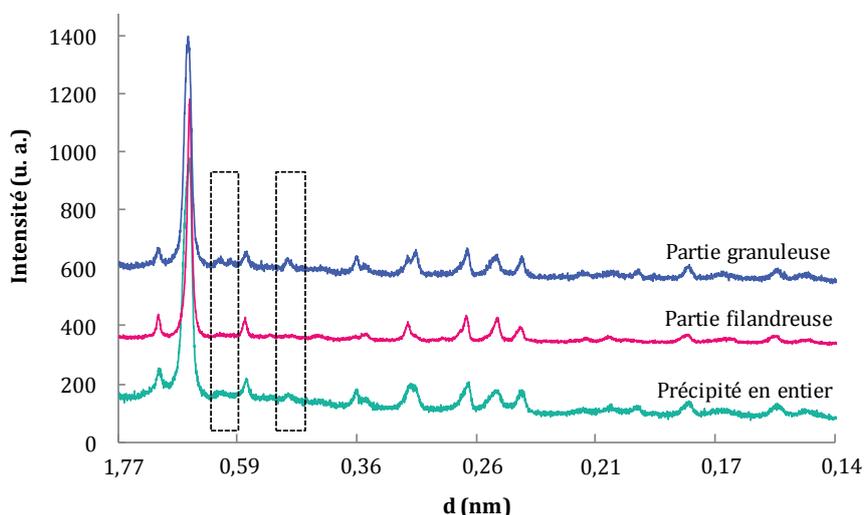


Figure 72 : Diffractogramme du précipité entier, de la partie filandreuse du précipité et de la partie granuleuse du précipité obtenus en sortie de synthèse de nanorubans de titanates après les étapes de lavage et de lyophilisation (440 mg TiO₂ P25, 110 mL solution soude 10M, étape de sonication (30 min, 375 W), 180°C, 20h, 7 bar, 150 tours.min⁻¹).

Les analyses réalisées en XPS montrent que la partie granuleuse et la partie filandreuse ont des compositions chimiques globales identiques (tableau 16). Ce résultat tend à confirmer que les impuretés sont des nanorubans de titanates fortement agglomérées. La désomation des niveaux 1s du carbone et de l'oxygène donne également des résultats très proches.

	Carbone (± 1%)	Sodium (± 1%)	Oxygène (± 1%)	Titane (± 1%)	Na ⁺ /Ti ⁴⁺	O ²⁻ /Ti ⁴⁺	OH ⁻ /Ti ⁴⁺
Précipité entier	22	8	55	16	0,5	2,06	0,81
Partie filandreuse	23	4	59	14	0,29	2,5	1
Partie granuleuse	21	5	58	15	0,33	2,4	0,87

	C-C et C-H (± 1%)	C-O (± 1%)	C=O et O-C=O (± 1%)	O ²⁻ (± 1%)	OH ⁻ et C=O (± 1%)	H ₂ O et C-O (± 1%)	Na _{Auger} (± 1%)
Précipité entier	13	6	3	33	13	7	2
Partie filandreuse	14	7	2	35	14	8	2
Partie granuleuse	14	5	2	36	13	7	2

Tableau 16 : Proportion atomique XPS des différents éléments chimiques constituant le précipité entier, la partie filandreuse du précipité et la partie granuleuse du précipité obtenus en sortie de synthèse de nanorubans de titanates après les étapes de lavage et de lyophilisation (440 mg TiO₂ P25, 110 mL solution de soude 10M, étape de sonication (30 min, 375 W), 20h, 180°C, 7 bar, 150 tours.min⁻¹).

Pour commercialiser les nanorubans de titanates, il était indispensable d'éliminer les impuretés en ne conservant que la partie filandreuse du précipité, ceci dans le but d'obtenir un produit homogène respectant les normes de pureté imposées par le domaine biomédical. De plus, la forme et la taille des impuretés observées les rendent *a priori* aptes à être internalisées par les cellules (Gratton *et al.* 2008, Mailander *et al.* 2009), ce qui pourrait engendrer une toxicité non désirée du produit. Un protocole permettant de les éliminer efficacement a été mis en place. Par ailleurs, ces impuretés résiduelles (taux < 1%) ont été caractérisées pleinement et sont de composition et de structure semblable aux nanorubans en réseaux.

I.6 Conclusion sur l'élaboration des nanorubans de titanates

Les travaux réalisés dans ce premier chapitre de thèse ont montré qu'il est possible de synthétiser des nanorubans de titanates par traitement hydrothermal d'un précurseur pulvérulent de TiO_2 en milieu fortement basique. Cependant, pour avoir un contrôle sur les caractéristiques morphologiques, structurales et chimiques des nanorubans, il est nécessaire de maîtriser les différents paramètres et conditions de synthèse. Pour obtenir des nanorubans de titanates de dimensions homogènes, avec une largeur comprise entre 100 et 200 nm pour une longueur de plusieurs dizaines de micromètres et présentant une structure cristallographique et une composition proches de $\text{Na}_y\text{H}_{2-y}\text{Ti}_n\text{O}_{2n+1} \cdot x\text{H}_2\text{O}$, deux réactifs sont nécessaires :

- un précurseur pulvérulent de TiO_2 commercial de type P25 présentant une taille de grains aux alentours de 25 nm,
- une solution de soude de concentration 10M.

Une étape de sonication de 30 minutes à la canne à ultrasons de ces réactifs est impérative car elle permet d'homogénéiser les dimensions des nanorubans. Les paramètres du traitement hydrothermal sont quant à eux :

- une température de 180°C,
- un temps de réaction de 20h,
- une pression autogène d'environ 7 bar,
- une agitation mécanique à une vitesse de 150 tours.min⁻¹.

Un refroidissement brutal et un lavage acide du précipité obtenu en sortie de synthèse ne sont pas nécessaires à l'obtention de nanorubans de titanates. Ces étapes modifient même considérablement la structure et la composition chimique des nanorubans, introduisant ainsi plus d'inconnues (nouvel état cristallin, surstructure...) et ne sont donc pas recommandées.

Les différents travaux réalisés ont également permis de proposer un mécanisme de formation des nanorubans par traitement hydrothermal. Ce mécanisme explique la transformation des nanotubes en nanorubans au cours du temps. Des études complémentaires devront cependant être réalisées pour valider certaines étapes expliquant le changement morphologique.

Par ailleurs, pour la première fois, l'épaisseur des nanorubans a été déterminée. Pour cela, différentes méthodes de mesure ont été développées au laboratoire et une technique de reconstruction 3D ont été utilisées. Leur épaisseur est au final comprise entre 3 et 40 nm alors que leur largeur varie de 100 à 200 nm et leur longueur atteint plusieurs dizaines de micromètres. Il a par ailleurs été démontré que les nanorubans de titanates sont une super-structure constituée d'un assemblage de plusieurs rubans de dimensions plus petites (largeur comprise entre 100 et 150 nm pour une longueur de quelques micromètres seulement).

Enfin, dans le but de pouvoir commercialiser les nanorubans de titanates, la reproductibilité de leur synthèse par traitement hydrothermal a été prouvée. De plus, la pureté de la synthèse a été augmentée par élimination de sous-produits non désirés. Actuellement, la synthèse de nanorubans de titanates par traitement hydrothermal est reproductible et pure à 99%.

*Chapitre II : Fonctionnalisation des
nanorubans de titanates par un polymère
synthétique permettant un greffage ciblé de
protéines*

Ce deuxième chapitre est consacré à la conception d'un nouveau nanobiohybride destiné à la nanomédecine. Dans un premier temps, la synthèse d'un polymère hétérobifonctionnel est décrite. Différentes approches et techniques ont été testées dans le but de déterminer les meilleures conditions de réaction permettant l'élaboration de ce polymère. Puis, une fois synthétisé, ce polymère a été utilisé pour la fonctionnalisation des nanorubans de titanates. L'influence de différents paramètres, comme la nature et le volume du solvant, la quantité de réactifs et le temps de réaction, sur le greffage du polymère en surface des rubans a été étudiée. Dans le but de comparer les propriétés et la réactivité du polymère synthétisé au laboratoire avec des polymères commerciaux, ces derniers, présentant des groupements fonctionnels identiques ou différents, ont également été utilisés pour la fonctionnalisation des nanorubans. Enfin, les premiers essais de greffage ciblé de protéines en surface des nanorubans fonctionnalisés ont été réalisés.

II.1 Un nouveau nanobiohybride destiné à la nanomédecine

L'objectif de ce travail de thèse est de concevoir un nouveau nanobiohybride à base de nanorubans de titanates pour la régénération et l'ingénierie tissulaire. Ce nanobiohybride sera constitué de trois éléments de nature différente. Les nanorubans de titanates, le composant inorganique, constituent la base du nouveau nanobiohybride (chap. 1). Ils offrent l'avantage de s'organiser en formant une matrice en 3 dimensions mimant la structure et l'architecture de la matrice extracellulaire (figure 73).

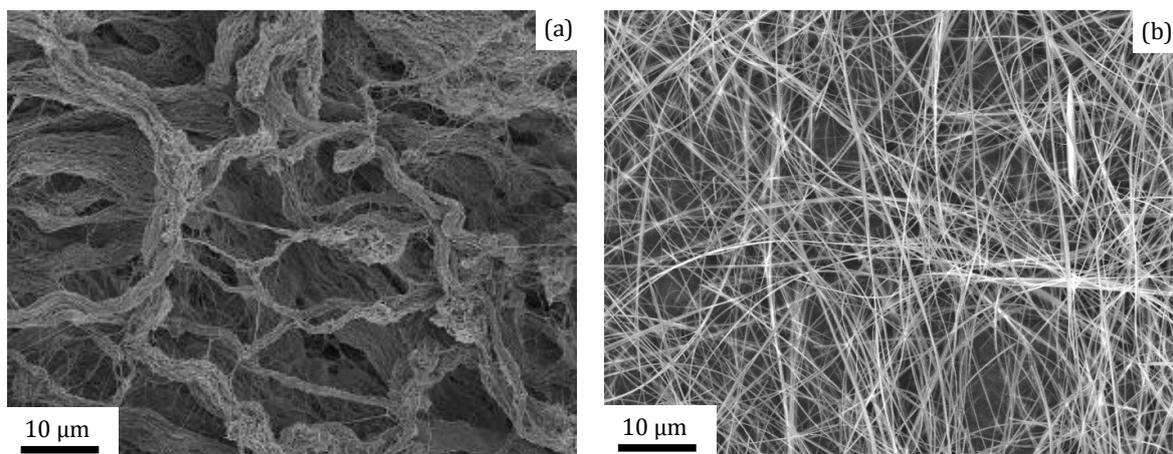


Figure 73 : Clichés MEB illustrant le biomimétisme structural et architectural entre (a) la matrice extracellulaire de fibroblastes d'après (Wolf *et al.* 2012) et (b) les nanorubans de titanates.

Pour obtenir un biomimétisme complet, ce réseau ne doit pas former uniquement un support physique. Il doit également être capable de délivrer ou d'être couplé à des agents bioactifs permettant l'adhésion, la prolifération et la différenciation cellulaire nécessaire à la régénération et l'ingénierie tissulaire (Zhang *et al.* 2012) (figure 74).

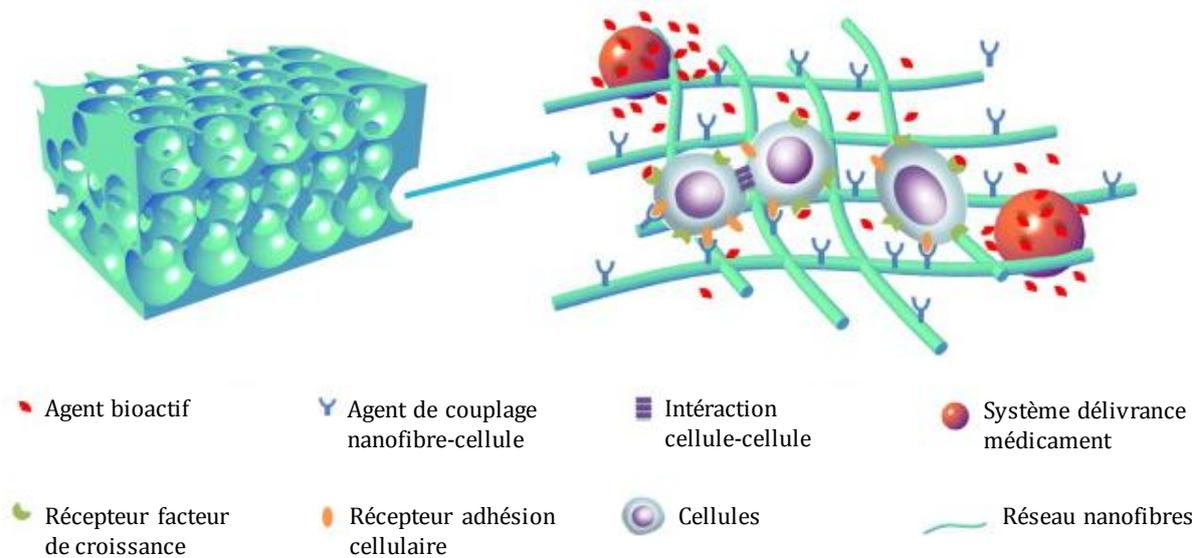


Figure 74 : Schéma d'un réseau de nanofibres présentant un biomimétisme avec la matrice extracellulaire et possédant dans sa structure des agents bioactifs permettant l'ostéogénèse d'après (Zhang *et al.* 2012).

La surface des nanorubans de titanates doit alors être modifiée et fonctionnalisée par un polymère hétérobifonctionnel pour favoriser les interactions avec les cellules (figure 75). Ce polymère sera la composante organique du nanobiohybride (paragraphe II.3). Il jouera le rôle d'agent de couplage entre les nanorubans de titanates et un agent bioactif présentant des sites de liaison à des récepteurs cellulaires. Généralement, ces molécules sont des facteurs de croissance (Richardson *et al.* 2001, Zhang *et al.* 2012), des acides nucléiques (Shea *et al.* 1999, Zhang *et al.* 2012) ou des ligands se combinant aux intégrines (Hern *et al.* 1998, Zhang *et al.* 2012). Dans notre cas, l'agent bioactif jouant le rôle de composant biologique du nanobiohybride sera du collagène. Cette protéine, constituant 30% des tissus humains, est réputée pour ces propriétés de biodégradabilité et de biocompatibilité (Abraham *et al.* 2008). Le collagène présente dans sa structure des motifs peptidiques qui permettent l'activation et l'adhésion de cellules, telles que les plaquettes, qui jouent un rôle essentiel dans la phase initiale du processus de cicatrisation (paragraphe III.1) (Cejas *et al.* 2007). Plus largement, il permet l'attachement, la croissance, la différenciation et la prolifération cellulaire (Ruszczak. 2003) notamment lorsqu'il recouvre des surfaces de titane (Morra *et al.* 2003). Le collagène utilisé pour la formation du nanobiohybride est synthétisé par NVH Medicinal. C'est un collagène issu de l'assemblage par ingénierie de motifs peptidiques d'intérêt (collagène-like) qui se combine au polymère par un greffage ciblé (paragraphe II.6). Le couplage entre les nanorubans et le collagène par l'intermédiaire du polymère favorise la création d'un réseau de fibres de protéines (figure 75). La formation de ce réseau devrait permettre d'augmenter la surface de contact entre le collagène et les cellules. Le nanobiohybride ainsi formé va permettre l'adhésion et la prolifération cellulaire favorisant *in fine* la cicatrisation et la régénération tissulaire (figure 75). Ce nouveau modèle est destiné principalement à des patients diabétiques présentant des processus de cicatrisation et de régénération défectueux.

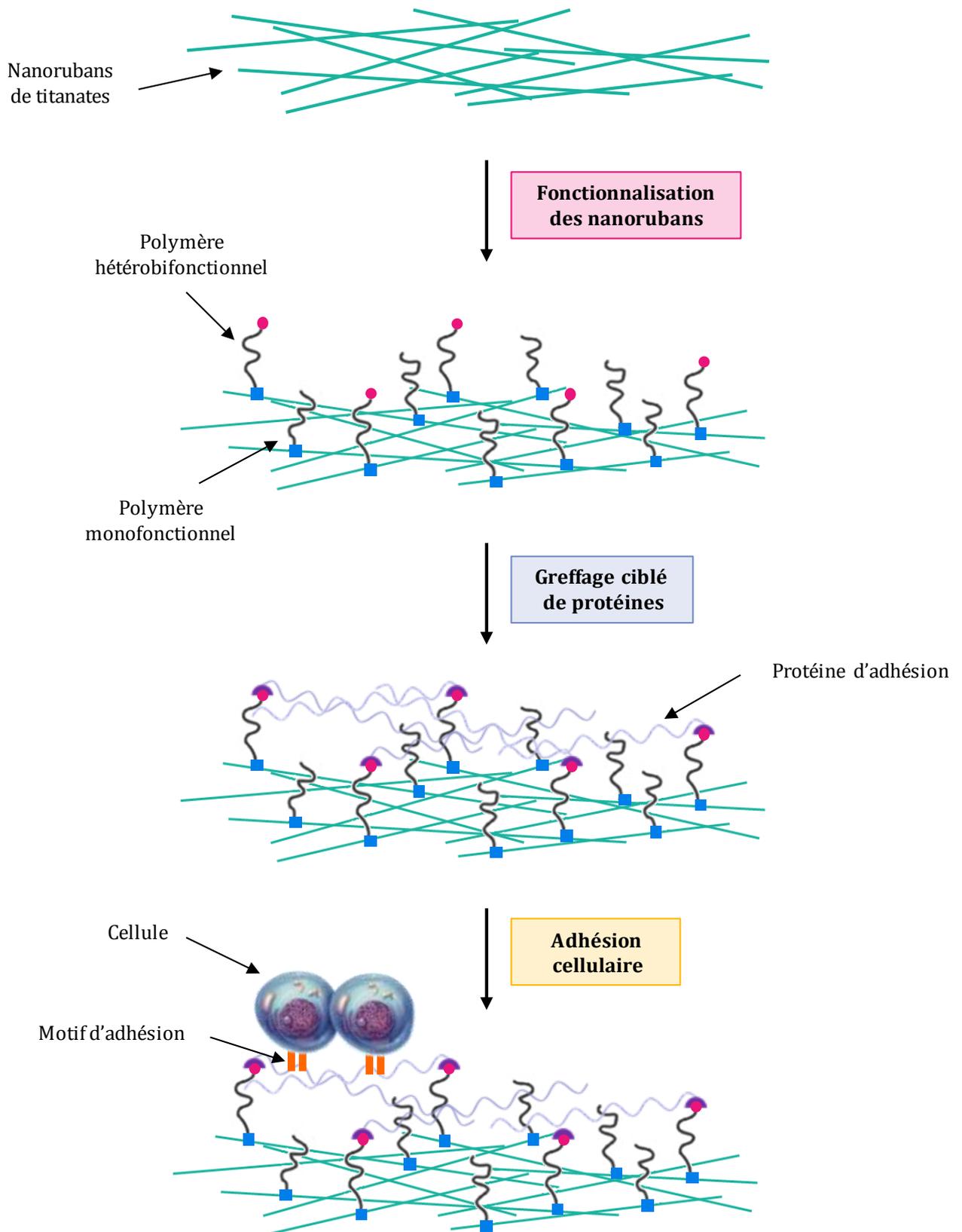


Figure 75 : Schéma décrivant les différentes étapes de la formation d'un nouveau nanobiohybride destiné à la régénération et l'ingénierie tissulaire.

II.2 Conception d'un PEG hétérobifonctionnel

Différents type de polymères sont utilisés pour fonctionnaliser les nanoparticules destinées à être utilisées dans le domaine biomédical (Tian *et al.* 2012). Cependant, les polymères les plus fréquemment utilisés sont la PolyEthylèneImine (PEI) (Brownlie *et al.* 2004, Demeneix *et al.* 2005, Papa. 2009, Patnaik *et al.* 2010, Liu *et al.* 2010) et le PolyEthylène Glycol (PEG) (Knop *et al.* 2010, Amoozgar *et al.* 2012). Dans ce travail, nous avons choisi d'utiliser le PEG pour la fonctionnalisation des nanorubans de titanates du fait de ses nombreuses propriétés décrites ci-après.

II.2.1 Le PEG : un polymère aux propriétés particulières pour des applications biomédicales

Le PEG est un polymère linéaire qui présente des propriétés uniques d'hydrophilicité, de flexibilité, de haut volume d'exclusion, de non toxicité et de non immunogénicité (Harris. 1992) (figure 76).

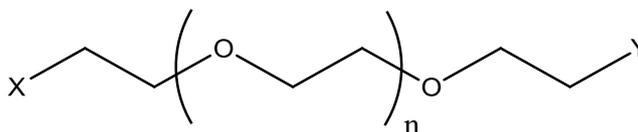


Figure 76 : Structure chimique du PEG hétérobifonctionnel (X, Y) permettant la fonctionnalisation de nanoparticules destinées à des applications biomédicales.

Il possède également des propriétés remarquables de pharmacocinétique et de biodistribution (Yamaoka *et al.* 1994, Zalipsky. 1995). La fonctionnalisation par le PEG favorise la stabilité de suspensions et la dispersion des nanoparticules dans les solvants aqueux et organiques. En effet, la présence du polymère provoque un encombrement stérique qui inhibe le phénomène d'agglomération (Zhao *et al.* 2009). Le greffage du PEG en surface des nanoparticules permet également de limiter le phénomène de bio-encrassement provenant de l'adsorption et de l'adhésion non spécifique de protéines et de cellules lorsque les nanoparticules sont introduites dans un organisme (Van Wachem *et al.* 1987, Bozzini *et al.* 2009). Pour optimiser le caractère anti-adhésif du PEG envers les protéines et les cellules, le polymère doit être greffé en surface des nanoparticules par formation de liaisons covalentes (Seongbong *et al.* 2000). Enfin, la fonctionnalisation par le PEG rend les nanoparticules furtives. Elles ne seront pas reconnues par les anticorps et les macrophages et ne seront donc pas éliminées par le système immunitaire. En effet, en présence de ce polymère, le processus biochimique d'opsonisation, permettant la reconnaissance et l'éviction de particules par les phagocytes, est évité (Alexis *et al.* 2008, Romberg *et al.* 2008). Bien que le PEG soit un polymère présentant des propriétés remarquables pour des applications biomédicales, son principal inconvénient est qu'il est non biodégradable (Knop *et al.* 2010) mais excrétable (Deshmukh *et al.* 2010).

Les propriétés uniques du PEG en font un excellent candidat pour la fonctionnalisation des nanorubans de titanates destinés à des applications biomédicales. La masse molaire choisie sera d'environ 5000 Da. Ce choix s'explique par le fait que lorsqu'une protéine est couplée à une nanostructure par l'intermédiaire d'un linker en polymère, la chaîne du polymère doit atteindre une longueur suffisante pour que les propriétés de la protéine ne soient pas altérées par la présence de la nanostructure. Avec une longueur de chaînes moyenne de 5000 Da, la protéine devrait conserver son activité et sa réactivité (Li *et al.* 2009).

II.2.2 Hétérobifonctionnalité : le choix des deux groupements fonctionnels du polymère

Le PEG, le composant organique du nanobiohybride, joue le rôle d'agent de couplage entre les nanorubans de titanates et le collagène synthétisé par NVH Medicinal. Le polymère doit donc présenter à ces extrémités des groupements fonctionnels pouvant se lier aux deux entités : il doit être bifonctionnel. De plus, pour limiter tous couplages non désirés et avoir un contrôle sur la constitution du nanobiohybride, le PEG doit présenter des groupements fonctionnels terminaux différents : il doit être hétérobifonctionnel. Cela permettra d'éviter que les deux extrémités du polymère ne se greffent sur la même entité. Dans ce cas, le PEG ne jouerait plus le rôle d'agent de couplage mais agirait comme un agent réticulant. L'affinité entre les groupements fonctionnels terminaux du polymère doit être également faible pour limiter l'auto-condensation du PEG par interaction entre ces deux extrémités.

La surface des nanorubans de titanates étant recouverte de groupements hydroxyle (paragraphe I.3.2, tableau 9), il semble judicieux d'introduire sur l'une des extrémités du PEG un groupement silane présentant une forte affinité avec les OH-. Ainsi, le couplage Si-OH se fait par greffage covalent caractérisé par la formation de liaisons stables et fortes (figure 77) (De Palma *et al.* 2007). La formation des liaisons Ti-O-Si par l'intermédiaire d'un organoalcoxysilane se déroule en plusieurs étapes. La première réaction qui a lieu est l'hydrolyse des groupements alcoxy conduisant à l'obtention de silanols réactifs. Cette étape, qui permet d'initier et d'activer le greffage, est suivie par une réaction de condensation intramoléculaire des silanols par formation de liaisons siloxanes Si-O-Si. Durant cette étape, deux réactions peuvent se produire : une réaction d'oxolation correspondant au départ de molécules d'eau ou une réaction d'alcoxolation correspondant au départ d'alcool. Enfin, les silanols libres vont se condenser sur les hydroxyles présents en surface des nanorubans par formation de liaisons covalentes (figure 77) (De Monredon. 2004).

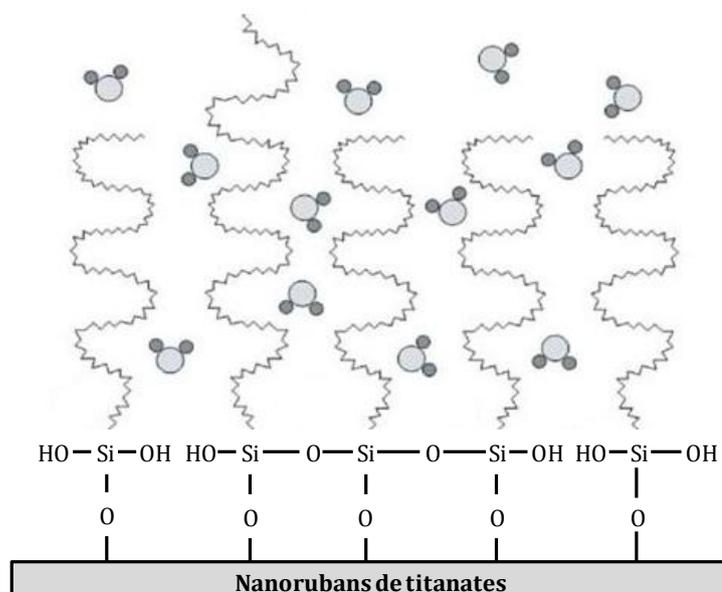


Figure 77 : Schéma illustrant le greffage covalent d'un polymère en surface des nanorubans de titanates par l'intermédiaire du couplage Si-OH.

Sur l'autre extrémité du PEG, il est nécessaire d'introduire un groupement fonctionnel différent permettant un greffage ciblé sur le collagène produit par NVH Medicinal. D'après les données bibliographiques, le greffage entre un PEG et une protéine ou un peptide peut se faire par l'intermédiaire du groupement RGD (Tosatti *et al.* 2003, Hansson *et al.* 2005, Bertram *et al.* 2009). Le motif RGD est un groupe de trois acides aminés -Arg-Gly-Asp- (arginine-glycine-acide aspartique) présentant une forte affinité avec les intégrines, les motifs d'adhésion cellulaires contenus dans de nombreuses protéines (Hersel *et al.* 2003, Zhang *et al.* 2006, Barczyk *et al.* 2009). Cependant, le collagène synthétisé par NVH présente la particularité de ne posséder dans sa séquence d'acides aminés qu'une seule et unique cystéine (paragraphe III.2). Il semble alors plus judicieux d'utiliser cet acide aminé particulier pour réaliser un greffage contrôlé et ciblé entre le collagène et le polymère. Les cystéines sont réputées pour avoir une forte affinité avec les groupements maléimide (Mal). Le couplage Mal-Cys se fait par formation d'un pont thioéther entre les groupements maléimide et les groupements -SH contenus dans la structure des cystéines (Zimmermann *et al.* 2010).

Pour la conception du nanobiohybride, il est alors nécessaire d'utiliser un Si-PEG-Mal. La société Nanocs aux Etats-Unis est actuellement la seule, à notre connaissance, à commercialiser ce PEG hétérobifonctionnel avec un taux de pureté de 85%. Pour ne pas dépendre de cette société pour la conception du nanobiohybride et pour avoir une connaissance précise des sous-produits formés lors de l'élaboration du Si-PEG-Mal, la synthèse de ce polymère a été réalisée au laboratoire en collaboration avec l'Institut de Chimie Moléculaire de l'Université de Bourgogne (ICMUB). Pour cette synthèse, un autre PEG hétérobifonctionnel a été utilisé : le HO-PEG₅₀₀₀-NH₂ (figure 78), plus classique et donc plus répandu chez plusieurs fournisseurs.

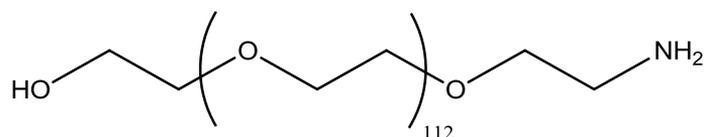


Figure 78 : Structure chimique du HO-PEG₅₀₀₀-NH₂ utilisé pour la synthèse du Si-PEG₅₀₀₀-Mal.

Ce PEG provient de la société allemande IrisBiotech GmbH et possède une pureté de 95%. D'après le fournisseur, les 5% de sous-produits de synthèse correspondent à d'autres PEG hétérobifonctionnels. Cependant, leur composition chimique exacte n'est pas précisée. Sur l'extrémité hydroxyle du HO-PEG-NH₂ sera greffé le groupement silane et sur l'extrémité amine, le groupement maléimide. Le groupement silane ayant une affinité avec les deux extrémités du PEG, le groupement maléimide devra être greffé en premier pour éviter une étape de protection/déprotection du groupement amine pour orienter le greffage du silane uniquement sur l'extrémité hydroxyle du polymère (Ehteshami *et al.* 1997). A moyen terme, le HO-PEG-NH₂ pourra également être synthétisé au laboratoire.

II.3 Synthèse d'un PEG hétérobifonctionnel : le Si-PEG₅₀₀₀-Mal

La synthèse du PEG hétérobifonctionnel Si-PEG-Mal se déroule en plusieurs étapes. Le greffage du groupement maléimide sur l'extrémité amine du HO-PEG-NH₂ correspond à la première étape de synthèse et le greffage du groupement silane sur l'extrémité hydroxyle du HO-PEG-NH₂ correspond à la seconde.

II.3.1 Détermination des meilleures conditions de greffage du groupement maléimide

Pour greffer le groupement maléimide sur l'extrémité NH₂ du PEG, deux approches différentes ont été testées. Pour la première approche, l'introduction du groupement maléimide s'est faite par l'intermédiaire de l'acide-4-maléimido butanoïque alors que pour la seconde approche, du succinimido-4-maléimido benzoate a été utilisé (figure 79).

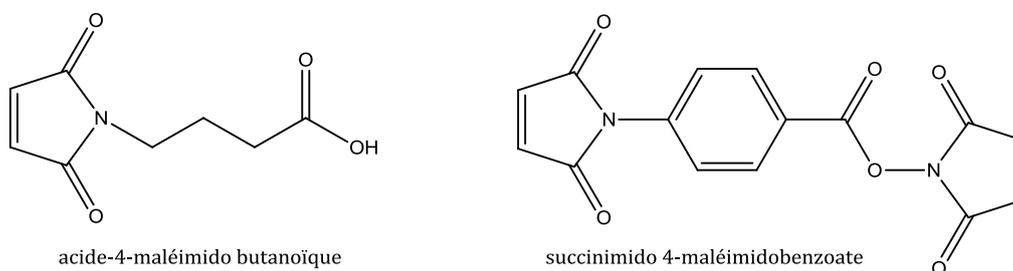


Figure 79 : Structure chimique de l'acide-4- maléimido butanoïque et du succinimido-4-maléimidobenzoate utilisé pour la synthèse du Si-PEG-Mal, tous deux synthétisés à l'ICMUB.

Pour chaque approche, l'accroche du groupement succinimido-4-maléimido benzoate s'effectue prioritairement au niveau de la fonction amine primaire du HO-PEG-NH₂ qui est plus nucléophile que l'hydroxyle et donc beaucoup plus réactive vis-à-vis de l'ester activé. Pour contrôler la sélectivité du greffage du maléimide sur l'extrémité NH₂ du PEG il est donc inutile de protéger le groupement terminal hydroxyle. Cependant, il est préférable d'éviter un temps de réaction trop long et une quantité de réactif trop élevée.

II.3.1.1 Utilisation de l'acide-4-maléimido butanoïque

L'acide-4-maléimido butanoïque est un acide linéaire qui a été synthétisé à l'ICMUB. Pour cela, de l'anhydride maléique a été ajouté en proportion molaire identique à de l'acide aminé en présence d'acide acétique (figure 80). Les différents réactifs ont été agités à 700 tours.min⁻¹ à une température de 20°C pendant une durée de 8h. Une fois la réaction terminée, une étape de filtration suivie d'une dissolution à reflux dans l'eau sont nécessaires pour former un précipité d'acide-4-maléimido butanoïque avec un rendement de 85% (Song *et al.* 2009).

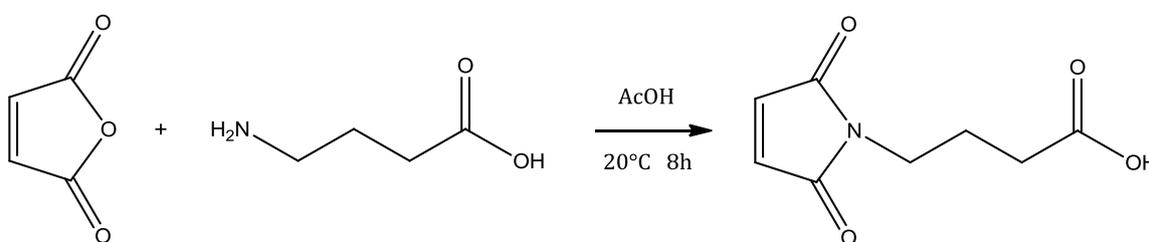


Figure 80 : Réaction chimique illustrant la synthèse de l'acide-4-maléimido butanoïque d'après (Song *et al.* 2009).

Ensuite, pour greffer le groupement maléimide sur l'extrémité amine du PEG de départ, une méthode douce en présence des agents de couplage 1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl) carbodiimide) (EDCI) et l'hydroxybenzotriazole (HOBT) (condition A) a été testée (figure 81).

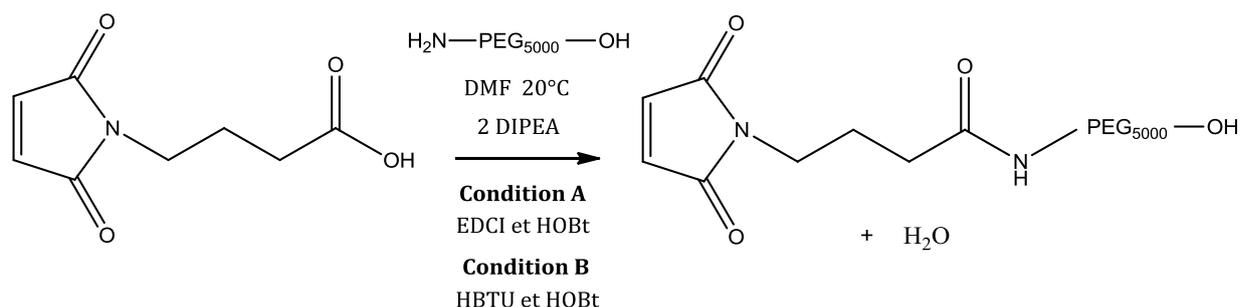


Figure 81 : Réaction chimique illustrant la synthèse du HO-PEG-Mal par l'intermédiaire de l'acide-4-maléimido butanoïque et en utilisant des agents de couplage différents (condition A et condition B).

Ces agents de couplage permettent d'amorcer la réaction en formant un ester activé *in situ*. Une base, la N,N-diisopropyléthylamine (DIPEA), a également été employée pour activer l'amine et la rendre plus réactive. Son utilisation permet de déprotoner l'extrémité NH₂ et de

capturer l'acidité libérée. La réaction s'est déroulée en présence d'un solvant aprotique polaire, le diméthylformamide (DMF), qui est un Cancérigène Mutagène Reprotoxique (CMR) de type 2. Des mesures de protection adaptées à l'utilisation de CMR ont par conséquent été déployées. Le choix de ce solvant s'explique par le fait que l'acide-4-maléimido butanoïque est insoluble dans des solvants moins toxiques comme le tétrahydrofurane (THF) ou le dichlorométhane (CH₂Cl₂) beaucoup moins polaire. Pour obtenir un milieu réactionnel très concentré permettant une cinétique de réaction plus rapide, une concentration élevée de 100 mg.mL⁻¹ a été utilisée. Les conditions de greffage sont les suivantes : un temps de réaction de 16h, une forte agitation magnétique de 700 tours.min⁻¹ permettant d'homogénéiser le milieu réactionnel et de favoriser le contact entre les différents réactifs ainsi qu'une température de 20°C et une pression de 1bar. Enfin, les différents réactifs ont été employés en proportion molaire de 1 : 1. Seule la base a été ajoutée en excès (2 : 1) (tableau 17).

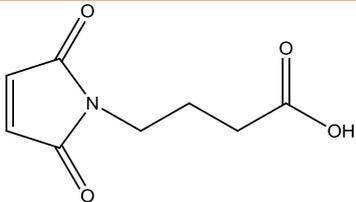
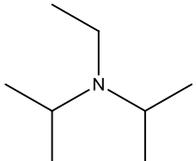
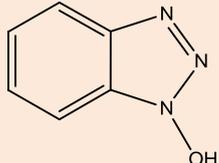
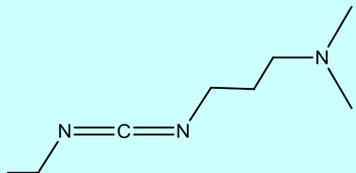
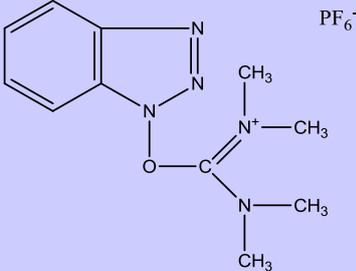
Nom	Formule brute	Structure chimique	M (g.mol ⁻¹)	n (mol)	m (mg)	Rapport molaire (/PEG)
acide-4-maléimido butanoïque	C ₈ H ₉ NO ₄		183,16	1 x 10 ⁻⁵	1,8	1
PEG	HO-PEG ₅₀₀₀ -NH ₂		5000	1 x 10 ⁻⁵	50	-
DIPEA	C ₈ H ₁₅ N		129,25	2 x 10 ⁻⁵	2,6	2
HOBt	C ₆ H ₅ NO ₃		133,15	1 x 10 ⁻⁵	1,3	1
Condition A EDCI	C ₈ H ₁₇ N ₃ , HCl		191,70	1 x 10 ⁻⁵	1,9	1
Condition B HBTU	C ₁₁ H ₁₆ F ₆ N ₅ OP		379,24	1 x 10 ⁻⁴	37,9	10

Tableau 17 : Tableau récapitulatif des différents réactifs intervenant lors de la synthèse du HO-PEG-Mal.

Une fois la réaction terminée, le DMF étant miscible avec des solvants aqueux, de l'eau déionisée a été ajoutée au milieu réactionnel et une série de lyophilisation a permis d'évaporer l'azéotrope eau/DMF et de récupérer le polymère synthétisé. Cette méthode a été préférée à l'utilisation de l'évaporateur rotatif pour éviter la vaporisation du DMF.

Les analyses RMN ^1H (non présentées ici) réalisées sur la poudre obtenue en sortie de synthèse ont montré que le taux de conversion du HO-PEG-NH₂ en HO-PEG-Mal est nul. Le greffage du groupement maléimide sur l'extrémité amine du PEG n'a donc pas fonctionné. Un deuxième essai a alors été réalisé en utilisant un agent de couplage plus réactif. L'EDCI a été remplacé par de l'O-benzotriazole-N,N,N',N'-tetraméthyluronium hexafluorophosphate (HBTU) (condition B) et a été utilisé en large excès (10 : 1). Ces changements ont pour but d'augmenter la réactivité et de favoriser le greffage entre l'amine et le maléimide (figure 81 et tableau 17). D'après la spectroscopie RMN ^1H (non présentées ici), le greffage du groupement maléimide sur l'extrémité NH₂ du PEG a fonctionné mais en faible proportion. Le taux de conversion du HO-PEG-NH₂ en HO-PEG-Mal n'atteint que 10%.

Le rendement insuffisant de ces deux premiers essais de greffage du groupement maléimide sur l'extrémité amine du PEG ont conduit à la réalisation d'une nouvelle approche de greffage.

II.3.1.2 Utilisation du succinimido-4-maléimido benzoate

Le succinimido-4-maléimido benzoate est un ester activé qui a été préalablement synthétisé au sein de l'ICMUB (Fujita *et al.* 1999, Song *et al.* 2009). Pour cela, de l'anhydride maléique a été ajouté en proportion molaire identique à de l'acide aminé en présence de DMF. Après 2h de réaction à une température de 20°C et sous agitation magnétique de 700 tours.min⁻¹, du dicyclohexylcarboxydiimide (DCC) puis du N-hydroxylsuccinimide (NHS) ont été ajoutés au milieu réactionnel. L'ensemble des réactifs ont été laissés dans ces conditions pendant 16h pour former le succinimido-4-maléimido benzoate dans un rendement de 90% (figure 82) (Fujita *et al.* 1999, Song *et al.* 2009).

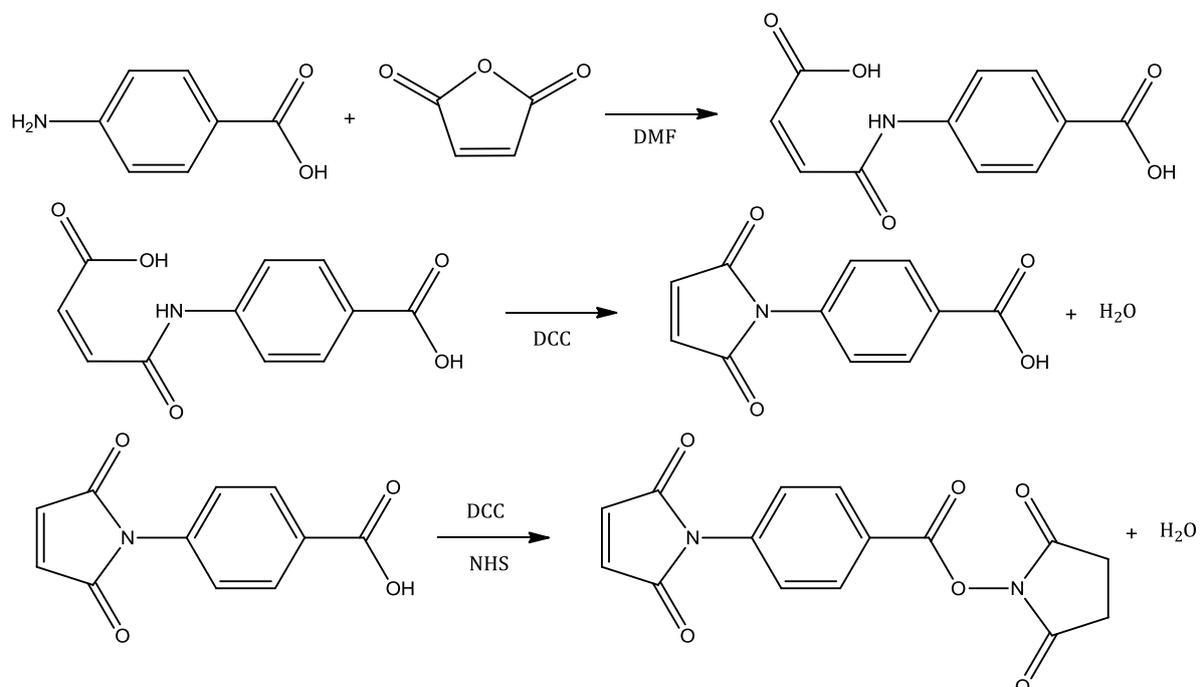


Figure 82 : Réaction chimique illustrant la synthèse du succinimido-4-maléimido benzoate d'après (Song *et al.* 2009).

Le succinimido-4-maléimido benzoate synthétisé est une molécule plus stable que l'acide-4-maléimido butanoïque précédemment utilisé, car il possède dans sa structure un cycle aromatique qui lui confère une plus grande stabilité qu'une chaîne linéaire. De plus, le passage d'une chaîne aliphatique à un cycle aromatique permet d'augmenter la réactivité de l'acide carboxylique. Enfin, le succinimido-4-maléimido benzoate présente l'avantage d'être miscible dans des solvants comme le dichlorométhane qui est moins nocif que le DMF et qui s'élimine plus facilement car sa température d'ébullition est de 41°C (au lieu de 153°C pour le DMF).

Un premier essai de greffage du groupement maléimide sur l'extrémité amine du PEG a été réalisé par réaction entre le succinimido-4-maléimido benzoate et le HO-PEG-NH₂ en présence de dichlorométhane (figure 83 et tableau 18).

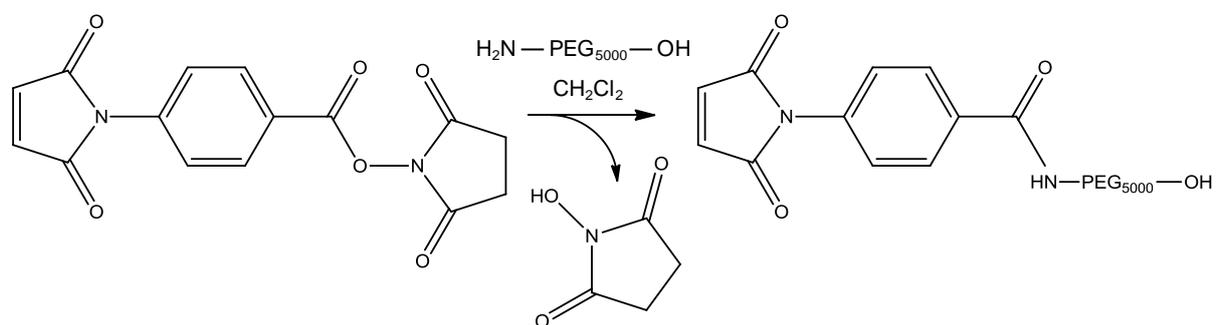


Figure 83 : Réaction chimique illustrant la synthèse du HO-PEG-Mal par l'intermédiaire du succinimido-4-maléimido benzoate.

Les conditions de greffage ont été un rapport molaire des réactifs de 1 : 1, une durée de 16h, une température de 20°C et une forte agitation magnétique de 700 tours.min⁻¹. Une fois la réaction terminée, le solvant a été évaporé à l'aide d'un évaporateur rotatif et le précipité formé a été séché sous vide.

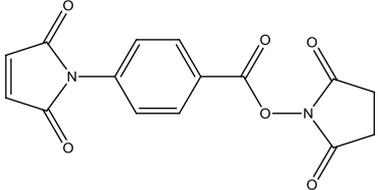
Nom	Formule brute	Structure chimique	M (g.mol ⁻¹)	n (mol)	m (mg)	Rapport molaire (/PEG)
succinimido-4-maléimido benzoate	C ₁₅ H ₁₀ N ₂ O ₆		314,25	1 x 10 ⁻⁵	3,1	1
PEG	HO-PEG ₅₀₀₀ -NH ₂		5000	1 x 10 ⁻⁵	50	-

Tableau 18 : Tableau récapitulatif des différents réactifs intervenant lors de la synthèse du HO-PEG-Mal.

Le spectre RMN ¹H du PEG synthétisé présente neuf pics caractérisables (figure 84). Chaque pic a été attribué à un groupe de protons présent dans le HO-PEG₅₀₀₀-Mal. Le pic caractéristique du couplage entre l'ester activé et le HO-PEG-NH₂, se situe à 6,95 ppm (pic jaune). Il correspond au proton de la liaison amide qui se forme lors du greffage du groupement maléimide sur l'extrémité NH₂ du PEG. Le pic caractéristique des protons du groupement maléimide, présent à la fois sur le spectre du HO-PEG-Mal synthétisé mais également sur celui de l'ester activé, est situé à 6,82 ppm (pic vert turquoise). A 7,40 et 7,88 ppm (pics rose et vert) se trouvent les pics correspondant aux protons du cycle aromatique du HO-PEG-Mal. Ces pics sont décalés vers des déplacements chimiques plus petits par rapport à ceux présents sur le spectre de l'ester activé. Ce décalage s'explique par un changement d'environnement chimique conduisant à une augmentation du blindage des signaux. Enfin, le pic caractéristique des protons du N-hydroxysuccinimide formé lors de la réaction de greffage (pic vert clair) est situé à 2,6 ppm. L'intégration de ces cinq pics donne des nombres de protons différents de ceux attendus théoriquement. Cela signifie que la conversion du HO-PEG-NH₂ en HO-PEG-Mal n'a pas été totale. Après calcul, le taux de greffage du groupement maléimide sur l'extrémité amine du PEG est de 60%. Cela est confirmé par la présence d'ester activé non transformé sur le spectre du HO-PEG-Mal. Ainsi, à 2,82 ; 7,60 et 8,20 ppm se trouvent les pics caractéristiques des protons du groupement succinimide et du cycle aromatique de l'ester activé. L'intégration de ces trois pics confirme que 40% du HO-PEG-NH₂ n'ont pas été convertis en HO-PEG-Mal.

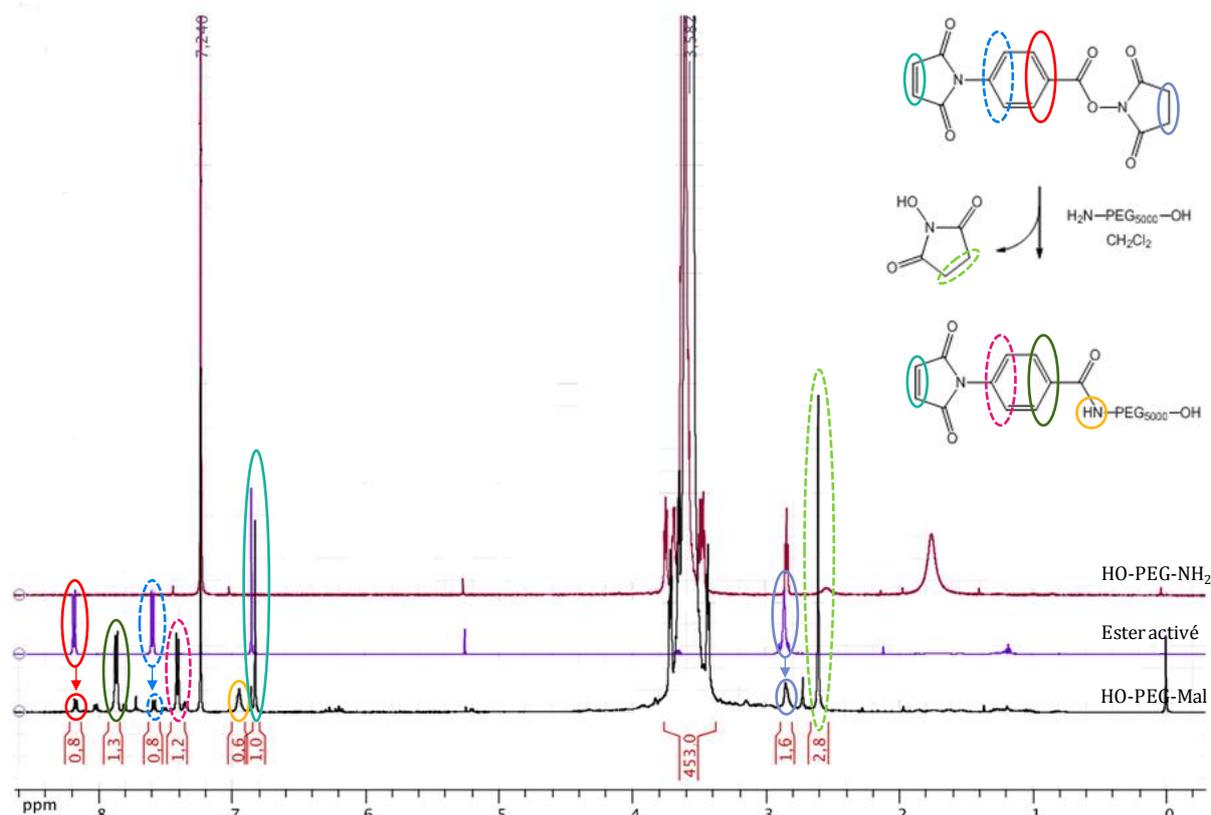


Figure 84 : Spectres RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3 , 293K) du HO-PEG-NH $_2$, de l'ester activé et du HO-PEG-Mal synthétisé (16h, 20°C, rapport molaire des réactifs 1 : 1, agitation magnétique de 700 tours.min $^{-1}$).

Les analyses réalisées en spectroscopie IR (figure 85) confirment que le greffage a fonctionné. En effet, le spectre du polymère synthétisé comporte les pics caractéristiques du groupement maléimide, situés à 695 cm^{-1} pour la vibration de déformation du groupement C=C (Tang *et al.* 2007), à 1710 cm^{-1} pour la vibration d'élongation du groupement C=O (Corsaro *et al.* 2004, Tang *et al.* 2007, Zhang *et al.* 2010, Aguiar *et al.* 2011) et à 3100 cm^{-1} pour la vibration d'élongation du groupement =C-H (Tang *et al.* 2007, Aguiar *et al.* 2011). Le pic caractéristique de la vibration d'élongation du groupement C-N-C du maléimide, situés à 760 (Corsaro *et al.* 2004), 1150 (Tang *et al.* 2007, Aguiar *et al.* 2011) ou 1410 (Zhang *et al.* 2010) cm^{-1} , ne sont pas visibles car ils sont confondus avec des pics caractéristiques du HO-PEG-NH $_2$. Les pics situés à 1120 et 2900 cm^{-1} correspondent quant à eux aux pics caractéristiques de la vibration d'élongation des groupements C-O et C-H du HO-PEG-NH $_2$ (Wen *et al.* 2009, Kohler *et al.* 2004, Barrera *et al.* 2009).

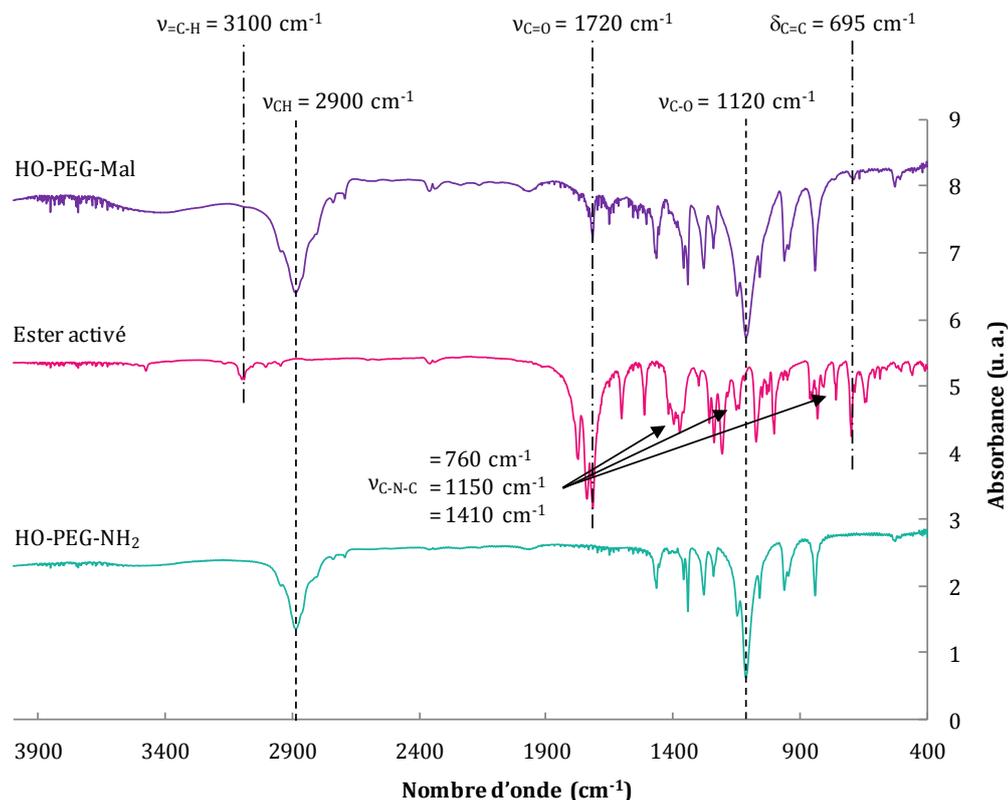


Figure 85 : Spectres Infra-Rouge du HO-PEG-NH₂, de l'ester activé et du HO-PEG-Mal synthétisé (16h, 20°C, rapport molaire des réactifs 1 : 1, forte agitation magnétique (700 tours.min⁻¹)) obtenus en transmission (pastilles de KBr).

Pour tenter d'améliorer le taux de conversion du HO-PEG-NH₂ en HO-PEG-Mal, les conditions de greffage ont été modifiées (tableau 19). Dans un premier temps, pour favoriser le greffage du groupement maléimide sur l'extrémité amine du polymère, la température de réaction a été augmentée de 20°C à 35°C par chauffage du milieu réactionnel. Puis, le temps de réaction, initialement de 16h, a été augmenté à 36h et l'ester activé a été introduit en large excès, avec des proportions molaires non plus de 1 : 1 mais 1,5 : 1 et de 5 : 1. Enfin, dans le but d'augmenter la réactivité, des bases comme le carbonate de potassium et la triéthylamine ont été utilisées. D'après les analyses réalisées en spectroscopie RMN ¹H et IR, les modifications de la température et du temps de réaction n'ont pas permis d'augmenter le taux de conversion du HO-PEG-NH₂ en HO-PEG-Mal qui se maintient à 60%. Contrairement à ce qui était attendu (Sheikh *et al.* 2010), l'utilisation de bases freine le greffage du groupement maléimide sur l'extrémité amine du PEG puisque le taux de conversion n'atteint alors que 10%. En revanche, l'augmentation de la proportion molaire de l'ester activé à un rapport de 5 : 1 permet d'obtenir du HO-PEG-Mal avec un rendement de 70%.

	Temps	Température	Rapport Molaire (/PEG)	Base	Taux de conversion
1 ^{er} essai	16h	20°C	1	-	60%
2 ^{ème} essai	16h	35°C	1	-	60%
3 ^{ème} essai	36h	20°C	1	-	60%
4 ^{ème} essai	16h	20°C	1,5	-	60%
5 ^{ème} essai	16h	20°C	5	-	70%
6 ^{ème} essai	16h	20°C	5	K ₂ CO ₃ (5 : 1)	10%
7 ^{ème} essai	16h	20°C	5	Et ₃ N (5 : 1)	10%

Tableau 19 : Tableau récapitulatif des différentes conditions de réaction testées pour la synthèse du HO-PEG-Mal ainsi que des taux de conversion du HO-PEG-NH₂ en HO-PEG-Mal déterminés par spectroscopie RMN ¹H.

Bien qu'une augmentation de la quantité d'ester activé entraîne un taux de greffage du groupement maléimide sur l'extrémité amine du PEG plus important, il est risqué de travailler avec une proportion molaire de succinimido-4-maléimido benzoate supérieure à 5 : 1. En effet, malgré la forte affinité des groupements maléimide avec les amines, une part d'entre eux risque de se greffer sur l'extrémité hydroxyle du PEG et former un polymère homobifonctionnel : le Mal-PEG-Mal. Le taux de 5 : 1 est donc conservé.

II.3.1.3 Purification du HO-PEG-Mal synthétisé

La réaction de greffage du groupement maléimide sur l'extrémité amine du HO-PEG-NH₂ n'étant pas totale, une étape de purification du polymère est nécessaire pour éliminer l'ester activé n'ayant pas réagi ainsi que le N-hydroxysuccinimide formé lors de la réaction. Une première méthode de séparation par filtration a été mise en œuvre. Pour cela, le PEG, fortement soluble dans les solvants aqueux, a été dissous dans l'eau déionisée. Puis, la solution a été filtrée sur un fritté pour éliminer l'ester activé, insoluble dans l'eau, n'ayant pas réagi. Le filtrat, contenant le PEG en solution aqueuse, a ensuite été introduit dans un tube à fond conique muni d'une membrane filtrante puis a subi un cycle de centrifugation de 3h à 4000 tours.min⁻¹ (1736 ×g). Le N-hydroxysuccinimide formé, présentant une taille largement inférieure au polymère, est alors éliminé. Le PEG sous forme visqueuse a ensuite été redispersé dans l'eau déionisée puis un second cycle de centrifugation a été lancé. Cette étape de lavage a été répétée quatre fois. Cette méthode ne permettant qu'une élimination partielle des produits n'ayant pas réagi et du N-hydroxysuccinimide formé, une autre technique de purification a été utilisée : la chromatographie flash. Cette méthode, basée sur la séparation par polarité, est proche de la filtration sur colonne de silice. Cependant, cette technique utilise une silice beaucoup plus fine permettant de réaliser des chromatographies sous pression contrairement aux colonnes gravitationnelles à base de silice standard, où le solvant s'écoule seul. Cela permet d'obtenir des séparations de meilleures qualités dans un laps de temps plus court. La filtration par chromatographie flash se déroule en présence d'un mélange de solvant composé de dichlorométhane et d'un gradient de méthanol (0 à 10%). Enfin, un dispositif de détection UV en sortie du chromatographe permet de fractionner les différents constituants du produit.

D'après les analyses réalisées par spectroscopie RMN ^1H , le N-hydroxysuccinimide formé et l'ester activé n'ayant pas réagi ont été en grande partie éliminés par la chromatographie flash (figure 86). En effet, les pics caractéristiques de ces éléments ne sont plus qu'à l'état de trace. Après cette étape de filtration, l'intégration des pics caractéristiques du HO-PEG-Mal indique que le polymère est pur à 90%.

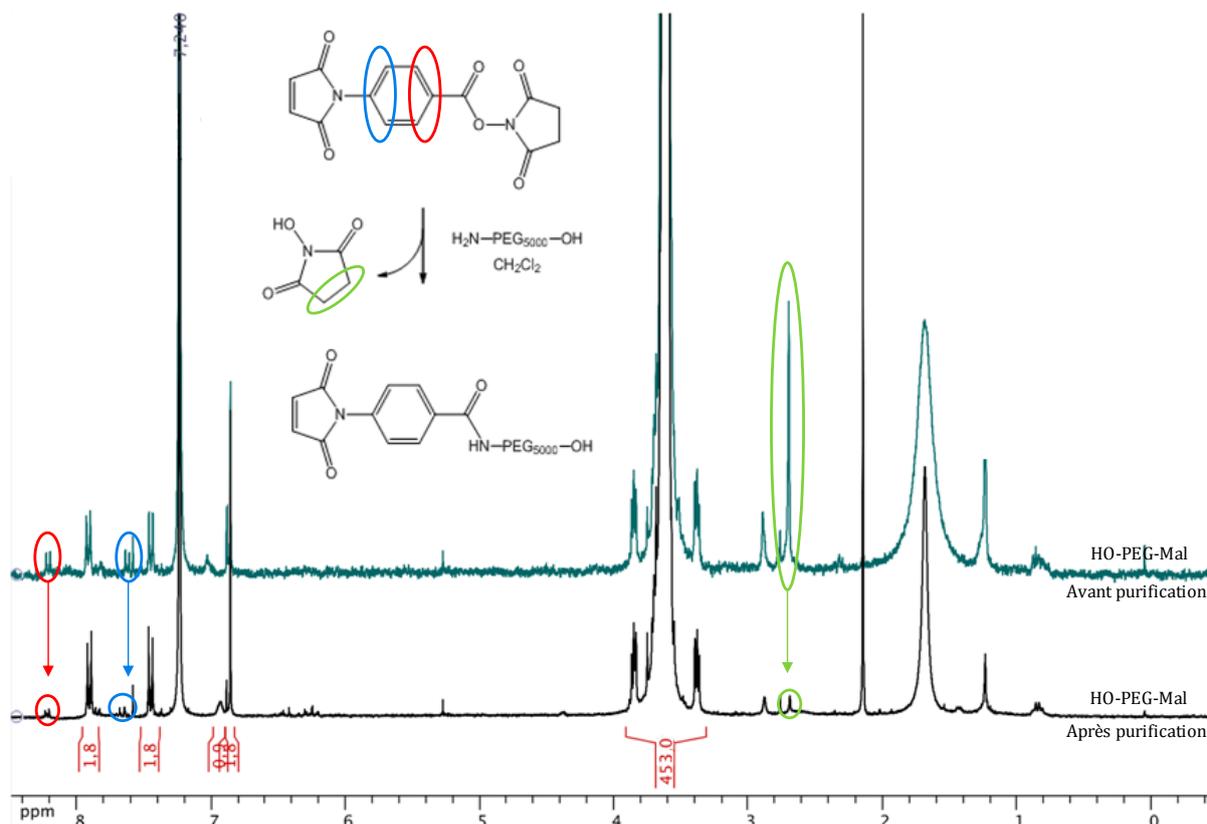


Figure 86 : Spectres RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3 , 225K) du HO-PEG-Mal avant et après l'étape de purification par chromatographie flash.

II.3.2 Détermination des meilleures conditions de silanisation

La silanisation du HO-PEG-Mal correspond à la seconde étape de synthèse du Si-PEG-Mal. Pour déterminer les meilleures conditions de greffage du groupement silane sur l'extrémité hydroxyle du PEG, des essais préliminaires ont été réalisés sur du méthoxy-PEG₅₀₀₀ (mPEG₅₀₀₀). Ce polymère est un PEG monofonctionnel comportant à l'une de ses extrémités un groupement OH et à l'autre extrémité, un groupement CH_3 non réactif. Pour greffer le groupement silane, deux approches différentes ont été testées. Pour la première approche, l'apport du groupement silane se fait par l'intermédiaire du triéthoxychlorosilane alors que pour la seconde approche, du 3- isocyanatopropyltriéthoxysilane (IPTES) a été utilisé (figure 87).

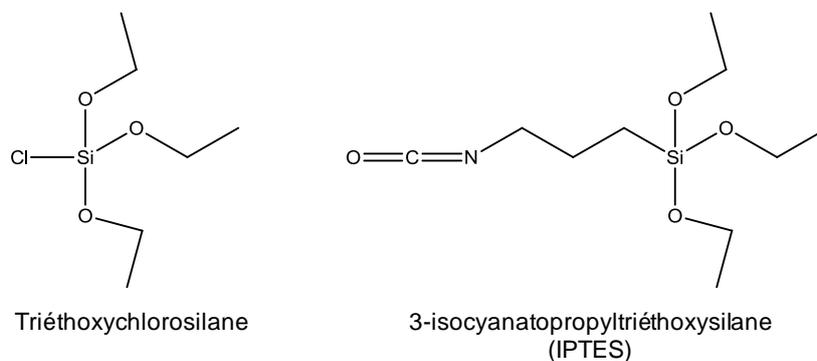


Figure 87 : Structure chimique du 3-isocyanatopropyltriéthoxychlorosilane et du triéthoxychlorosilane utilisé pour la synthèse du Si-PEG-Mal.

Pour chaque approche, la méthode de silanisation est différente. Dans le cas de l'utilisation du triéthoxychlorosilane, le groupement silane électrophile va se combiner à l'extrémité hydroxyle du mPEG pour former une liaison covalente. En revanche, lors de l'utilisation de l'IPTES, le greffage du groupement silane se fait par formation d'une fonction carbamate (R-NH-(C=O)O-R) entre l'extrémité hydroxyle du mPEG et l'extrémité isocyanate (O=C=N) du 3-isocyanatopropyltriéthoxysilane.

II.3.2.1 Utilisation du triéthoxychlorosilane

Le premier essai de silanisation a été réalisé par réaction entre le mPEG₅₀₀₀ et le triéthoxychlorosilane en présence d'une base, la triéthylamine (figure 88) (Hoven *et al.* 2007, Lin *et al.* 2009).

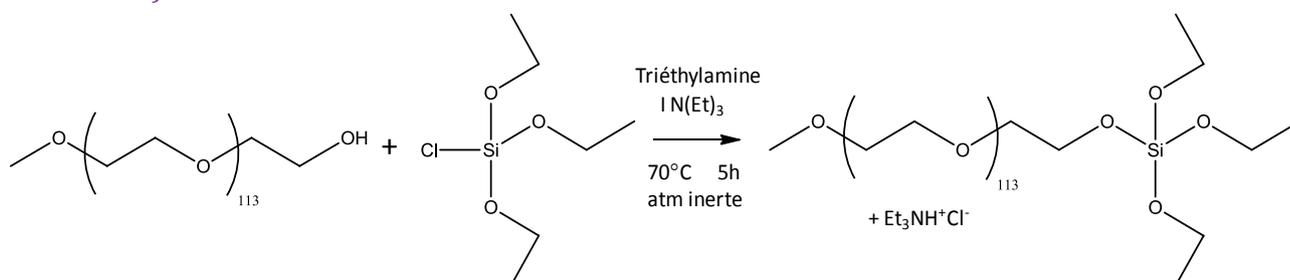


Figure 88 : Réaction chimique illustrant la silanisation du m PEG par l'intermédiaire du triéthoxychlorosilane (70°C, 5h triéthylamine, atmosphère inerte).

Dans un premier temps, le dérivé PEG a été chauffé par bain d'huile à une température de 70°C, pendant une durée de 30 minutes, sous atmosphère inerte et sous forte agitation magnétique de 700 tours.min⁻¹. Une fois le PEG sous forme liquide, du toluène, jouant le rôle de solvant, a été ajouté au milieu réactionnel (500 µL pour 50 mg de polymère). D'après les données bibliographiques, le benzène est le solvant utilisé pour le couplage Si-OH par l'intermédiaire du triéthoxychlorosilane (Hoven *et al.* 2007, Lin *et al.* 2009). Le benzène étant un CMR de type 1, pour des raisons de toxicité, le benzène a été remplacé par du toluène, un CMR de type 3, a priori beaucoup moins nocif. Après l'introduction du solvant, la triéthylamine puis le triéthoxychlorosilane ont été ajoutés. La triéthylamine, qui permet de déprotoner le groupement

hydroxyle du PEG, a été introduite en excès (rapport molaire de 1,5 : 1 par rapport au PEG) tout comme le triéthoxychlorosilane (rapport molaire de 1,2 : 1) (tableau 20). Un précipité blanc se forme dès l'ajout du triéthoxychlorosilane. L'ensemble des réactifs a été agité sous atmosphère inerte, à 700 tours.min⁻¹ et à une température de 70°C pendant une durée de 5h (Hoven *et al.* 2007, Lin *et al.* 2009). Une fois la réaction terminée, le mélange a été filtré sur cersel pour éliminer les sels formés par le chlore ainsi que la base protonée (Et₃NH⁺Cl⁻). Le solvant contenu dans le filtrat a ensuite été évaporé puis un bain d'eau froide a permis de faire précipiter le PEG. Le précipité blanc formé a alors été filtré sur Büchner puis lavé plusieurs fois à l'heptane pour éliminer l'excès de triéthoxychlorosilane. Le précipité a enfin été séché sous vide pour obtenir une poudre caractérisable.

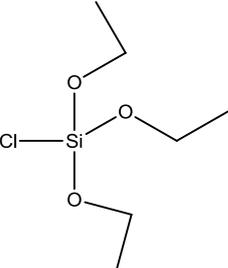
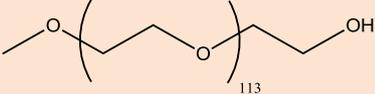
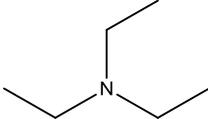
Nom	Formule brute	Structure chimique	M (g.mol ⁻¹)	n (mol)	m (mg)	Rapport molaire (/PEG)
Triéthoxy chlorosilane	C ₆ H ₁₅ ClO ₃ Si		198,6	1,2 x 10 ⁻⁵	2,38	1,2
PEG	mPEG ₅₀₀₀		5000	1 x 10 ⁻⁵	50	-
triéthylamine	C ₆ H ₁₅ N		111,19	1,5 x 10 ⁻⁵	1,67	1,5

Tableau 20 : Tableau récapitulatif des différents réactifs intervenant lors de la silanisation du mPEG par l'intermédiaire du triéthoxychlorosilane.

Le greffage du groupement silane sur l'extrémité hydroxyle du PEG ne formant pas de groupement fonctionnel caractérisable en spectroscopie IR, cette dernière n'est pas une technique appropriée pour confirmer la silanisation du mPEG par l'intermédiaire du triéthoxychlorosilane. En effet, le spectre IR du mPEG-Si est rigoureusement identique à celui du mPEG. Seul le pic caractéristique de la vibration d'élongation de la liaison Si-O (Hu *et al.* 2008, Mornet *et al.* 2005) permettrait de prouver que la silanisation a fonctionné. Ce pic n'est cependant pas discernable car il est confondu avec d'autres pics caractéristiques du PEG. Les résultats RMN ¹H (non montrés ici) indiquent quant à eux que le taux de conversion du mPEG en mPEG-Si ne dépasse pas les 50%.

II.3.2.2 Utilisation du 3-isocyanatopropyltriéthoxysilane

Pour tenter d'améliorer le taux de silanisation, un deuxième essai de greffage du groupement silane sur l'extrémité hydroxyle du PEG a été réalisé par mise en contact du mPEG₅₀₀₀ avec du 3-isocyanatopropyltriéthoxysilane en présence d'un solvant anhydre : le tétrahydrofurane (THF) (figure 89).

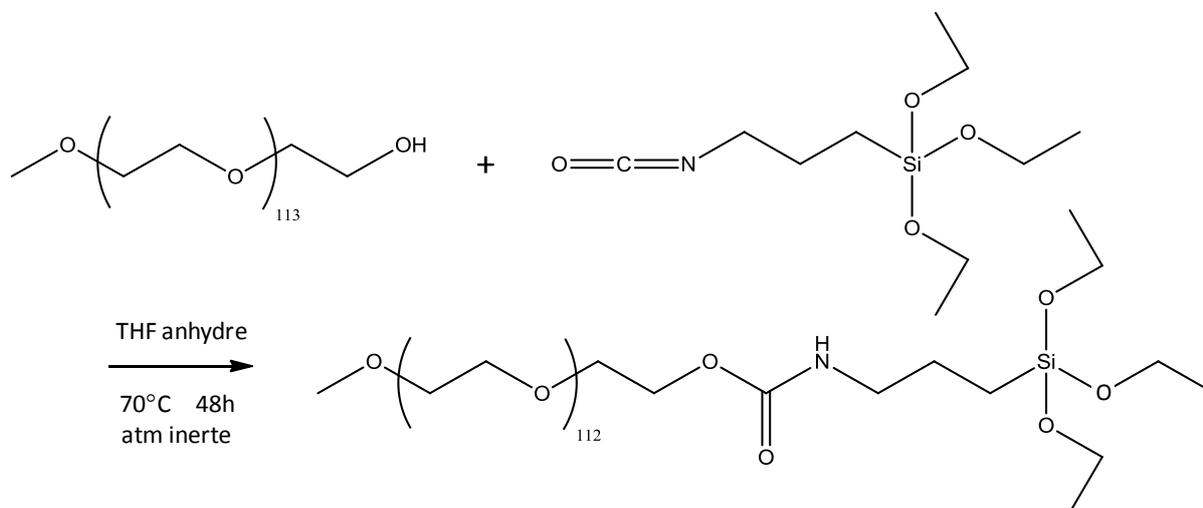


Figure 89 : Réaction chimique illustrant la silanisation du mPEG par l'intermédiaire de l'IPTES (70°C, 48h THF anhydre, atmosphère inerte).

L'IPTES est un alkoxy silane composé de trois fonctions éthoxy susceptibles de s'hydrolyser facilement. Il est alors nécessaire de purifier préalablement le THF par distillation sous atmosphère inerte pour éliminer toutes traces d'eau et limiter ainsi l'auto-condensation du 3-isocyanatopropyltriéthoxysilane. La purification va également permettre d'éliminer les peroxydes formés par le THF au cours du temps. La distillation du solvant a été réalisée en présence de sodium et de benzophénone. Le sodium va permettre la réduction des peroxydes en alcoolates et la transformation des molécules d'eau en hydroxydes de sodium. La benzophénone joue quant à elle le rôle d'indicateur coloré en virant du marron au bleu quand tous les peroxydes et les molécules d'eau ont été éliminés. Pendant la distillation du solvant, le PEG, sous vide et sous forte agitation magnétique (700 tours.min⁻¹), a été chauffé à 70°C dans un bain d'huile pendant 30 minutes pour le faire fondre. Le THF (500 µL pour 50 mg de PEG) puis l'IPTES ont ensuite été ajoutés au polymère liquéfié. L'ensemble des réactifs a été agité sous atmosphère inerte, à 700 tours.min⁻¹ et à la température de 70°C pendant une durée de 48h (Jo *et al.* 2000, Zhang *et al.* 2002). Pour favoriser la silanisation du mPEG₅₀₀₀, l'IPTES a été mis en excès avec un rapport molaire de 1,8 : 1 par rapport au PEG (tableau 21). Une fois la réaction terminée, le solvant a été évaporé à l'aide d'un évaporateur rotatif, puis de l'heptane a été ajouté pour faire précipiter le PEG silanisé. Le mPEG₅₀₀₀-Si a ensuite été récupéré par filtration sur Büchner puis lavé plusieurs fois à l'heptane pour éliminer l'excès d'IPTES n'ayant pas réagi. Le précipité a enfin été séché sous vide.

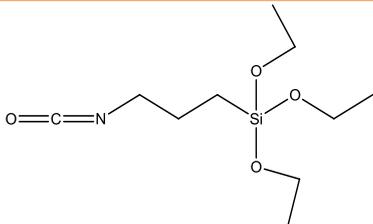
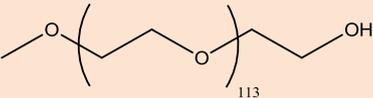
Nom	Formule brute	Structure chimique	M (g.mol ⁻¹)	n (mol)	m (mg)	Rapport molaire (/PEG)
IPTES	C ₁₀ H ₂₁ NO ₄ Si		247,36	1,8 x 10 ⁻⁵	4,45 (4,45 μL)	1,8
PEG	mPEG ₅₀₀₀		5000	1 x 10 ⁻⁵	50	-

Tableau 21 : Tableau récapitulatif des différents réactifs intervenant lors de la silanisation du mPEG par l'intermédiaire de l'IPTES.

Les analyses réalisées en RMN ¹H indiquent que le spectre du PEG silanisé présente neuf pics identifiables (figure 90). Chaque pic a été attribué à un groupe de proton présent dans le mPEG₅₀₀₀-Si. Le pic le plus important, puisqu'il est caractéristique du couplage entre l'IPTES et le mPEG₅₀₀₀, se situe à 5,1 ppm (pic rose). Il correspond au proton du NH de la fonction carbamate (R-NH-(C=O)O-R) qui se forme lors de la silanisation. Les pics situés à 1,15 et 3,72 ppm (pics vert turquoise et rouge) correspondent quant à eux aux protons des fonctions éthoxy du groupement silane. Enfin, les pics placés à 0,50 ; 1,45 ; 3,00 et 4,05 ppm (pics jaune, violet, vert clair et bleu clair) représentent les différents protons situés entre le groupement silane et le motif de répétition du polymère. L'intégration de tous ces pics caractéristiques donne des nombres de protons identiques aux nombres théoriques attendus. Cela prouve que 100% du mPEG₅₀₀₀ a été converti en mPEG₅₀₀₀-Si. Cette stœchiométrie confirme que le silane ne s'est pas hydrolysé durant la réaction de greffage et que chaque chaîne de polymère contient désormais un groupement Si à son extrémité.

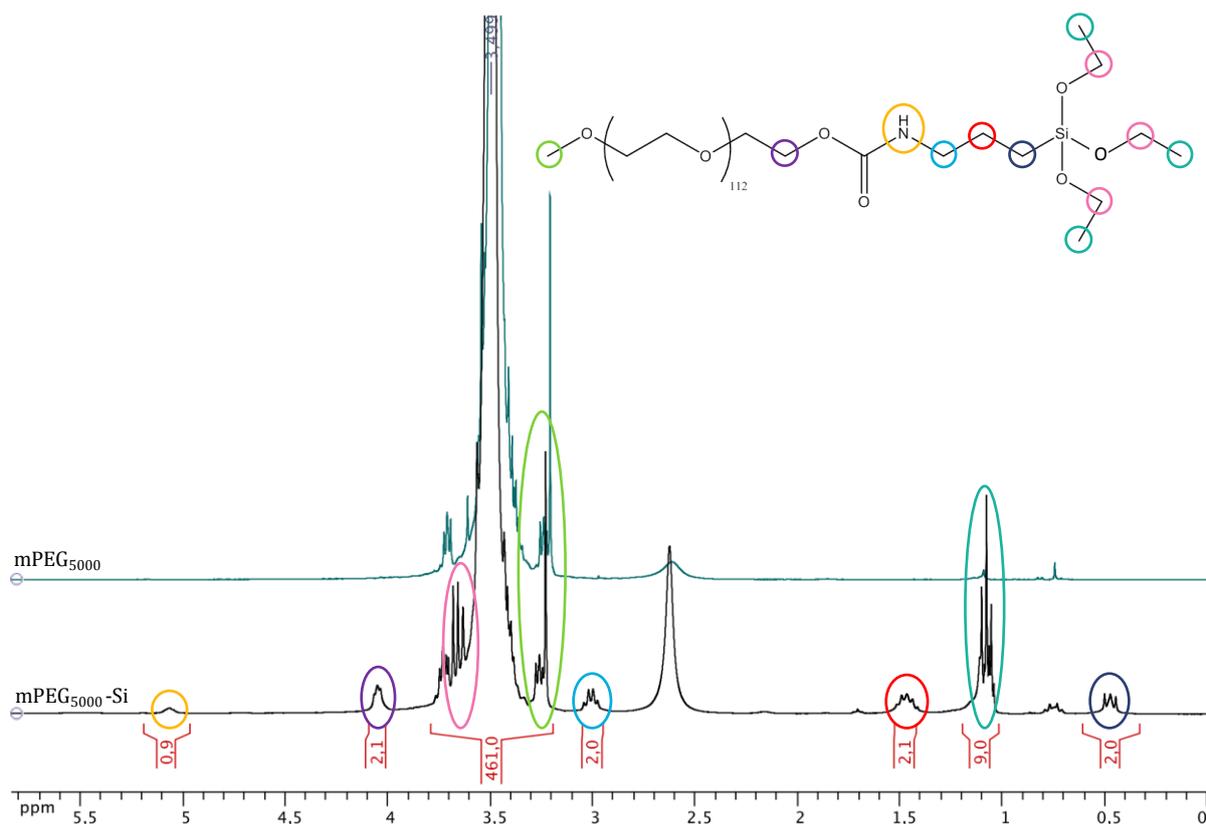


Figure 90 : Spectres RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3 , 293K) du mPEG et du mPEG-Si (48h, 70°C, rapport molaire des réactifs 1,8 : 1, forte agitation magnétique (700 tours. min^{-1}), atmosphère inerte).

Les analyses réalisées en spectroscopie IR confirment que le mPEG a été silanisé (figure 91). Les deux types de polymère présentent deux pics caractéristiques situés à 1120 et 2900 cm^{-1} . Ces pics correspondent à la vibration d'élongation de la fonction ester ($\text{CH}_2\text{-O-CH}_2$) et à la vibration d'élongation des groupements CH_2 (Wen *et al.* 2009, Kohler *et al.* 2004, Barrera *et al.* 2009). Lorsque le PEG est silanisé, deux nouveaux pics apparaissent, l'un aux alentours de 1720 cm^{-1} et l'autre vers 1500 cm^{-1} . Ils représentent la vibration d'élongation de la fonction carbonyle et la vibration de déformation du groupement uréthane (amine secondaire) (Hu *et al.* 2008, Barrera *et al.* 2009). Cependant, le pic caractéristique de la vibration d'élongation de la liaison Si-O qui se situe entre 1040 cm^{-1} et 1100 cm^{-1} n'est pas détectable sur le spectre du mPEG-Si. (Hu *et al.* 2008, Mornet *et al.* 2005). Cela s'explique par le fait que ce pic est confondu avec un autre pic caractéristique du polymère.

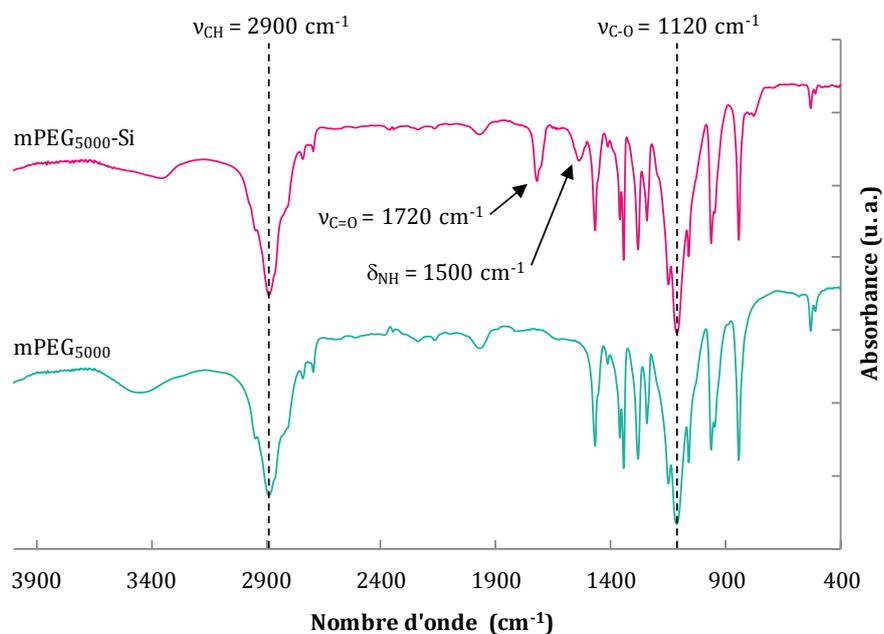


Figure 91 : Spectres Infra-Rouge du mPEG et du mPEG-Si (48h, 70°C, rapport molaire des réactifs 1,8 : 1, forte agitation magnétique (700 tours.min⁻¹), atmosphère inerte) obtenus en transmission (pastilles de KBr).

Les essais préliminaires réalisés sur du mPEG₅₀₀₀ ont montré qu'il est possible d'obtenir un taux de silanisation de 100% en utilisant de l'IPTES. Cette méthode sera donc conservée pour la suite des travaux.

II.3.2.3 Silanisation du HO-PEG-Mal

Le premier essai de silanisation du HO-PEG-Mal a été réalisé en présence d'IPTES et suivant les conditions de réaction déterminées lors des essais préliminaires réalisés sur le mPEG₅₀₀₀ (figure 92).

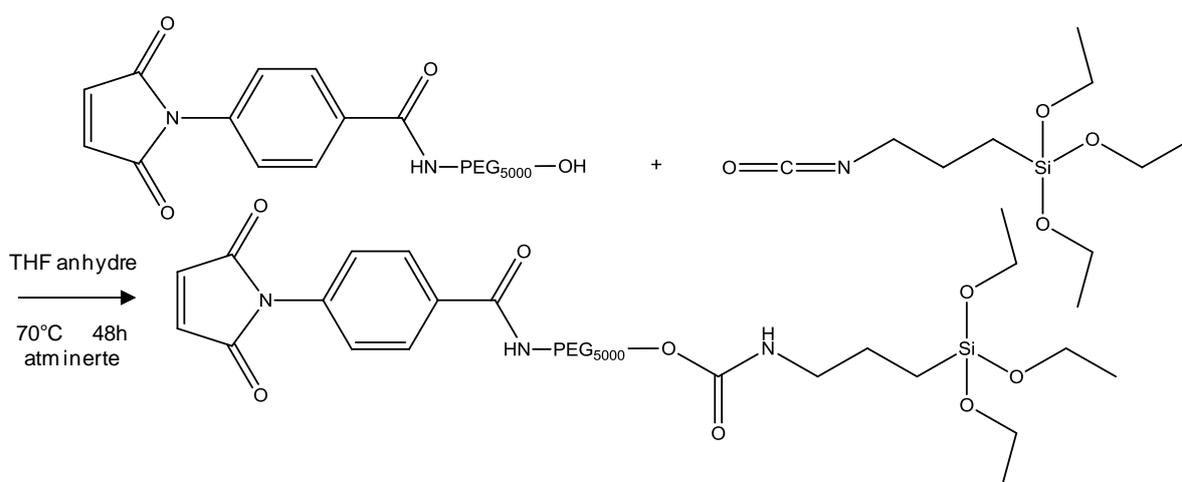


Figure 92 : Réaction chimique illustrant la synthèse du Si-PEG-Mal par silanisation du HO-PEG-Mal par l'intermédiaire de l'IPTES (70°C, 48h THF anhydre, atmosphère inerte).

Les analyses RMN ^1H (non présentées ici) montrent que les pics caractéristiques du groupement maléimide sont toujours présents sur le spectre du PEG synthétisé et dans un taux de 90%. L'étape de silanisation ne semble donc pas avoir détérioré l'extrémité maléimide du polymère. La majorité des pics caractéristiques des protons du groupement silane sont également présents sur le spectre. L'intégration de ces pics indique que le nombre expérimental de protons n'atteint que 60% du nombre de protons théorique. Cependant, l'absence du pic caractéristique du proton de la fonction carbamate qui se forme lors de la silanisation, indique que le greffage n'a pas fonctionné. Les analyses réalisées en spectroscopie IR (non présentées ici) confirment ce résultat. Les pics caractéristiques de la vibration d'élongation des fonctions carbonyle (C=O) et uréthane (N-H) qui apparaissent lors de la silanisation ne sont pas présents sur le spectre. Le greffage du groupement silane sur l'extrémité hydroxyle du HO-PEG-Mal n'a pas eu lieu. Les conditions optimales de greffage, déterminées par les essais préliminaires réalisés sur le mPEG ne s'appliquent pas lorsque la silanisation est réalisée sur le HO-PEG-Mal.

Pour tenter d'améliorer ces résultats, un deuxième essai de silanisation du HO-PEG-Mal a été réalisé à une température de 50°C (tableau 22). D'après les analyses réalisées en spectroscopie RMN ^1H et IR, la diminution de la température de réaction n'apporte aucune amélioration. Bien que le groupement maléimide n'ait pas été détérioré, le taux de silanisation reste de 0%. Après avoir modifié la température de réaction, la proportion molaire d'IPTES a été fortement augmentée pour qu'elle soit 10 fois supérieure à celle du PEG (tableau 22). Les analyses RMN ^1H indiquent que la combinaison d'une température de réaction de 70°C avec un large excès d'IPTES de 10 : 1 permet un faible taux de silanisation. Bien que tous les pics caractéristiques du groupement silane, ainsi que celui de la liaison carbamate, soient présents sur le spectre du produit synthétisé, le taux de greffage n'est que de 20%. De plus, les groupements maléimide ont été partiellement détériorés durant l'étape de silanisation. Une partie d'entre eux se sont hydrolysés puis détachés de l'extrémité amine du PEG. Le taux de greffage est alors réduit de 90% à 50%. L'association d'une température de réaction de 50°C avec un excès de d'IPTES de 10 : 1 apporte le moins bon résultat. Les pics caractéristiques de la silanisation ne sont pas présents sur le spectre et ceux caractéristiques de la présence du maléimide ont disparus. Avec ces conditions de réactions, le greffage du groupement silane n'a pas eu lieu et la totalité des groupements maléimide ont été hydrolysés. Un 5^{ème} essai de silanisation a alors été réalisé en conservant une température de réaction de 50°C et en diminuant la proportion molaire d'IPTES de 10 : 1 à 5 : 1 (tableau 22). Avec cette combinaison de conditions de réaction, la silanisation a fonctionnée et les groupements maléimide n'ont pas été détériorés. Le spectre RMN ^1H présente tous les pics caractéristiques du greffage des groupements silane et maléimide (figure 93). L'intégration de ces différents pics indique que le taux de silanisation est de 90% et que le taux de greffage du groupement maléimide se maintient à 90%.

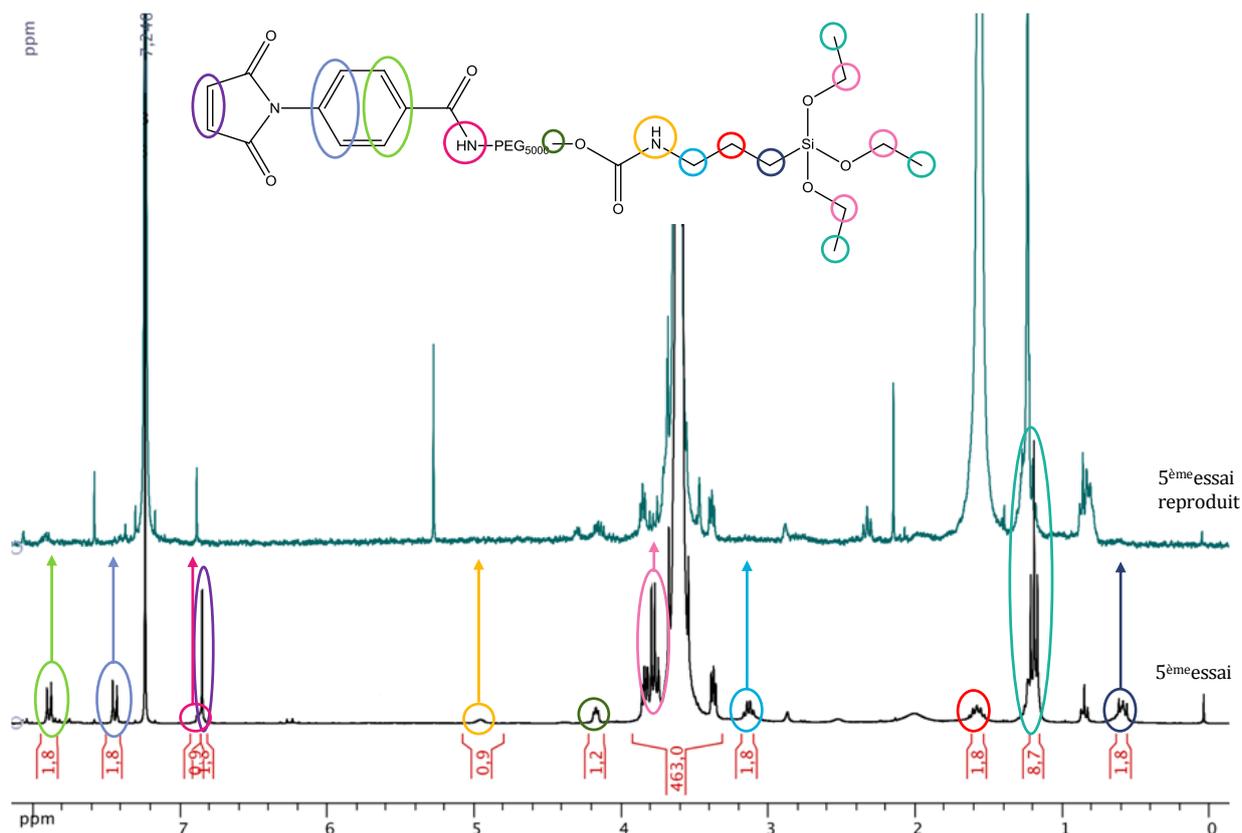


Figure 93 : Spectres RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3 , 293K) des essais de reproductibilité de la synthèse du Si-PEG-Mal (48h, 50°C , rapport molaire des réactifs 5 : 1, forte agitation magnétique ($700 \text{ tours}\cdot\text{min}^{-1}$), atmosphère inerte, THF anhydre).

Cependant, lorsque ce greffage a été reproduit (5 fois), les analyses réalisées en spectroscopie RMN ^1H ont donné des résultats complètement différents (figure 93). Les pics caractéristiques du greffage du groupement silane et du groupement maléimide ont totalement disparus. Cela indique que la silanisation n'a pas eu lieu et que les groupements maléimide ont été entièrement hydrolysés lors de la réaction. La silanisation du HO-PEG-Mal dans ces conditions ne semble malheureusement pas reproductible.

Face à ces problèmes de reproductibilité, une nouvelle approche permettant le greffage du groupement silane a été testée. Cette nouvelle technique utilise le même réactif pour l'apport du groupement silane, l'IPTES et dans des proportions molaires identiques (5 : 1). En revanche, le solvant n'est plus du THF anhydre mais du dichlorométhane et les conditions de réactions sont plus douces. La réaction ne se déroule plus à une température de 50°C mais à une température plus adaptée à la présence du maléimide thermiquement sensible, c'est-à-dire à une température ambiante aux alentours de 20°C . De plus, le temps de réaction est augmenté de 48h à 5 jours. Enfin, la réaction de greffage se déroule sous forte agitation magnétique de $700 \text{ tours}\cdot\text{min}^{-1}$ et sous atmosphère inerte (tableau 22) (Elias *et al.* 2007). Les essais préliminaires réalisés sur mPEG $_{5000}$ ont montrés que dans ces conditions le taux de silanisation était de 100%. Pour savoir si la réactivité est identique en présence du groupement maléimide, un greffage du groupement silane sur l'extrémité hydroxyle du HO-PEG-Mal a été réalisé exactement dans ces conditions.

	Temps	Température	Rapport Molaire (/PEG)	Solvant	Taux de silanisation	Proportion Mal
1 ^{er} essai	48h	70°C	1,8	THF anhydre	0%	90%
2 ^{ème} essai	48h	50°C	1,8	THF anhydre	0%	90%
3 ^{ème} essai	48h	70°C	10	THF anhydre	20%	50%
4 ^{ème} essai	48h	50°C	10	THF anhydre	0%	0%
5 ^{ème} essai	48h	50°C	5	THF anhydre	90%	90%
6 ^{ème} essai	5 jours	20°C	5	dichlorométhane	80%	90%

Tableau 22 : Tableau récapitulatif des différentes conditions de réaction testées pour la synthèse du Si-PEG-Mal. Les taux de silanisation du HO-PEG-Mal et les proportions de groupements maléimide réactifs déterminés par spectroscopie RMN ¹H sont également présentés.

Les analyses RMN ¹H indiquent que par cette méthode le taux de silanisation est de 80% (figure 94). Les groupements maléimide sont quant à eux toujours présents dans un taux de 90%. Bien que la silanisation du HO-PEG-Mal ne soit pas totale, une étape de séparation et de purification n'est pas nécessaire. En effet, lors de la fonctionnalisation des nanorubans de titanates par le Si-PEG-Mal (paragraphe II.4), les chaînes de polymère ne comportant pas de groupement silane ne pourront pas se greffer en surface des nanostructures et seront éliminées au cours des lavages. La reproductibilité de ce nouveau protocole a été éprouvée 5 fois. Les résultats donnés par la spectroscopie RMN ¹H et IR étant identiques, cette méthode de silanisation su HO-PEG-Mal a été définitivement adoptée.

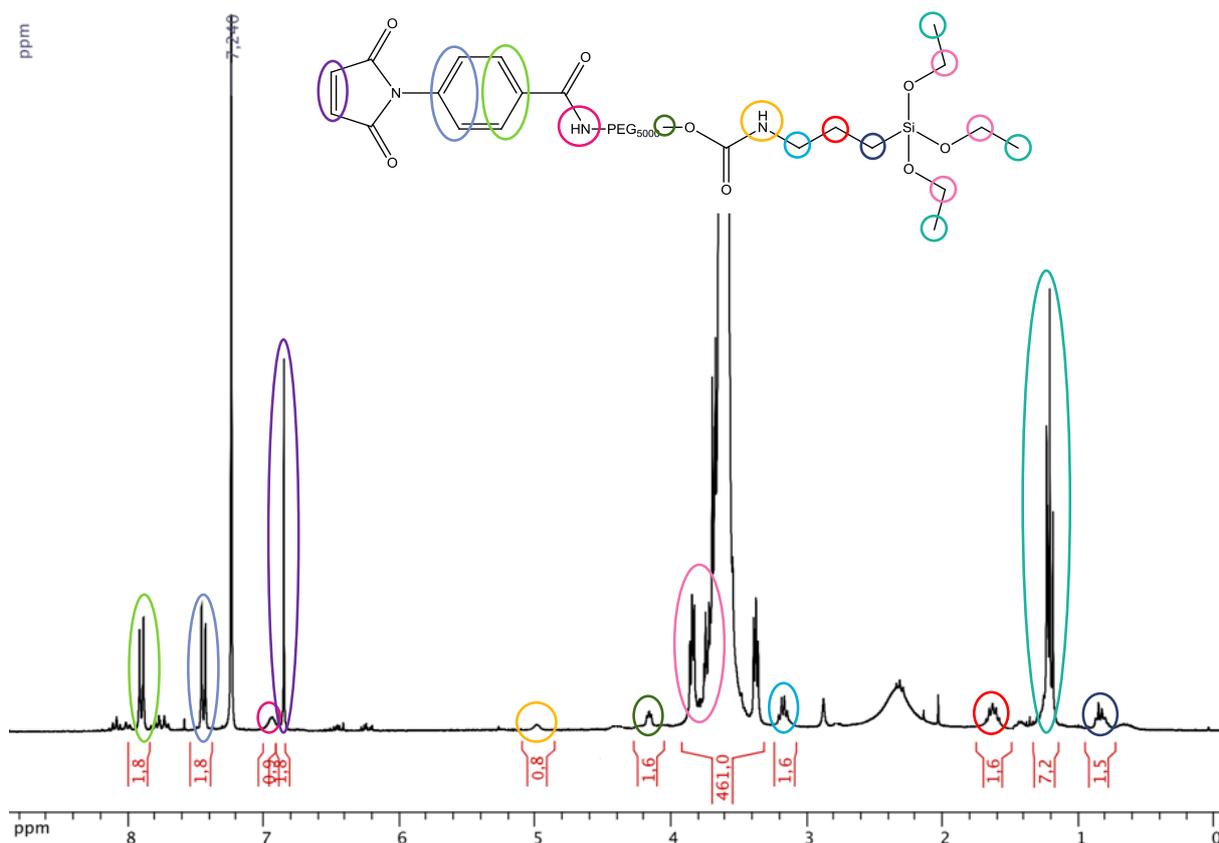


Figure 94 : Spectre RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃, 293K) du Si-PEG-Mal synthétisé au laboratoire (5 jours, 20°C, rapport molaire des réactifs 5 : 1, forte agitation magnétique (700 tours.min⁻¹), atmosphère inerte, dichlorométhane).

Les analyses réalisées en spectroscopie IR confirment la synthèse du Si-PEG-Mal (figure 95). Le spectre du polymère se compose des pics caractéristiques du PEG, placés à 1120 et 2900 cm^{-1} et correspondant aux vibrations d'élongation des groupements C-O et C-H. Les pics caractéristiques du groupement maléimide placés à 695, 1720 et 3100 cm^{-1} sont également présents. Ils représentent la vibration de déformation du groupement C=C et les vibrations d'élongation des groupements C=O et =C-H. Enfin, à 1500 et 1720 cm^{-1} , se trouvent les pics caractéristiques du groupement silane correspondant respectivement à la vibration de déformation et d'élongation des groupements N-H et C=O.

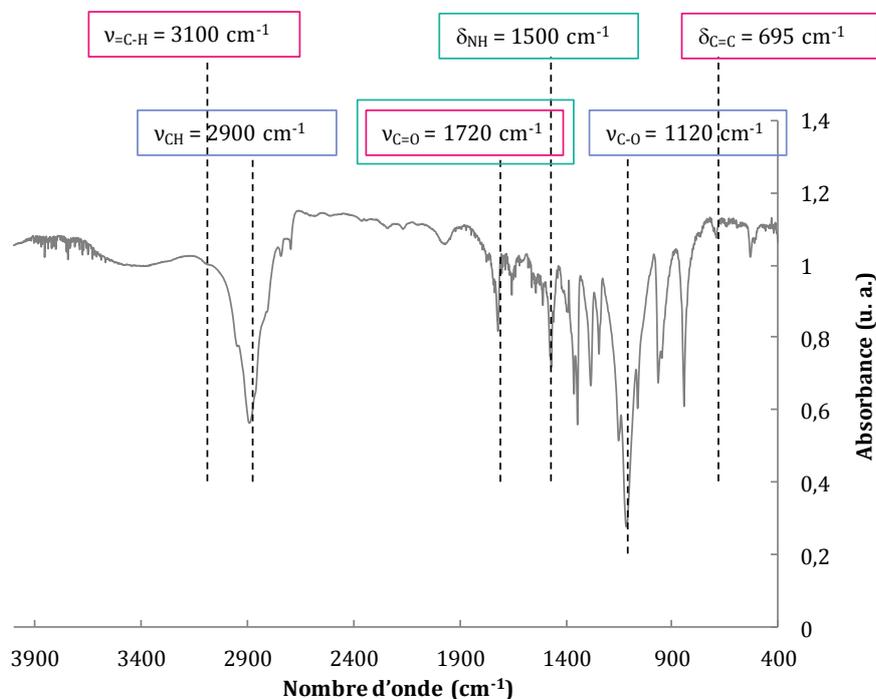


Figure 95 : Spectre Infra-Rouge du Si-PEG-Mal synthétisé au laboratoire (5 jours, 20°C, rapport molaire des réactifs 5 : 1, forte agitation magnétique (700 tours.min⁻¹), atmosphère inerte, dichlorométhane) obtenu en transmission (pastille de KBr).

II.4 Fonctionnalisation des nanorubans de titanates par le Si-PEG-Mal : première étape de la formation du nouveau nanobiohybride

La fonctionnalisation des nanorubans de titanates par le Si-PEG-Mal correspond à la première étape de formation du nouveau nanobiohybride. Pour optimiser les conditions de greffage du polymère en surface des nanorubans plusieurs études ont été réalisées.

II.4.1 Choix du solvant permettant le couplage TiONRs/Si-PEG-Mal

La fonctionnalisation de nanoparticules par des PEG silanisés peut se faire en présence de différents solvants. D'après les données bibliographiques, un mélange eau/éthanol (Jo *et al.* 2000, Shen *et al.* 2008, Papa. 2009, Maurizi. 2010), du THF anhydre (Robin *et al.* 2008), du DMF (Wang *et al.* 2009) et du dichlorométhane sont utilisés. Pour déterminer le solvant le plus approprié pour la fonctionnalisation des nanorubans de titanates par du Si-PEG-Mal, différents essais ont été réalisés. Le DMF étant un CMR de type 2, il est le seul solvant à ne pas avoir été

testé. L'eau et l'éthanol ont été mélangés en rapport volumique identique et le pH a été ajusté à 4. Ce pH légèrement acide permet de ralentir l'hydrolyse des éthoxysilanes en silanols. Pour chaque essai, 20 mg de nanorubans de titanates ont été mis en suspension dans 4 mL de solvant sous faible agitation magnétique (150 tours.min⁻¹) et sous atmosphère inerte. Une fois les nanorubans dispersés au sein du milieu réactionnel, 20 mg de polymère ont été ajoutés. Après 48h de réaction à une température de 20°C, un cycle de centrifugation de 5 minutes à 4000 tours.min⁻¹ (1736 ×g) a permis de séparer les nanorubans fonctionnalisés du solvant. Plusieurs lavages par cycles de centrifugation ont ensuite été réalisés pour éliminer le PEG n'ayant pas réagi. Enfin, la poudre a été séchée sous vide (15 mbar) pour obtenir une poudre caractérisable. Les analyses réalisées par ATG, indiquent que dans le cas de l'utilisation du mélange eau/éthanol, la perte de masse totale est de 13,5% (figure 96). La perte de masse comprise entre 20°C et 120°C est associée au départ de l'eau physisorbée et chimisorbée. Les pertes provenant du Si-PEG-Mal n'est donc que de 3,2%. Ce taux correspond à une densité de greffage de 0,15 chaîne de polymère par nm² de nanorubans (annexe 8). Dans le cas de l'utilisation de THF anhydre et du dichlorométhane, le taux de greffage atteint respectivement 4 et 0,3 chaînes de polymère par nm² de nanorubans (figure 24).

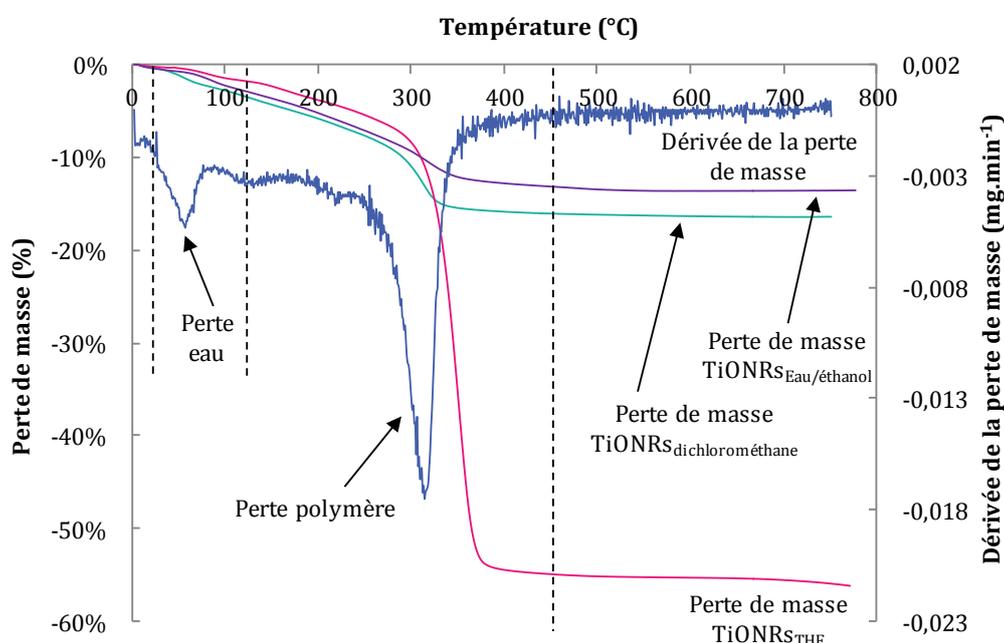


Figure 96 : ATG des nanorubans de titanates fonctionnalisés par du Si-PEG-Mal en présence de trois solvants ou mélange de solvants différents (eau/éthanol, THF anhydre, dichlorométhane). Les mesures ont été effectuées sous flux d'air reconstitué ($N_2/O_2 = 0,12/0,04 \text{ L.min}^{-1}$) avec une rampe de montée en température de 2°C.min^{-1} de 20°C à 800°C . La dérivée de la perte de masse présentée est celle des nanorubans fonctionnalisés en présence de dichlorométhane. Toutes les dérivées avaient cependant une allure identique.

Le meilleur taux de greffage du Si-PEG-Mal en surface des nanorubans de titanates s'obtient par conséquent en utilisant comme solvant du THF anhydre. Cependant, les nanorubans seront par la suite fonctionnalisés en présence de dichlorométhane afin de conserver le même solvant tout au long de l'élaboration du nanobiohybride. Le solvant eau/éthanol semble quant à lui totalement inapproprié pour la fonctionnalisation des nanorubans par le Si-PEG-Mal car le groupement maléimide est facilement hydrolysable.

Après avoir étudié l'influence de la nature du solvant sur la fonctionnalisation des nanorubans de titanates par du Si-PEG-Mal, différents volumes de dichlorométhane ont été testés. Pour tenter d'améliorer le taux de greffage du polymère, le volume de solvant a été multiplié par 10 puis par 25 pour favoriser la dispersion des nanorubans et les rendre ainsi plus accessibles aux chaînes de Si-PEG-Mal. La fonctionnalisation des nanorubans de titanates (entre 2 et 5 mg) s'est alors effectuée en présence de 40 et 100 mL de dichlorométhane. Les analyses réalisées par ATG (figure 97) indiquent que la densité de greffage du Si-PEG-Mal en surface des nanorubans de titanates reste de 0,3 chaîne de polymère par nm^2 lorsque le solvant atteint 40 mL. Une légère augmentation du taux de greffage est notable lorsque le volume de solvant est de 100 mL. Il passe alors de 0,3 à 0,4 chaîne de Si-PEG-Mal par nm^2 de nanorubans.

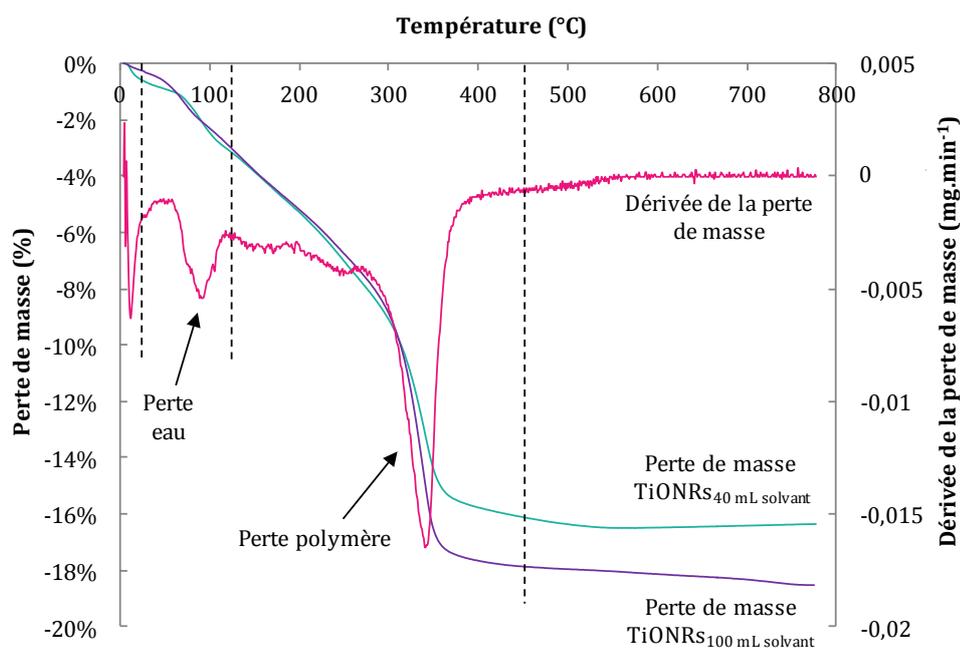


Figure 97 : ATG des nanorubans de titanates fonctionnalisés par du Si-PEG-Mal en présence de 40 mL et 100 mL de dichlorométhane. Les mesures ont été effectuées sous flux d'air reconstitué ($\text{N}_2/\text{O}_2 = 0,12/0,04 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$) avec une rampe de montée en température de $2^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ de 20°C à 800°C . La dérivée de la perte de masse présentée est celle des nanorubans fonctionnalisés en présence de 100 mL de dichlorométhane. Toutes les dérivées avaient cependant une allure identique.

Bien qu'un milieu réactionnel fortement dilué ne favorise pas un taux de greffage du Si-PEG-Mal beaucoup plus important, les nanorubans de titanates seront par la suite fonctionnalisés en présence de 100 mL de dichlorométhane. En effet, l'utilisation d'un grand volume de solvant devrait entraîner une fonctionnalisation plus homogène puisque les nanorubans seront mieux dispersés.

II.4.2 Greffage de différentes quantités de PEG en surface des nanorubans de titanates et caractérisation de la fonctionnalisation

Dans le but d'avoir un contrôle sur le taux de greffage du Si-PEG-Mal, différentes quantités de polymère ont été testées pour la fonctionnalisation des nanorubans de titanates. Jusqu'à présent, les nanorubans et le polymère ont été mis en contact dans des proportions massiques identiques. Pour étudier l'influence de la proportion du Si-PEG-Mal sur la densité de

greffage, des rapports massiques de polymère de 3 : 1 et de 0,5 : 1 par rapport aux nanorubans ont été testées. Les analyses réalisées par ATG montrent que lorsque la proportion de polymère est multipliée par trois, le taux de greffage du Si-PEG-Mal est également multiplié par trois puisqu'il passe de 0,3 à 0,9 chaîne de polymère par nm² de nanorubans. De manière identique, lorsque cette proportion est divisée par deux, la densité de greffage est également réduite de moitié et ne vaut plus que 0,15 chaîne de polymère par nm² de nanorubans. Pour savoir si la présence du Si-PEG-Mal dans différents taux de greffage modifie la matrice 3D des nanorubans de titanates par un effet dispersant, des observations MET ont été réalisées.

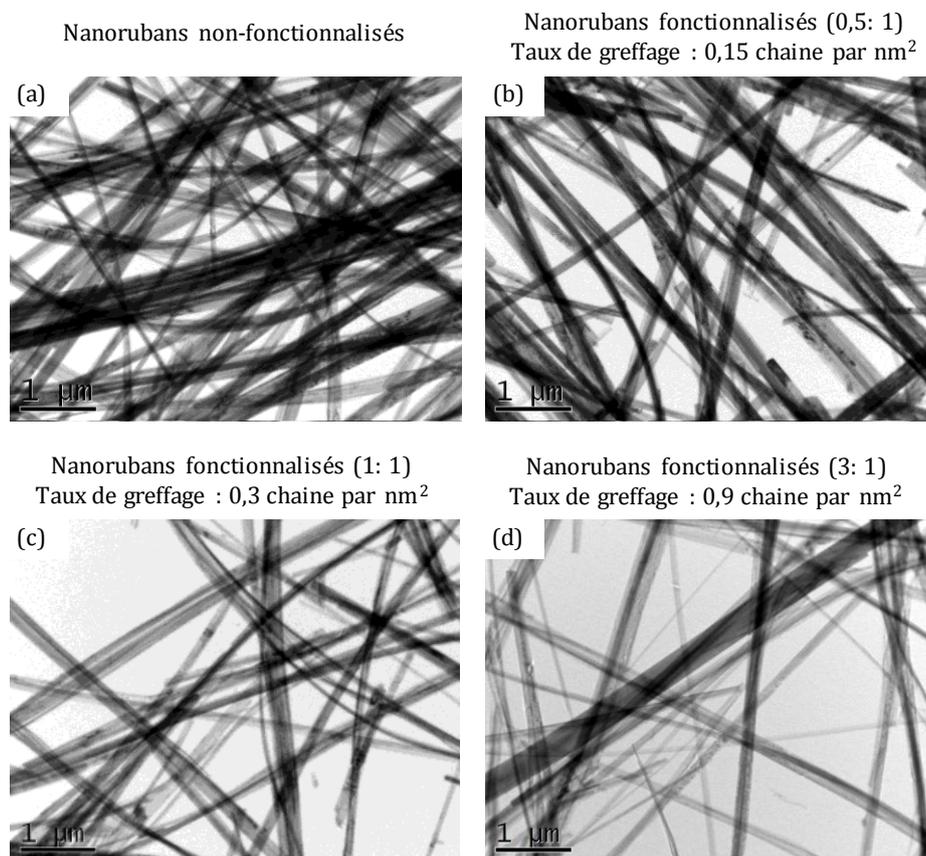


Figure 98 : Clichés MET (a) des nanorubans seuls et des nanorubans fonctionnalisés par différents rapports massiques de Si-PEG-Mal : TiONRs (b) 0,5 : 1, (c) 1 : 1 et (d) 3 : 1.

Les clichés MET montrent que lorsque les nanorubans sont fonctionnalisés par du Si-PEG-Mal, ils ont tendance à se disperser. Plus la quantité de polymère greffé est élevée, plus l'effet dispersant semble important (figure 98). L'état de dispersion des nanorubans de titanates ne permet cependant pas de confirmer la fonctionnalisation par le Si-PEG-Mal. En effet, la quantité d'échantillon utilisée pour la préparation des grilles MET n'étant pas rigoureusement identiques d'une synthèse à l'autre, il est probable que cette variation interfère sur l'état de dispersion des rubans. Ces résultats sont donc à utiliser avec précaution.

En revanche, les analyses réalisées par XPS confirment que les nanorubans de titanates ont été fonctionnalisés par le Si-PEG-Mal (tableau 23). En effet, l'apparition de contributions provenant du silicium et de l'azote ainsi que l'augmentation de la teneur en carbone prouve que le polymère s'est greffé en surface des nanorubans. Plus le taux de polymère engagé est important, plus la proportion des ces trois éléments augmente. La diminution de la teneur en sodium et en titane confirme également que l'épaisseur de la couche de polymère masque la composition de la partie inorganique. La désommatation du pic C1s montre que la participation des atomes de carbone aux liaisons de type C-O augmentent. Ces liaisons correspondent à la contribution du PEG (Bozzini *et al.* 2010). La désommatation du pic O1s indique que la participation des atomes d'oxygène aux groupements hydroxyle diminue lorsque les nanorubans sont fonctionnalisés. Cela confirme la participation des ions OH⁻ à la formation des liaisons Si-O-Ti permettant le greffage du polymère en surface des rubans (figure 77).

	Carbone (± 1%)	Sodium (± 1%)	Oxygène (± 1%)	Titane (± 1%)	Silicium (± 1%)	Azote (± 1%)
Rubans seuls	22	8	55	16	-	-
Fonct : TiONRs (0,5 : 1)	26	4	58	15	0,5	0,5
Fonct : TiONRs (1 : 1)	38	1	47	12	1	1
Fonct : TiONRs (3 : 1)	43	1	42	10	2	2

	C-C et C-H (± 1%)	C-O (± 1%)	C=O et O-C=O (± 1%)	O ²⁻ (± 1%)	OH ⁻ et C=O (± 1%)	H ₂ O et C-O (± 1%)	Na _{Auger} (± 1%)
Rubans seuls	12	8	1	33	17	2	3
Fonct : TiONRs (0,5 : 1)	13	10	3	36	16	4	2
Fonct : TiONRs (1 : 1)	16	18	4	31	13	1	-
Fonct : TiONRs (3 : 1)	17	22	4	28	10	1	-

Tableau 23 : Proportions atomiques XPS des différents éléments chimiques constituant les nanorubans de titanates fonctionnalisés par différents rapports massiques de Si-PEG-Mal : TiONRs (0,5 : 1), (1 : 1) et (3 : 1).

Une observation à l'œil nu de suspensions de nanorubans de titanates dans l'eau déionisée (1 mg.mL⁻¹) confirme également la présence du Si-PEG-Mal en surface des nanorubans de titanates. En effet, dans le cas d'une fonctionnalisation par le polymère dans un rapport molaire de 3 : 1, la suspension de nanorubans est stable un jour après sa réalisation. En revanche, dans le cas des nanorubans non-fonctionnalisés, la totalité des nanoparticules ont sédimentées (figure 99).

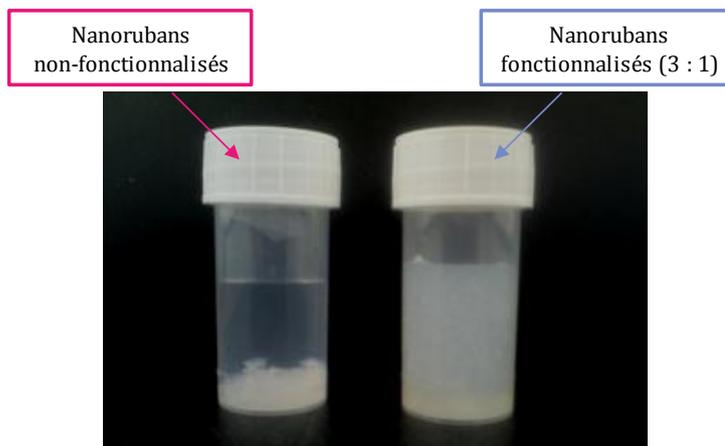


Figure 99 : Photo de suspensions de nanorubans de titanates (1 mg.mL^{-1}) non-fonctionnalisés et fonctionnalisés par du Si-PEG-Mal dans un rapport molaire de Si-PEG-Mal : TiONRs de (3 : 1).

D'après les données bibliographiques, pour réaliser un greffage peptidique ciblé par l'intermédiaire du couplage maléimide-cystéine, 1 fonction maléimide pour 19 fonctions non réactives sont nécessaires (Houseman *et al.* 2003). La présence des fonctions neutres permet de limiter les adsorptions non-spécifiques des peptides. Leur présence est indispensable puisque les matrices inorganiques à base d'oxydes de titane ont tendance à interagir avec les entités biologiques et favoriseraient notamment la croissance et la différenciation cellulaire sans l'aide d'aucun autre facteur (figure 100) (Wang *et al.* 2012).

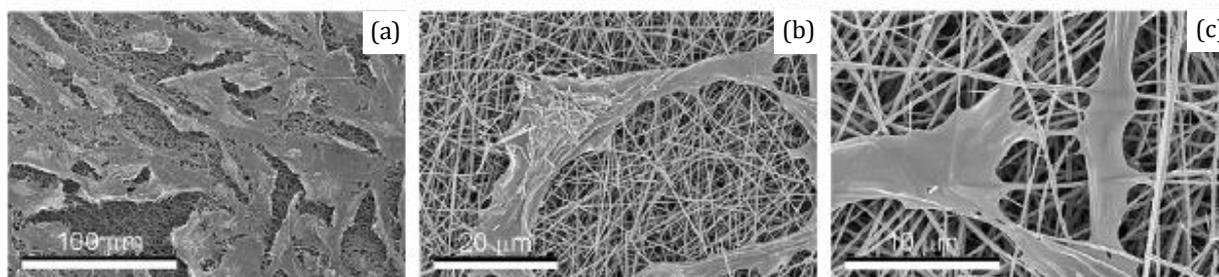


Figure 100 : Clichés MEB (à différents grossissements) de la croissance de cellules d'ostéoblastes MG63 sur une matrice de nanofibres de TiO_2 d'après (Wang *et al.* 2012).

Pour l'élaboration du nouveau nanobiohybride, la fonctionnalisation des nanorubans de titanates peut alors se faire par un mélange de polymères contenant de 5% de Si-PEG-Mal et 95% mPEG-Si en proportions molaires (protocole 4).

Protocole 4

Un mélange de 30 mg de mPEG-Si et de 2 mg de Si-PEG-Mal pur à 80% a été préparé (tableau 24). Dans le but de conserver un rapport massique de polymère de 3 : 1, 10,6 mg de nanorubans de titanates ont été dispersés par agitation manuelle dans 100 mL de dichlorométhane. Puis, le mélange de polymère a été ajouté au milieu réactionnel. Les conditions de greffage ont été un temps de réaction de 48h, une agitation magnétique de $150 \text{ tours.min}^{-1}$, une température de 20°C et une atmosphère inerte. Une fois la réaction terminée, le précipité a été lavé plusieurs fois par cycle de centrifugation en présence de dichlorométhane pour éliminer le polymère n'ayant pas réagi avant d'être séché sous vide.

Nom	Rapport molaire	M (g.mol ⁻¹)	n (mol)	m (mg)	m _{fin} (mg)
mPEG-Si	95 %	5249	5,7 x 10 ⁻⁶	30	30
Si-PEG-Mal	5 %	5449	3 x 10 ⁻⁷	1,6	2
				m_{TOT}	32

Tableau 24 : Tableau récapitulatif des quantités de polymères nécessaires pour réaliser un mélange de 5% de Si-PEG-Mal et 95% de mPEG-Si en proportion molaire.

L'analyse réalisée par ATG indique une perte de masse totale de 20,4% (figure 101). D'après la dérivée de la perte de masse, trois pertes différentes sont notables. Entre 20 et 120 °C, la perte de masse correspond au départ de l'eau. Le départ du mPEG-Si correspond quant à lui à la perte de masse comprise entre 120 et 250 °C (Papa, 2009, Maurizi, 2010). Enfin, la perte de masse comprise entre 250 et 450°C correspondrait au départ du Si-PEG-Mal.

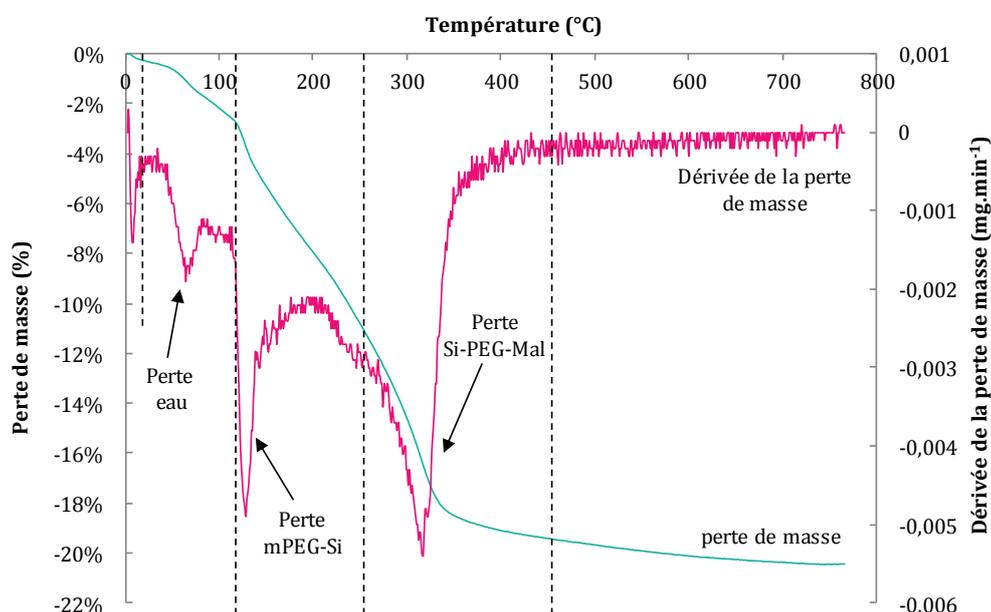


Figure 101 : ATG des nanorubans de titanates fonctionnalisés par un mélange de mPEG-Si et de Si-PEG-Mal. Les mesures ont été effectuées sous flux d'air reconstitué ($N_2/O_2 = 0,12/0,04 \text{ L.min}^{-1}$) avec une rampe de montée en température de 2°C.min^{-1} de 20°C à 800°C .

Ces taux correspondent à des densités de greffage de 0,35 chaîne de mPEG-Si et 0,6 chaîne de Si-PEG-Mal par nm² de nanorubans (annexe 8). D'après ces résultats, seulement un dixième du mPEG-Si se serait greffé en surface des rubans et la quantité de Si-PEG-Mal greffée serait 3 fois supérieure à celle mise en jeu lors de la réaction (tableau 25).

Nom	n mis en jeu (mol)	Perte de masse	Nombre de chaîne	n greffé (mol)
mPEG-Si	5,7 x 10 ⁻⁶	7%	0,35 par nm ²	5,7 x 10 ⁻⁷
Si-PEG-Mal	3 x 10 ⁻⁷	10%	0,6 par nm ²	9 x 10 ⁻⁷

Tableau 25 : Tableau récapitulatif des densités de greffage du mPEG-Si et du Si-PEG-Mal en surface des nanorubans de titanates (20°C , 48h, $150 \text{ tours.min}^{-1}$, atmosphère inerte, dichlorométhane).

Ces aberrations peuvent s'expliquer par le fait que la totalité du mPEG-Si ne se soit pas dégradé entre 120 et 250°C. La perte de masse comprise entre 250 et 450°C ne serait alors pas uniquement associée à la dégradation Si-PEG-Mal mais correspondrait également en partie au départ du polymère monofonctionnel. Il devient alors difficile de déterminer avec exactitude les densités de greffage des deux types de PEG. Une approximation peut cependant être réalisée en considérant que la perte de masse de 17%, comprise entre 120 et 450°C correspond au mélange de polymère et se compose de 95% de mPEG-Si et de 5% de Si-PEG-Mal. Par cette méthode, le taux de greffage total est de 1,2 chaînes de polymère par nm² de rubans. Ce nombre se décompose en 1,1 chaînes de mPEG-Si et 0,1 chaîne de Si-PEG-Mal. Au niveau quantité de matière, un tiers du mPEG-Si et la moitié du Si-PEG-Mal mis en jeu seraient greffés en surface des nanorubans. La réactivité moins importante du polymère monofonctionnel s'expliquerait par le fait qu'il serait dégradé au cours du temps. En effet, les analyses réalisées en spectroscopie RMN ¹H (figure 102) montrent que le taux de silanisation du mPEG, initialement de 100%, n'est plus que de 50% deux ans après sa synthèse au laboratoire. De plus, l'intégration du pic caractéristique des groupements -CH₃ terminaux, initialement égal à 9, ne vaut plus que 1,6. Cela prouve que le PEG s'est fortement hydrolysé au cours du temps suite à un stockage sous air.

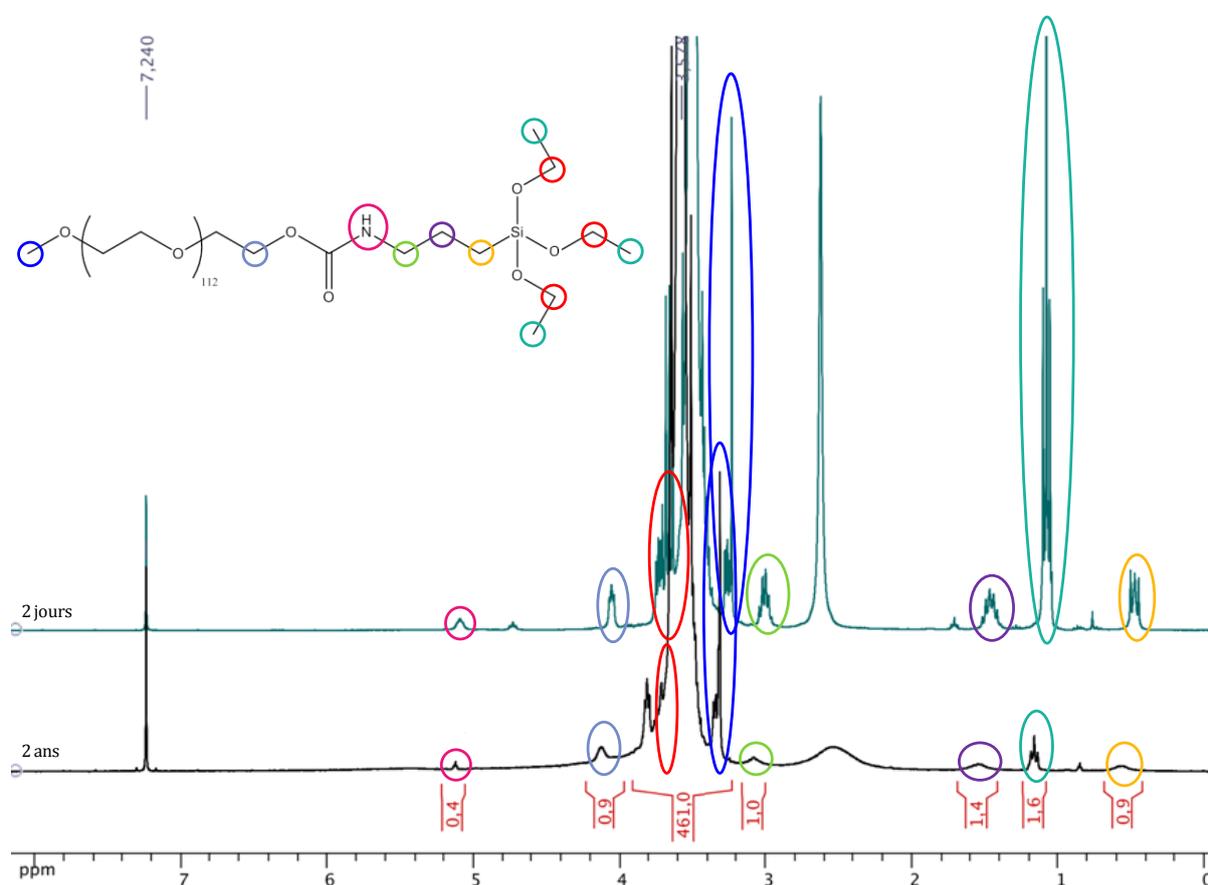


Figure 102 : Spectre RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃, 293K) du mPEG-Si 2 jours et 2 ans après sa synthèse au laboratoire (48h, 70°C, rapport molaire des réactifs 1,8 : 1, forte agitation magnétique (700 tours.min⁻¹), atmosphère inerte, THF anhydre).

Les analyses réalisées en spectroscopie IR confirment la fonctionnalisation des nanorubans. En effet, le spectre des nanorubans fonctionnalisés présente l'allure générale du spectre des nanorubans seuls mais contient en plus les pics caractéristiques de la présence du Si-PEG-Mal. Les pics caractéristiques du maléimide, $\delta_{C=C}$ et $\nu_{C=O}$, se retrouvent à 695 et

1720 cm^{-1} , ceux du groupement silane, $\delta_{\text{N-H}}$ et $\nu_{\text{C=O}}$, sont placés à 1500 et 1720 cm^{-1} et ceux du PEG, $\nu_{\text{C-O}}$ et $\nu_{\text{C-H}}$, apparaissent à 1120 et 2900 cm^{-1} . La présence du mPEG-Si greffé en surface des nanorubans se manifeste par les pics caractéristiques du PEG et du groupement silane communs aux deux types de polymères (figure 103).

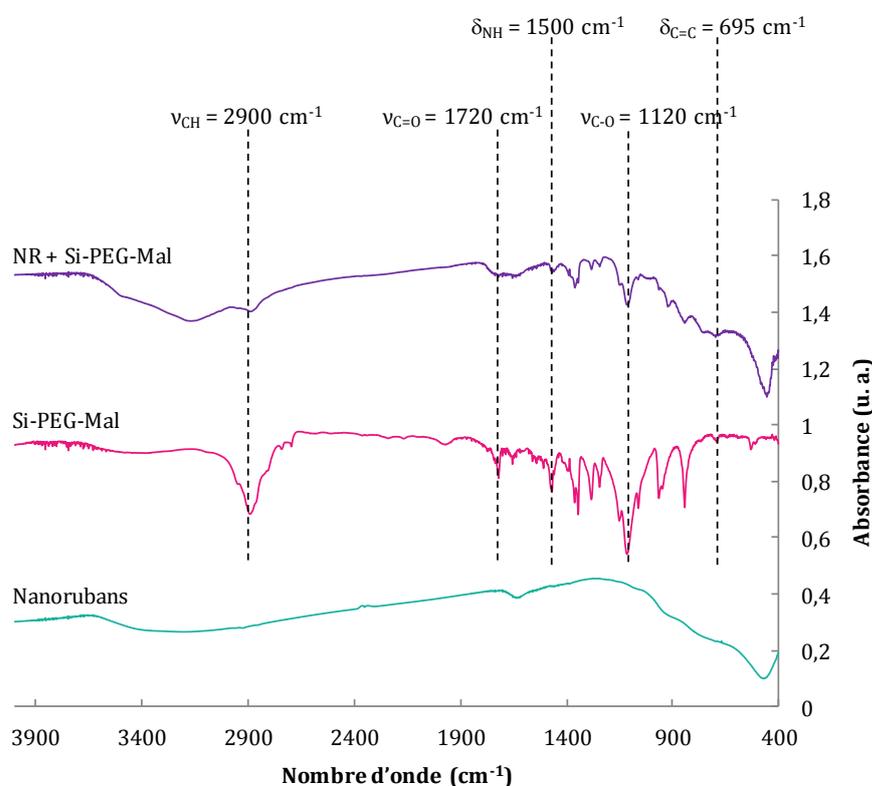


Figure 103 : Spectres Infra-Rouge des nanorubans de titanates, du Si-PEG-Mal synthétisé au laboratoire et des nanorubans fonctionnalisés par le Si-PEG-Mal (48h, 20°C, agitation magnétique 150 tours.min⁻¹, atmosphère inerte, dichlorométhane) obtenu en transmission (pastilles de KBr).

II.4.3 Etude du temps de réaction nécessaire à la fonctionnalisation des nanorubans

Le groupement fonctionnel maléimide étant particulièrement sensible et instable, il est probable qu'il soit détérioré lors du greffage du polymère en surface des nanorubans. Jusqu'à présent, le temps de réaction choisi était volontairement long pour optimiser le taux de greffage du polymère. Cependant, dans le but de préserver au mieux le groupement maléimide, le temps de réaction initialement de 48h a été réduit à 16h. D'après les données bibliographiques, ce temps de réaction est suffisant puisqu'il est possible de fonctionnaliser des nanoparticules par un mPEG₆₀₀ silanisé en une durée de 12h (La Ferla *et al.* 2009) et par d'autres polymères comme le PMMA en 14h (Robin *et al.* 2008). Pour ce test, les conditions de réaction utilisées précédemment (protocole 3) ont été conservées. Les analyses réalisées par ATG (figure 104) indiquent que la perte de masse liée au mélange de polymère est de 13,5%.

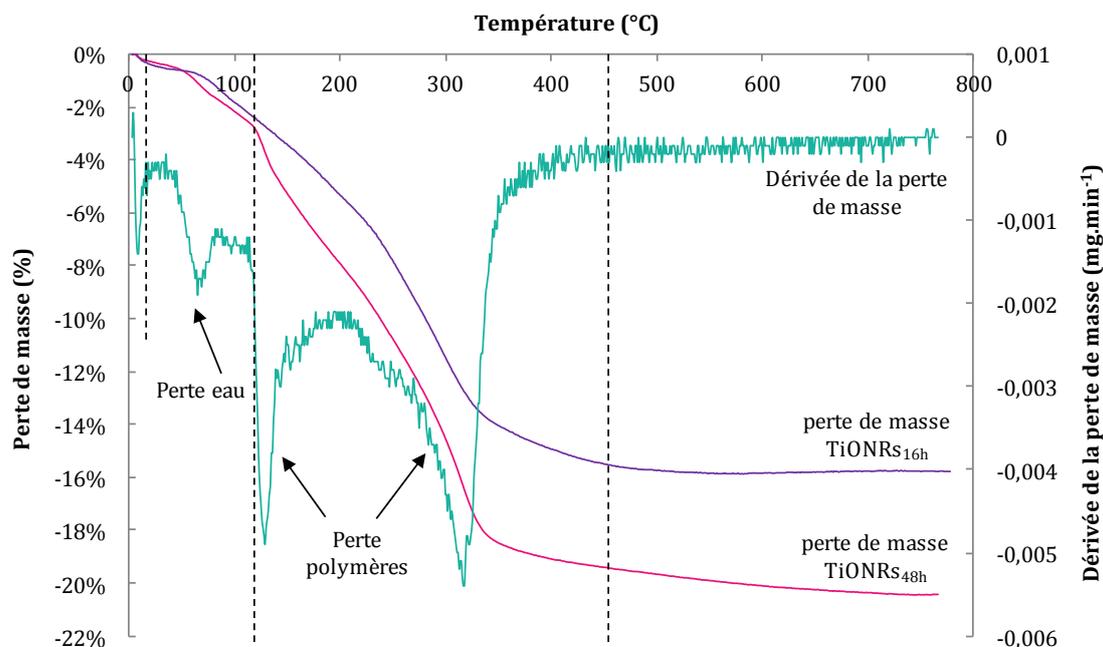


Figure 104 : ATG des nanorubans de titanates fonctionnalisés par un mélange de mPEG-Si et de Si-PEG-Mal pendant une durée de 16h et 48h (20°C, 150 tours.min⁻¹, atmosphère inerte, dichlorométhane). Les mesures ont été effectuées sous flux d'air reconstitué (N₂/O₂ = 0,12/0,04 L.min⁻¹) avec une rampe de montée en température de 2°C.min⁻¹ de 20°C à 800°C. La dérivée de la perte de masse présentée est celle des nanorubans fonctionnalisés en 48h. Toutes les dérivées avaient cependant une allure identique.

Cela correspondrait à une densité de greffage de 0,65 chaîne de mPEG-Si et de 0,05 chaîne de Si-PEG-Mal par nm² de nanorubans (tableau 26). La diminution du temps de réaction entraîne une forte diminution du taux de greffage des polymères puisqu'au bout de 16h de réaction, seulement un cinquième du mPEG-Si et un quart du Si-PEG-Mal mis en jeu sont greffés en surface des nanorubans. Un temps de réaction de 48h sera alors conservé pour la suite des travaux.

Temps	Nom	n mis en jeu (mol)	Perte de Masse tot	Nombre de chaînes	n greffé (mol)
48h	mPEG-Si	5,7 x 10 ⁻⁶	17%	1,1 par nm ²	1,8 x 10 ⁻⁶
	Si-PEG-Mal	3 x 10 ⁻⁷		0,1 par nm ²	1,5 x 10 ⁻⁷
16h	mPEG-Si	5,7 x 10 ⁻⁶	13,5%	0,65 par nm ²	1,05 x 10 ⁻⁶
	Si-PEG-Mal	3 x 10 ⁻⁷		0,05 par nm ²	7,5 x 10 ⁻⁸

Tableau 26 : Tableau récapitulatif des densités de greffage du mPEG-Si et du Si-PEG-Mal en surface des nanorubans de titanates au bout de 16h et 48h de réaction (20°C, 150 tours.min⁻¹, atmosphère inerte, dichlorométhane).

II.4.4 Comparaison du Si-PEG-Mal synthétisé au laboratoire avec un PEG-Mal commercial

Pour comparer les propriétés et la réactivité du Si-PEG-Mal synthétisé au laboratoire avec un PEG commercial, la fonctionnalisation des nanorubans a été réalisée avec ce nouveau produit. Pour des raisons économiques, ce polymère n'est pas le Si-PEG-Mal provenant de la société Nanocs mais du HO-PEG₅₀₀₀-Mal provenant de JenKem Technology et présentant un prix

plus abordable (figure 105). Ce polymère, d'une pureté supérieure à 95%, est en réalité semi commercial puisqu'il a été silanisé au laboratoire.

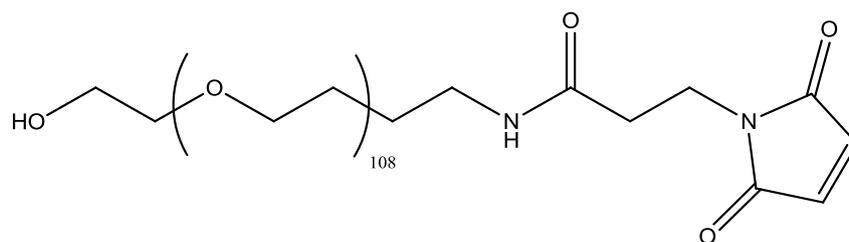


Figure 105 : Structure chimique du HO-PEG-Mal commercial provenant de JenKem Technology.

Les meilleures conditions de silanisation du HO-PEG-Mal synthétisé au laboratoire ont donc été appliquées au polymère commercial (tableau 11). Malheureusement, ces conditions ne sont pas adaptées pour le greffage du groupement silane sur l'extrémité hydroxyle du HO-PEG-Mal commercial. En effet, d'après les analyses réalisées par spectroscopie RMN ^1H , les groupements maléimide sont hydrolysés pendant la réaction et la silanisation n'a pas eu lieu. Cela peut s'expliquer par le fait que le HO-PEG-Mal synthétique et commercial possèdent des fonctions d'accroche du groupement maléimide différentes. Le PEG commercial ne contient pas de cycle aromatique dans sa structure. La réactivité et la stabilité des deux polymères n'est donc pas identique. Un deuxième essai de greffage a alors été réalisé cette fois ci dans les meilleures conditions de silanisation du mPEG (tableau 12) qui comme le HO-PEG-Mal commercial ne possède pas de cycle aromatique dans sa structure. Les résultats RMN ^1H étant identiques à ceux du premier essai, une troisième tentative a été réalisée.

Protocole 5

La silanisation a été effectuée en présence de dichlorométhane et avec une concentration de PEG de 100 mg.mL^{-1} . Les conditions de réaction ont été un temps de 5 jours, une température de 40°C , un rapport molaire d'IPTES de 5 : 1 par rapport au PEG, une forte agitation magnétique de $700 \text{ tours.min}^{-1}$ et une atmosphère inerte en continu (tableau 27).

	Temps	Température	Rapport molaire (/PEG)	Solvant	Taux de silanisation
1 ^{er} essai	5 jours	20°C	5	dichlorométhane	0%
2 ^{ème} essai	48h	70°C	5	THF anhydre	0%
3 ^{ème} essai	5 jours	40°C	5	dichlorométhane	80%

Tableau 27 : Tableau récapitulatif des différentes conditions testées pour la silanisation du HO-PEG-Mal commercial ainsi que des taux de conversion du HO-PEG-Mal en Si-PEG-Mal déterminés par spectroscopie RMN ^1H .

D'après les analyses réalisées par spectroscopie RMN ^1H , tous les pics caractéristiques du greffage du groupement silane sont présents sur le spectre du Si-PEG-Mal synthétisé selon les conditions du protocole 5. L'intégration de ces différents pics indique que le taux de silanisation est de 80%. Cependant, l'intégration des pics placés aux alentours de 6,4 et 6,7 ppm (pics rose et violet) indique que le taux de greffage du groupement maléimide, initialement de 100%, ne vaut plus que 80%. Cela laisse penser qu'une partie d'entre eux se sont hydrolysés au cours de la réaction de silanisation (figure 106).

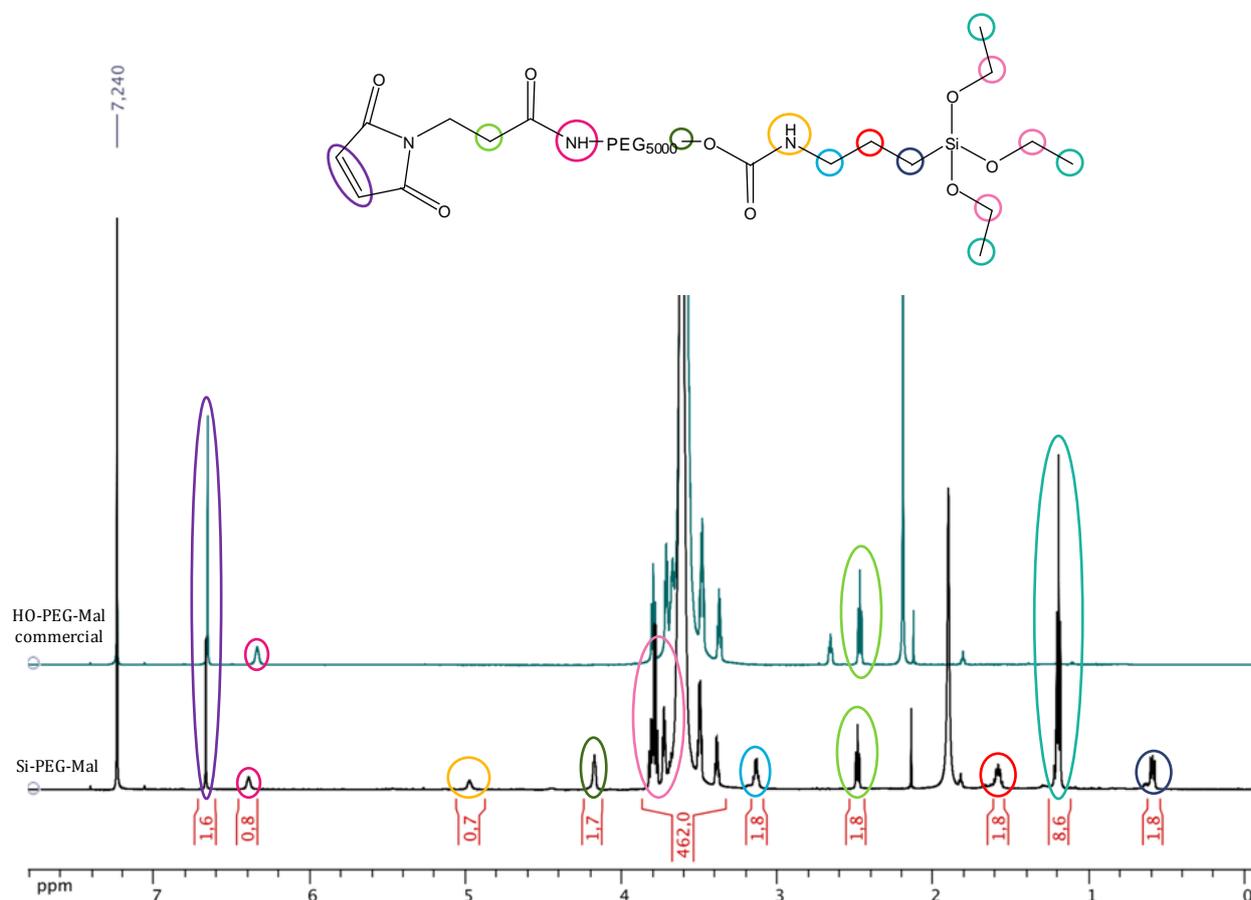


Figure 106 : Spectre RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3 , 293K) du Si-PEG-Mal synthétisé à partir du HO-PEG-Mal commercial (5 jours, 40°C , rapport molaire des réactifs 5 : 1, forte agitation magnétique ($700 \text{ tours}\cdot\text{min}^{-1}$), atmosphère inerte, dichlorométhane).

Les analyses réalisées en spectroscopie IR confirment que le HO-PEG-Mal commercial a été silanisé (figure 107). La présence des pics caractéristiques de la vibration de déformation de la liaison N-H (1500 cm^{-1}) et de la vibration d'élongation de la liaison C=O (1720 cm^{-1}) confirme que le groupement silane est greffé sur l'extrémité hydroxyle du PEG.

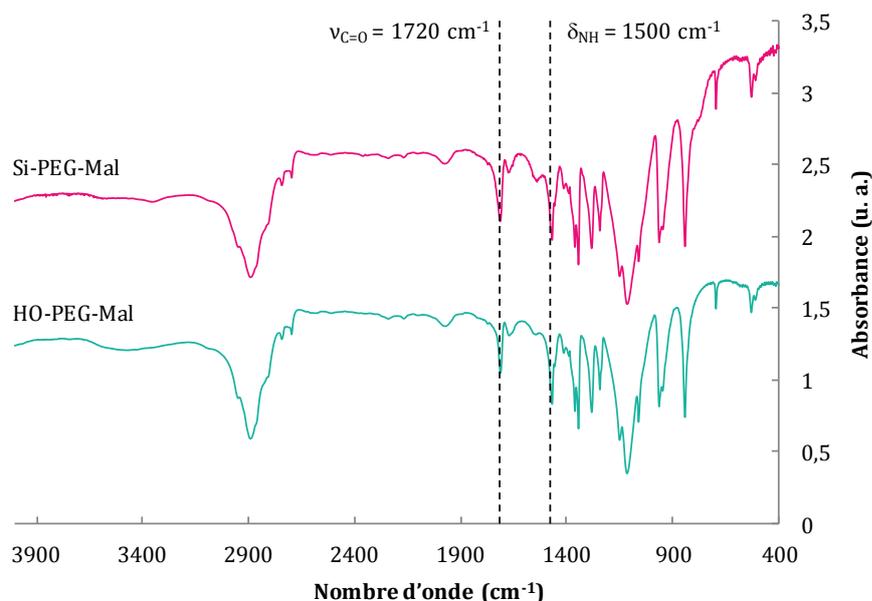


Figure 107 : Spectres Infra-Rouge du HO-PEG-Mal commercial et Si-PEG-Mal synthétisé (5 jours, 40°C, rapport molaire des réactifs 5 : 1, forte agitation magnétique (700 tours.min⁻¹), atmosphère inerte, dichlorométhane) obtenus en transmission (pastilles de KBr).

Une fois silanisé, le Si-PEG-Mal commercial modifié par nos soins a été greffé en surface des nanorubans de titanates (protocole 4). Les résultats ATG (figure 108) indiquent que la perte de masse liée au mélange de polymère est de 19,9% (annexe 8). Ce taux correspond à des densités de greffage de 1,2 chaînes de mPEG-Si et 0,1 chaîne de Si-PEG-Mal par nm² de nanorubans.

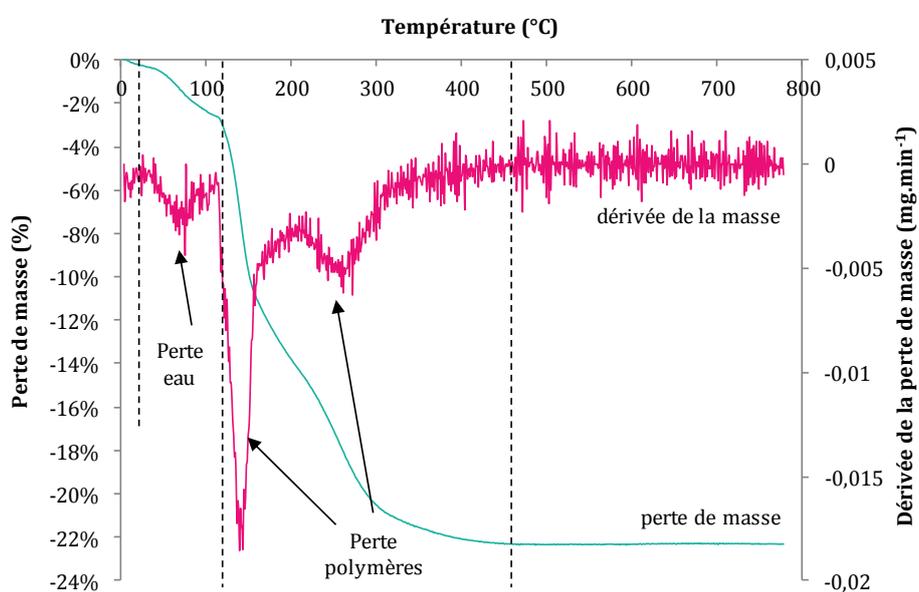


Figure 108 : ATG des nanorubans de titanates fonctionnalisés par un mélange de mPEG-Si et de Si-PEG-Mal commercial (20°C, 48h, 150 tours.min⁻¹, atmosphère inerte, dichlorométhane). Les mesures ont été effectuées sous flux d'air reconstitué (N₂/O₂ = 0,12/0,04 L.min⁻¹) avec une rampe de montée en température de 2°C.min⁻¹ de 20°C à 800°C.

Après l'étape de silanisation, le HO-PEG-Mal synthétisé au laboratoire et le HO-PEG-Mal commercial présentent tous les deux une pureté de 80%. Malgré une pureté finale identique, il est cependant important de noter que le PEG commercial semble avoir tendance à s'hydrolyser plus facilement que le PEG synthétisé au laboratoire. Leur taux de greffage en surface des nanorubans est également identique puisque pour les deux polymères il atteint une valeur de 0,1 chaîne par nm². A ce stade de l'expérimentation, le Si-PEG-Mal synthétisé au laboratoire semble plus avantageux que le polymère commercial car il serait plus stable face au phénomène de l'hydrolyse. Des observations MET des nanorubans fonctionnalisés par le Si-PEG-Mal commercial devront cependant être réalisées pour pouvoir comparer le pouvoir dispersant des deux polymères. Enfin, le greffage ciblé de protéines par l'intermédiaire des deux PEG permettra de savoir si la réactivité du groupement maléimide est identique selon leur provenance.

II.5 Fonctionnalisation des nanorubans d'oxydes de titane par un autre PEG hétérobifonctionnel : le Si-PEG₅₀₀₀-NHS

II.5.1 Utilisation du Si-PEG-NHS pour un ciblage des protéines par l'intermédiaire du couplage NHS/Lys

Le PEG hétérobifonctionnel est le composant le plus sensible du nanobiohybride. En effet, le groupement maléimide a tendance à s'hydrolyser facilement ce qui le rend instable au cours du temps. Pour limiter ce problème, trois stratégies sont envisageables :

- La première stratégie consiste à remplacer le groupement maléimide par un autre groupement fonctionnel, comme le vinyl sulfone (VS) (figure 109), possédant une réactivité et une affinité similaires mais présentant une stabilité envers l'hydrolyse plus importante. Comme le maléimide, ce groupement présente une forte affinité avec les cystéines. Le couplage VS-Cys permet un greffage stable et irréversible entre les protéines et le PEG par formation de liaisons thioéther (Morales-Sanfrutos *et al.* 2010, Mero *et al.* 2011).

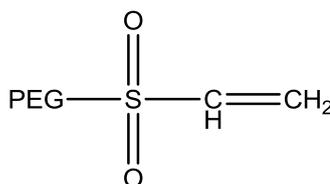


Figure 109 : Structure chimique d'un groupement vinyl sulfone greffé sur l'extrémité d'un PEG.

- La deuxième stratégie repose sur l'utilisation d'une technique de biologie chimiosélective, la ligation chimique, en lieu et place de la réaction avec le groupement maléimide. Par cette méthode, la cystéine pourrait se combiner directement avec le PEG sans passer par un couplage avec la fonction maléimide. Le greffage se fait par formation d'une liaison amide induite par une transthioesterification suivie d'un réarrangement nucléophile intramoléculaire entre le thioester formé et la cystéine (figure 110) (Dawson *et al.* 1994, Byun *et al.* 2011).

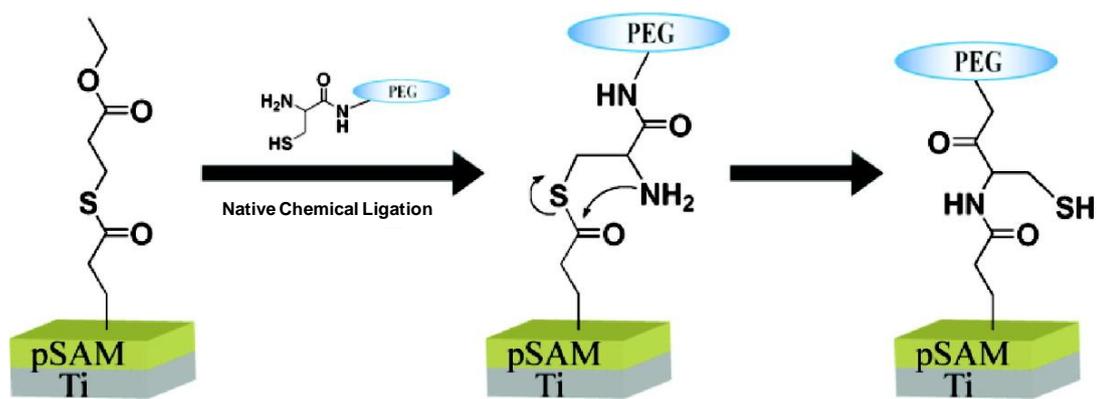


Figure 110 : Schéma illustrant le principe de greffage d'une cystéine par la technique de la ligation chimique d'après (Byun *et al.* 2011).

- Pour lutter contre l'instabilité du groupement maléimide, il est envisagé dans la troisième stratégie, de réaliser un greffage ciblé du collagène-like sur le PEG par l'intermédiaire d'un autre couplage. Le couple Maléimide-Cystéine pourrait être remplacé par le couple Succinimide-Lysine (Usha *et al.* 2012). Le collagène-like présentant dans sa séquence d'acides aminés plusieurs lysines, cette option semble parfaitement appropriée. En plus de pallier au problème d'instabilité du groupement maléimide, le couplage par l'intermédiaire du NHS permet de valider le concept du nouveau nanobiohybride pour toutes sortes de molécules biologiques.

II.5.2 Silanisation du HO-PEG-NHS commercial au laboratoire

Pour tester le greffage ciblé du collagène par l'intermédiaire du couplage NHS-Lys, un HO-PEG₅₀₀₀-NHS provenant de JenKem Technology et présentant une pureté supérieure à 95% (figure 111) a été silanisé au laboratoire (protocole 5).

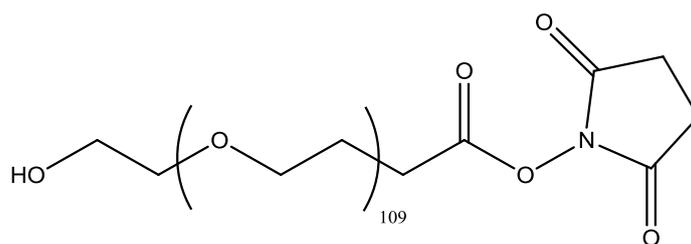


Figure 111 : Structure chimique du HO-PEG-NHS commercial provenant de JenKem Technology.

Les analyses réalisées par spectroscopie RMN ¹H montrent que dans ces conditions, le taux de silanisation atteint 90% (figure 112). Cependant, le dédoublement du pic placé aux alentours de 2,8 ppm, laisse supposer qu'une partie des groupements NHS se sont hydrolysés au cours de la réaction de greffage du groupement silane. Cette supposition est confirmée par l'intégration des pics caractéristiques de la fonction NHS, placés aux alentours de 2,8 et 4,5 ppm (pics violet et vert), qui indique que son taux de greffage passe de 100% à 80% après l'étape de silanisation.

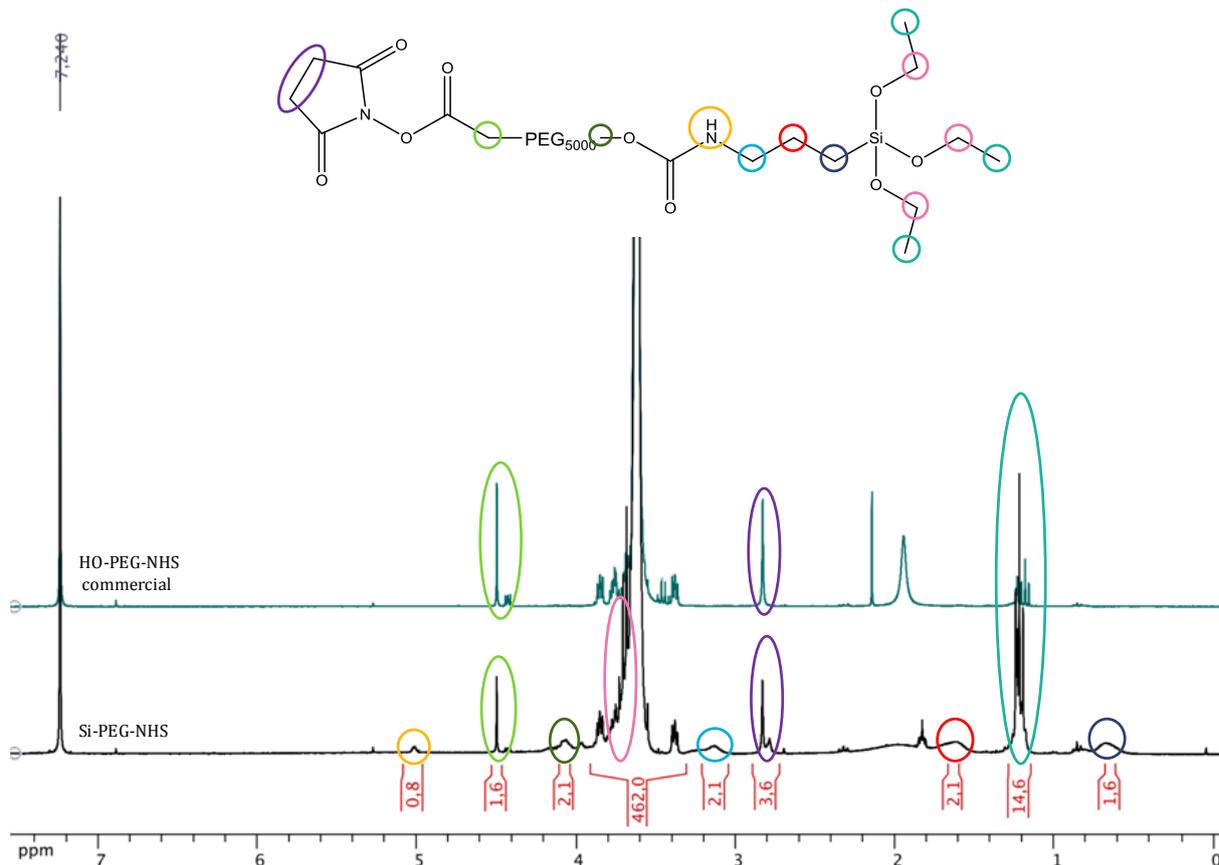


Figure 112 : Spectre RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3 , 293K) du Si-PEG-NHS synthétisé à partir du HO-PEG-NHS commercial (5 jours, 40°C , rapport molaire des réactifs 5 : 1, forte agitation magnétique ($700 \text{ tours}\cdot\text{min}^{-1}$), atmosphère inerte, dichlorométhane).

Les analyses réalisées en spectroscopie IR ne permettent pas de confirmer que le HO-PEG-NHS commercial a été silanisé. La forte présence d'eau dans les échantillons entraîne une interférence et un bruit de fond qui brouille les spectres. Les pics de la vibration de déformation de la liaison N-H (1500 cm^{-1}) et de la vibration d'élongation de la liaison C=O (1720 cm^{-1}) confirmant le greffage du groupement silane sur l'extrémité hydroxyle du PEG ne sont alors pas discernables (figure 113).

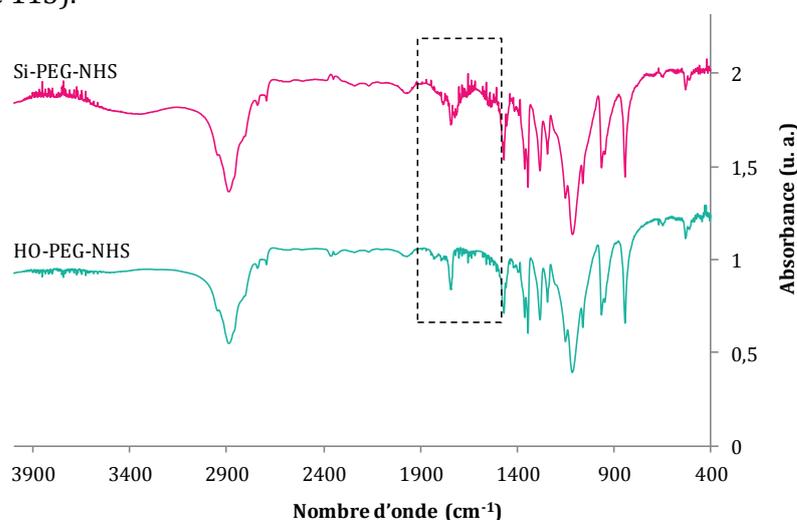


Figure 113 : Spectres Infra-Rouge du HO-PEG-NHS commercial et du Si-PEG-NHS synthétisé (5 jours, 40°C , rapport molaire des réactifs 5 : 1, forte agitation magnétique ($700 \text{ tours}\cdot\text{min}^{-1}$), atmosphère inerte, dichlorométhane) obtenus en transmission (pastilles de KBr).

II.5.3 Fonctionnalisation des nanorubans d'oxydes de titane par le Si-PEG-NHS commercial

Une fois silanisé, le Si-PEG-Mal semi commercial a été greffé en surface des nanorubans de titanates (protocole 4). Les résultats ATG (figure 114) indiquent que la perte de masse liée au mélange de polymère est, dans ce cas, comprise entre 105 et 450°C et vaut 17,7% (annexe 8). Ce taux correspond à des densités de greffage de 1 chaîne de mPEG-Si et 0,1 chaîne de Si-PEG-Mal par nm² de nanorubans. Ce taux est identique à celui du Si-PEG-Mal commercial et synthétisé au laboratoire.

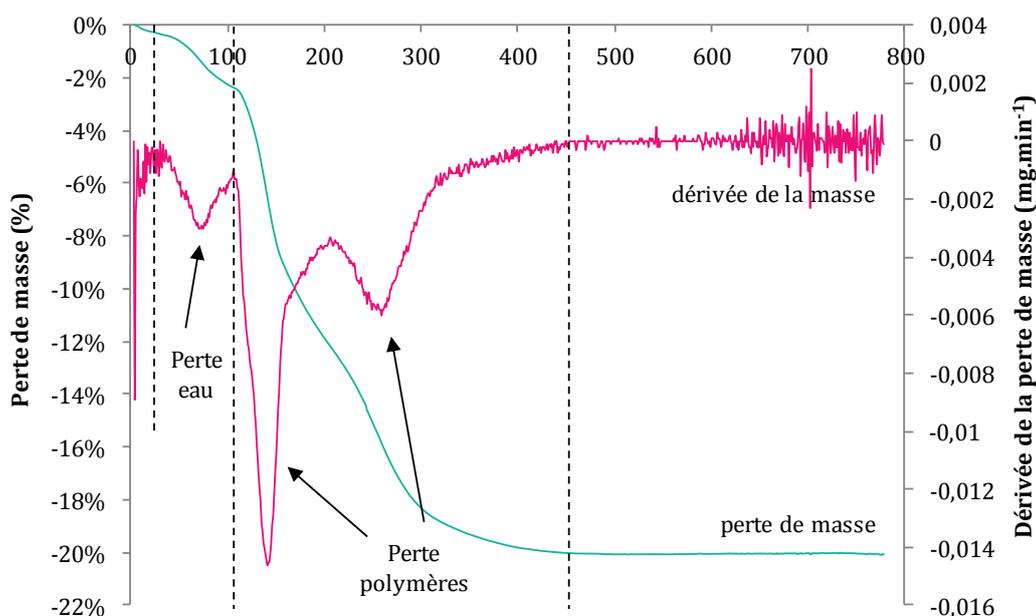


Figure 114 : ATG des nanorubans de titanates fonctionnalisés par un mélange de mPEG-Si et de Si-PEG-NHS commercial (20°C, 48h, 150 tours.min⁻¹, atmosphère inerte, dichlorométhane). Les mesures ont été effectuées sous flux d'air reconstitué (N₂/O₂ = 0,12/0,04 L.min⁻¹) avec une rampe de montée en température de 2°C.min⁻¹ de 20°C à 800°C.

II.5.4 Comparaison et conclusion quant au choix du polymère hétérofonctionnel permettant la fonctionnalisation des nanorubans de titanates

Comme le Si-PEG-Mal commercial, le Si-PEG-NHS aurait tendance à s'hydrolyser lors de sa silanisation. Ce constat laisse supposer que le groupement NHS n'est alors pas approprié pour remplacer le groupement maléimide étant donné que sa stabilité face au phénomène d'hydrolyse n'est pas meilleure. De plus, même si le couplage NHS/Lys est actuellement le plus répandu pour le greffage de protéines, il souffre néanmoins d'un manque de ciblage dans le cas de l'utilisation du collagène-like produit par NVH Medicinal. En effet, contrairement à la cystéine, plusieurs lysines sont présentes au sein de la séquence d'acides aminés de cette protéine. Le Si-PEG-Mal synthétisé au laboratoire est donc pour le moment le plus approprié pour l'élaboration du nouveau nanobiohybride. Cependant, pour ne pas tirer de conclusions trop hâtives, des observations MET et des tests de greffage ciblé de protéines devront être réalisés pour pouvoir comparer le pouvoir dispersant et la réactivité du groupement NHS à ceux du groupement maléimide.

II.6 Greffage ciblé de protéines sur les nanorubans de titanates fonctionnalisés : deuxième étape de la formation du nouveau nanobiohybride

Des essais préliminaires de greffage ciblé de protéines, correspondant à la deuxième étape de formation du nouveau nanobiohybride, ont été réalisés. Pour ces premiers tests, seuls les nanorubans de titanates fonctionnalisés par un mélange de mPEG-Si et de Si-PEG-Mal synthétisés au laboratoire ont été utilisés. Pour rappel, ce greffage se fait par l'intermédiaire du groupement maléimide présentant une forte affinité avec les cystéines contenues dans la séquence d'acides aminés de nombreuses protéines. Trois peptides synthétiques différents provenant de GENEPEP ont été testés. Le premier peptide (GPS-4739-1S) est un peptide monomérique mimant la partie C-terminale du collagène-like produit par NVH Medicinal*. Le deuxième peptide (GPS-2871), qui servira de témoin, est analogue au premier sauf qu'il ne possède pas de cystéine dans sa séquence d'acides aminés. Il ne devrait donc pas être greffé de manière spécifique en surface des nanorubans. Le troisième peptide (GPS-4741) est quant à lui un tripeptide possédant deux cystéines dans sa séquence d'acides aminés et mimant à la fois la conformation en triple-hélices et la partie C-terminale du collagène-like.

Le couplage Mal/Cys se déroule en plusieurs étapes. Une étape de réduction des peptides permettant de cliver les ponts dissulfures est nécessaire pour rendre les cystéines accessibles et réactives. Pour cela, les peptides ont été incubés 1h à 37°C en présence de (tris(2-carboxyethyl)phosphine (TCEP) préalablement lavée (3 fois) par un tampon contenant du PBS et de l'acide éthylène diamine tétraacétique (EDTA) permettant de chélater les ions métalliques résiduels. Une fois l'incubation terminée, les réactifs étant placés dans un tube à fond conique muni d'une membrane filtrante, une étape de centrifugation d'une minute à 1000 tours.min⁻¹ (930 ×g) a permis de récupérer les protéines réduites contenues dans le filtrat (annexe 9).

Les nanorubans de titanates ont quant à eux été passivés par de l'albumine de sérum bovin à 3% (BSA) pour éviter tout greffage aspécifique sur leur surface (figure 115) (Pei *et al.* 2011). Pour cela, la suspension de nanorubans a été centrifugée 2 minutes à 2000 tours.min⁻¹ (434 ×g) pour éliminer le surnageant. Les nanorubans ont ensuite été dispersés dans de la BSA puis incubés pendant 30 minutes à 37°C sur une table vibrante (600 secousses.min⁻¹). Un nouveau cycle de centrifugation a été réalisé pour éliminer la BSA pouvant perturber par la suite le test d'Ellman.

*Le collagène-like sera brièvement décrit dans le paragraphe III.2 de ce manuscrit.

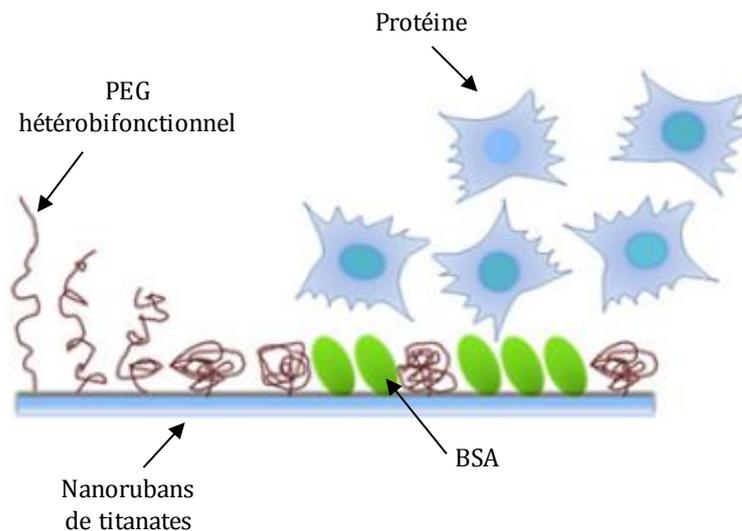


Figure 115 : Schéma illustrant la passivation des nanorubans de titanates par de la BSA pour limiter le greffage aspécifique de protéine sur leur surface d'après (Pei *et al.* 2011).

Les nanorubans en suspension dans l'eau déionisée ont ensuite été incubés en présence des peptides réduits pendant 30 minutes à température de 20°C sur une table vibrante (600 secousses.min⁻¹). Les peptides ont été introduits en excès par rapport aux groupements maléimide avec un rapport molaire des réactifs de 5 : 1. Un cycle de centrifugation (2 minutes à 2000 tours.min⁻¹ (434 ×g)) a permis de séparer les nanohybrides formés du surnageant.

Le dosage des cystéines contenues dans le surnageant par un test d'Ellman a alors permis de remonter à la quantité de protéines greffées en surface des nanorubans par l'intermédiaire du couplage Mal/Cys (annexe 10). Bien que les peptides aient été introduits en excès, les résultats indiquent qu'ils ont été greffés en quasi-totalité puisque le taux de greffage est d'environ 95% pour les trois peptides (tableau 28). Ce taux est largement supérieur à celui attendu. Cela laisse penser qu'ils se sont greffés de façon aspécifique sur l'ensemble du nanobiohybride. Cela est confirmé par le fait que le taux de greffage des peptides 1 et 2 est identique alors que le peptide 2 ne possède pas de cystéine dans sa séquence d'acides aminés. Le taux de greffage des peptides réduits et non réduits est également similaire (résultats non-présentés dans le tableau 5). Le greffage n'a donc pas eu lieu par l'intermédiaire du couplage maléimide/cystéine mais par un phénomène d'adsorption non-spécifique probablement par formations de liaisons faibles. Les conditions de réductions des peptides par le TCEP devront alors être améliorées pour les prochains tests. Enfin, le taux de greffage identique des peptides avec ou sans passivation des nanorubans à la BSA laisse supposer que la passivation n'a pas fonctionné. Les conditions de passivation des nanorubans devront donc être optimisées pour la suite de l'étude.

	m NRs	S _{BET} NRs	Taux greffage Si-PEG-Mal	n Si-PEG-Mal	n pep	n _{théo} pep greffé	n _{exp} pep greffé
Pep 1	0,15 mg	25 m ² .g ⁻¹	0,1 chaîne.nm ⁻²	6,2 × 10 ⁻¹⁰ mol	3,1 × 10 ⁻⁹ mol	6,2 × 10 ⁻¹⁰ mol	2,9 × 10 ⁻⁹ mol
Pep 1 +BSA	0,15 mg	25 m ² .g ⁻¹	0,1 chaînes.nm ⁻²	6,2 × 10 ⁻¹⁰ mol	3,1 × 10 ⁻⁹ mol	6,2 × 10 ⁻¹⁰ mol	2,9 × 10 ⁻⁹ mol
Pep 2	0,15 mg	25 m ² .g ⁻¹	0,1 chaîne.nm ⁻²	6,2 × 10 ⁻¹⁰ mol	3,1 × 10 ⁻⁹ mol	6,2 × 10 ⁻¹⁰ mol	3 × 10 ⁻⁹ mol
Pep 2 +BSA	0,15 mg	25 m ² .g ⁻¹	0,1 chaîne.nm ⁻²	6,2 × 10 ⁻¹⁰ mol	3,1 × 10 ⁻⁹ mol	6,2 × 10 ⁻¹⁰ mol	2,9 × 10 ⁻⁹ mol
Pep 3	0,15 mg	25 m ² .g ⁻¹	0,1 chaîne.nm ⁻²	6,2 × 10 ⁻¹⁰ mol	3,1 × 10 ⁻⁹ mol	6,2 × 10 ⁻¹⁰ mol	2,9 × 10 ⁻⁹ mol
Pep 3 +BSA	0,15 mg	25 m ² .g ⁻¹	0,1 chaîne.nm ⁻²	6,2 × 10 ⁻¹⁰ mol	3,1 × 10 ⁻⁹ mol	6,2 × 10 ⁻¹⁰ mol	2,8 × 10 ⁻⁹ mol

Tableau 28 : Tableau récapitulatif des quantités des différents peptides greffées en surface des nanorubans fonctionnalisés par un mélange de mPEG-Si (95%) et de Si-PEG-Mal (5%).

II.7 Conclusion

Les différents travaux présentés au cours de ce deuxième chapitre de thèse ont abouti à la synthèse d'un PEG hétérobifonctionnel pur à 80% : le Si-PEG-Mal. L'élaboration de ce polymère à partir d'un HO-PEG-NH₂ se déroule en plusieurs étapes. La première étape de synthèse consiste à greffer le groupement maléimide sur l'extrémité amine du PEG par l'intermédiaire de l'ester activé succinimido-4-maléimido benzoate. Les conditions de cette réaction sont :

- un temps de réaction de 16h,
- une température de réaction de 20°C,
- une proportion molaire de réactifs de 5 : 1 par rapport au PEG,
- une forte agitation magnétique de 700 tours.min⁻¹.

La réaction se déroule en présence de dichlorométhane en proportion de 500 µL pour 50 mg de PEG pour favoriser la cinétique de réaction. Une étape de purification du polymère par chromatographie flash est nécessaire pour éliminer l'ester activé n'ayant pas réagi et le N-hydroxysuccinimide formé lors de la réaction. Cette étape permet d'augmenter le niveau de pureté du HO-PEG-Mal synthétisé de 70% à 90%. La seconde étape de synthèse consiste à greffer le groupement silane sur l'extrémité hydroxyle du HO-PEG-NH₂ par l'intermédiaire de l'alkoxysilane 3-isocyanato propyltriéthoxysilane. Les conditions de réaction sont :

- un temps de réaction de 5 jours,
- une température de réaction de 20°C,
- une proportion molaire de réactif de 5 : 1 par rapport au PEG,
- une forte agitation magnétique de 700 tours.min⁻¹,
- une atmosphère inerte.

La réaction se déroule également en présence de dichlorométhane en proportion de 500 µL pour 50 mg de PEG. A ce stade, le Si-PEG-mal synthétisé atteint une pureté de 80%.

La première étape de formation du nouveau nanobiohybride a également été accomplie. La fonctionnalisation des nanorubans de titanates se fait par un mélange de polymères contenant 5% de Si-PEG-Mal, permettant le greffage ciblé de protéines, et par 95% de mPEG-Si ceci afin de limiter les phénomènes d'adsorptions aspécifiques en surface des rubans. Lors du greffage du polymère, les 20% de sous-produits de synthèse contenus dans le Si-PEG-Mal synthétique ne pourront pas se greffer en surface des nanorubans car ils ne comportent pas dans leur structure de groupement silane. Ils seront alors en grande partie éliminés lors des lavages. Les conditions de greffage sont :

- un temps de réaction de 48h,
- une température de réaction de 20°C,
- un grand volume de dichlorométhane,
- une faible agitation magnétique de 150 tours.min⁻¹,
- une atmosphère inerte sous flux d'azote.

Lorsque le greffage se déroule dans des proportions massiques de polymères de 3 : 1 par rapport aux nanorubans, la densité de greffage en surface des rubans atteint une valeur de 1,1 chaînes du mPEG-Si et 0,1 chaîne de Si-PEG-Mal par nm² de nanorubans. Pour mettre en avant les propriétés du Si-PEG-Mal synthétisé au laboratoire, la fonctionnalisation des nanorubans a également été réalisée par un Si-PEG-Mal commercial. Les résultats préliminaires de cette étude indiquent que le polymère synthétisé au laboratoire présenterait une meilleure stabilité vis-à-vis du phénomène d'hydrolyse.

Enfin, pour montrer que le concept du nouveau nanobiohybride peut s'adapter à toutes sortes de molécules biologiques, les nanorubans ont été fonctionnalisés par un autre PEG hétérobifonctionnel : Si-PEG-NHS. Ce polymère va permettre un greffage ciblé des protéines par l'intermédiaire d'un autre couplage spécifique : le couplage NHS/lysine, le plus répandu actuellement. Ce dernier souffre néanmoins d'un manque de ciblage à l'intérieur de la protéine puisque de nombreuses lysines sont présentes dans sa séquence d'acides aminés.

Le greffage ciblé de protéines sur les nanorubans fonctionnalisés, correspondant à la deuxième étape de formation du nouveau nanobiohybride, a été tenté. Cependant, le greffage ciblé des protéines par l'intermédiaire du couplage spécifique maléimide/cystéine n'est pour le moment pas attesté. Il semble que l'on ait plutôt à faire à un phénomène d'adsorption non spécifique des peptides. Les conditions de réaction doivent être optimisées dans le but d'éliminer tout greffage aspécifique.

Chapitre III : Formulation d'un nouveau nanobiohybride destiné au domaine de la nanomédecine : utilisation en tant qu'agent hémostatique, agent cicatrisant et pour la médecine régénérative

Ce troisième chapitre est tout d'abord consacré à l'étude bibliographique des agents hémostatiques et des agents cicatrisants actuellement commercialisés et utilisés au sein des blocs opératoires. Il s'agit ici de détailler les produits concurrents de cette première cible d'application. L'étude porte également sur les agents employés pour la médecine régénérative ainsi que sur les nouveaux produits à base de nanofibres destinés à des applications dans le domaine de la nanomédecine. La deuxième partie de ce chapitre est quant à elle dédiée à l'estimation de la toxicité des différents éléments constituant le nouveau nanobiohybride ainsi qu'à sa formulation galénique.

III.1 Etat de l'art

Le milieu biomédical est un domaine en constante progression avec ces dernières années, de nombreuses avancées liées au développement de nouveaux produits issus des nanotechnologies et de l'ingénierie de protéines. Ces nouveaux produits ont également des applications dans le domaine de la médecine régénérative et de l'ingénierie tissulaire en favorisant notamment le processus de l'hémostase et de la cicatrisation.

III.1.1 Les différentes étapes de la cicatrisation d'une plaie

La cicatrisation d'une plaie aiguë est un processus adaptatif complexe de réponse à une atteinte tissulaire qui conduit à la réparation et la régénération de la zone lésée (Gurtner *et al.* 2008). Ce processus biologique, générique et coordonné se décompose en quatre phases pendant lesquelles des mécanismes cellulaires et moléculaires complexes ont lieu.

La première phase correspond à **l'hémostase**. L'hémostase primaire débute par une vasoconstriction c'est-à-dire une diminution du calibre des vaisseaux sanguins pouvant aller jusqu'à 30 %. Chronologiquement survient ensuite la formation du clou plaquettaire, appelé également thrombus blanc, qui est secondaire à l'agrégation des plaquettes entre elles. Les plaquettes se fixent sur les parois lésées au contact du collagène puis se regroupent en quelques secondes grâce à l'intervention d'une protéine du plasma appelée le facteur de Willebrand. Il favorise la liaison entre les protéines entrant dans la constitution des plaquettes et le collagène recouvrant l'intérieur des parois des vaisseaux. L'activation d'une partie des corps gras, les phospholipides, permet la contraction et la sécrétion d'autres substances dont la sérotonine et l'acide adénosine diphosphorique (ADP), permettant l'agrégation des plaquettes constituant le clou plaquettaire (De Revel *et al.* 2004).

Intervient ensuite l'hémostase secondaire ou coagulation proprement dite correspondant à une succession de réactions qui opèrent en cascade et où interviennent des protéines qui sont normalement présentes dans le sang et plus précisément dans le plasma. Ces réactions ont pour résultat de transformer une protéine soluble, le fibrinogène en une protéine insoluble : la fibrine. La fibrine est en quelque sorte le squelette du caillot nouvellement constitué (figure 116) (De Revel *et al.* 2004).

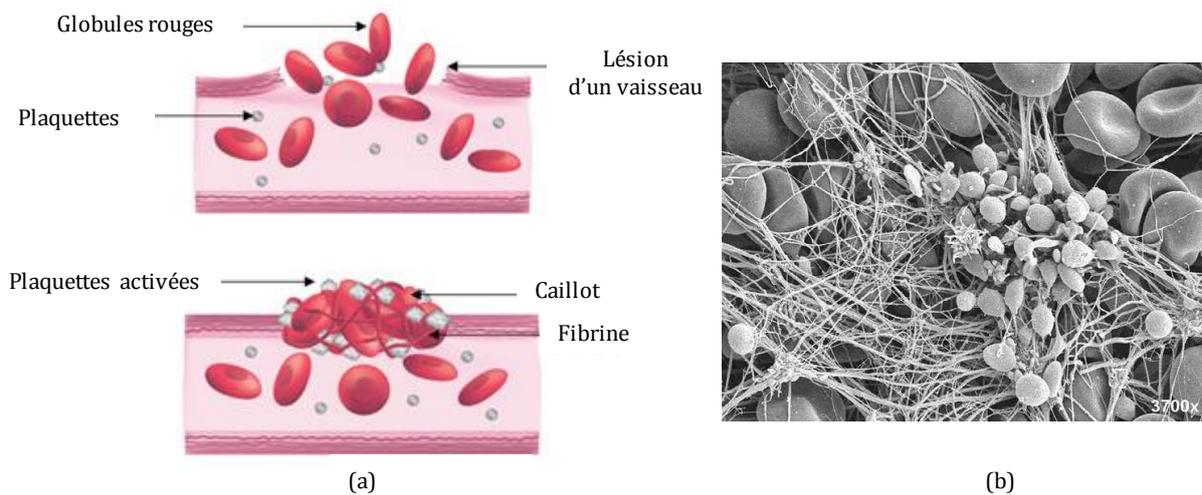


Figure 116 : (a) Schéma du mécanisme de formation d'un caillot fibrino-plaquettaire permettant d'arrêter les saignements lors du processus de l'hémostase. (b) Clichés MEB d'un caillot fibrino-plaquettaire.

La deuxième phase correspond à **la phase inflammatoire**. Après formation du caillot fibrino-plaquettaire arrêtant les saignements, les neutrophiles polynucléaires, qui ont pour mission de nettoyer et détruire les débris et les microorganismes, arrivent en grand nombre sur le site lésé et sécrètent des cytokines et des enzymes protéolytiques. Ils sont suivis par les macrophages qui vont phagocyter les plus grosses particules et présenter les antigènes aux lymphocytes T appartenant à la famille des globules blancs. En plus d'avoir un rôle dans la lutte anti-bactérienne et immunitaire, les macrophages sécrètent et libèrent également un grand nombre de facteurs de croissance et de protéines comme les cytokines activant les fibroblastes et favorisant la croissance de nouveaux vaisseaux sanguins (figure 117a) (Keast *et al.* 2008, Diegelmann. 2004). Cette phase dure entre 0 et 2 jours.

La troisième phase correspond à **la phase de prolifération**. Les macrophages jouent un rôle encore important en sécrétant des facteurs permettant de stimuler l'angiogenèse, la prolifération fibroblastique et la synthèse de collagène (Keast *et al.* 2008, Diegelmann. 2004). Dans un premier temps, les kératinocytes qui jouent un rôle dans l'imperméabilité de la peau et constituent une barrière contre les agents infectieux externes, prolifèrent puis migrent au niveau de la zone lésée pour recouvrir la lésion. Une néo-angiogenèse se produit de façon concomitante afin d'apporter sur sites les cellules qui vont permettre la cicatrisation notamment les fibroblastes qui vont envahir le tissu de granulation et se transformer en myofibroblastes contractiles. Ces derniers vont sécréter du collagène III surtout (du type I en moindre quantité) et rapprocher les bords de la blessure par contraction du tissu de granulation (figure 117b). Cette phase dure entre 2 et 10 jours.

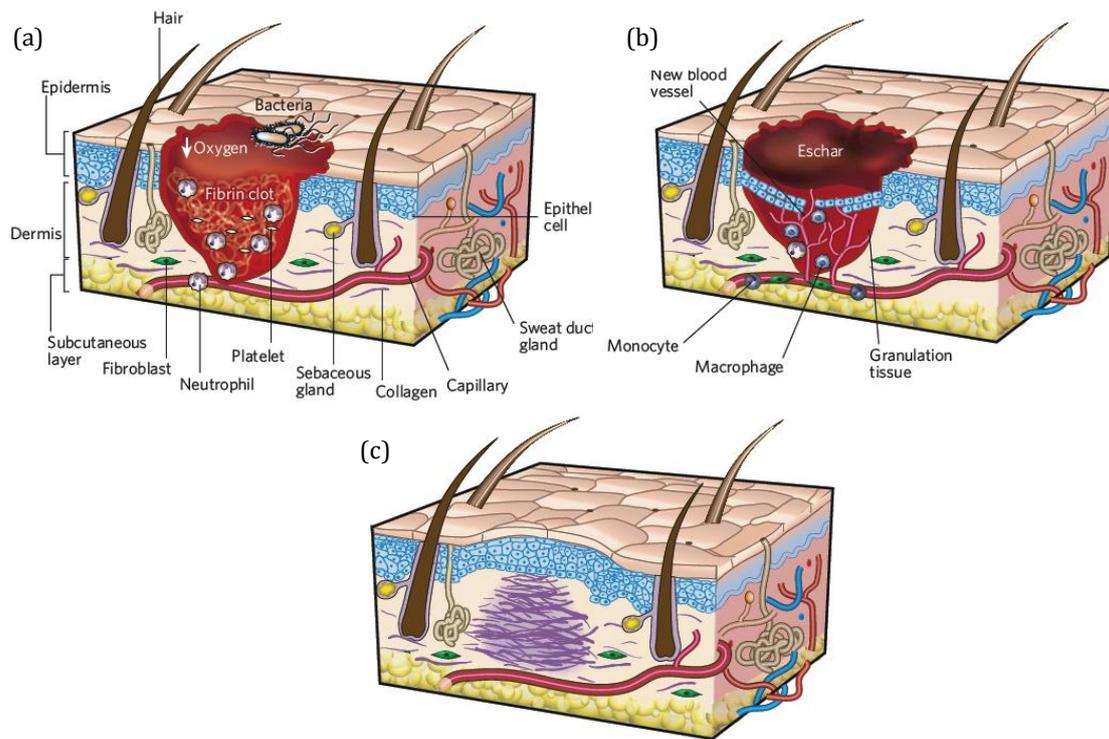


Figure 117 : Schéma illustrant les différentes phases du processus de cicatrisation. (a) phase inflammatoire, (b) phase de prolifération et (c) phase de maturation d'après (Gurtner *et al.* 2008).

La quatrième phase correspond à **la phase de maturation**. Il se produit un remodelage du tissu de granulation qui disparaît et une cicatrice constituée d'un tissu conjonctif fibreux se forme (Keast *et al.* 2008, Diegelmann. 2004). Les fibroblastes et myofibroblastes sécrètent des quantités importantes de collagène. La plupart des capillaires précédemment formés disparaissent et la grande majorité des myofibroblastes connaît une différenciation terminale et meurt par apoptose (dans le cas contraire, une fibrose importante va s'installer) (figure 117c). Cette phase dure entre 2 semaines et 1 an.

Le nouveau nanobiohybride à base de nanorubans de titanates est destiné à être utilisé pour favoriser les différentes phases de la cicatrisation d'une plaie. Lorsque son utilisation va permettre l'adhésion des plaquettes sanguines, il jouera le rôle d'agent hémostatique. En revanche, lorsque sa présence va permettre la prolifération des fibroblastes, il jouera dans ce cas le rôle d'agent cicatrisant.

III.1.2 Les agents hémostatiques commerciaux

Actuellement, une quinzaine d'agents hémostatiques sont utilisés dans les blocs opératoires pour stopper les saignements. Ces produits se divisent en trois grandes familles : les hémostatiques, les enduits et les adhésifs. La famille des hémostatiques est la plus grande et est constituée de trois sous parties : les agents mécaniques, les agents actifs et les matrices (Spotnitz *et al.* 2008).

III.1.2.1 Les agents mécaniques (tableau 29)

Dans la catégorie des agents mécaniques, quatre produits différents sont commercialisés. Le premier, **la gélatine porcine** se présente sous forme de poudre (Spotnitz *et al.* 2008). Elle joue le rôle de barrière mécanique en formant une matrice qui stoppe les saignements. Cependant, ce produit présente un fort inconvénient, il ne doit pas être utilisé dans des zones infectées et peut causer des réactions secondaires. De plus, cet hémostat peut endommager les structures voisines de la zone d'application et notamment les nerfs. Pour ces raisons, la gélatine porcine doit être retirée de l'organisme le plus rapidement possible et doit être utilisée à très faible dose. Enfin, ce produit ne peut pas être utilisé pour tout type de chirurgie. A cause des risques d'embolie, ce produit n'est pas approprié pour une utilisation intra-vasculaire et pour les neurochirurgies.

Le deuxième, **le collagène bovin** se présente sous deux formes, en feuille ou en poudre. Cet hémostatique est extrait du tendon d'Achille ou du derme du bœuf (Spotnitz *et al.* 2008). Cet agent ne fonctionne pas seulement en formant une matrice permettant de stopper les saignements, il favorise également l'agrégation plaquettaire et permet la libération des facteurs de coagulation qui vont se combiner avec les facteurs du plasma pour former un caillot de fibrine. La formation d'une barrière mécanique associée à l'augmentation de l'agrégation plaquettaire aboutit à un phénomène d'hémostase qui s'achève au bout de 1 à 5 minutes. Les tests *in vivo* et *in vitro* réalisés avec ce produit indiquent que le collagène bovin est actuellement le meilleur hémostat utilisé au bloc opératoire. Cependant, il ne peut être utilisé pour des chirurgies dans des petites cavités ni pour des utilisations ophtalmologiques ni urologiques. De plus, cet agent peut entraîner des allergies et provoquer des réactions secondaires.

Le troisième, **la cellulose oxydée régénérée** se présente sous la forme de feuille et est dérivée du coton (Spotnitz *et al.* 2008). Cet hémostatique présente l'avantage d'être antibactérien grâce à l'environnement acide qu'il crée. La cellulose joue le rôle de barrière mécanique en stoppant les saignements mais facilite également le processus de l'hémostase en dénaturant les protéines du sang. Son utilisation est idéale dans le cas de saignements des capillaires, des veines et des petites artères. En revanche, il est inapproprié pour les chirurgies neurologiques et urologiques. De plus, il peut provoquer des réactions secondaires et son pH fortement acide l'empêche d'être combiné à d'autres agents cicatrisants comme la thrombine.

Le dernier, **les sphères de polysaccharide** sont extraites de l'amidon des plantes et agissent en déshydratant le sang (Spotnitz *et al.* 2008). Son effet hydrophile permet de concentrer les composants solides du sang et de former ainsi une barrière mécanique. Cet effet va favoriser l'activité naturelle des plaquettes et accroître la coagulation des protéines du sang. Les tests réalisés sur 288 patients montrent que le processus de l'hémostase est achevé au bout de 5 minutes dans 90,3% des cas (Spotnitz *et al.* 2008). Cependant, cet hémostatique ne doit pas être injecté dans des vaisseaux sanguins à cause du risque d'embolie et de réactions secondaires.

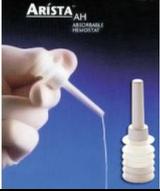
Agents mécaniques	Nom commercial	Laboratoire	Produit
Gélatine porcine (poudre)	Gelfoam® Surgifoam sponge® Surgifoam powder®	Pharmacia Johnson & Johnson Johnson & Johnson	
Collagène bovin (éponge)	Instat® Helistat & Helitene® Avitine sponge®	Johnson & Johnson Integra Bard	
Collagène bovin (poudre)	Avitine flour® Ultrafoam®	Bard Johnson & Johnson	
Cellulose oxydée régénérée	Surgicel®	Johnson & Johnson	
Sphère microporeuse polysaccharide	Arista AH®	Medafor	

Tableau 29 : Tableau récapitulatif des différents agents mécaniques commerciaux.

III.1.2.2 Les agents actifs

Dans la catégorie des agents actifs, la thrombine existe sous plusieurs formes différentes : **la thrombine bovine, la thrombine du plasma humain et la thrombine humaine recombinante** (tableau 30) (Spotnitz *et al.* 2008). Ces trois produits se présentent sous forme de liquide et peuvent être appliqués à l'aide d'une seringue, d'un spray ou d'une éponge. La thrombine, quelque soit sa forme, est une enzyme qui permet de déclencher la première phase des réactions de coagulation. Elle convertit le fibrinogène soluble en brins de fibrine insolubles. Avec son utilisation, le processus de l'hémostase s'achève en 10 minutes dans 95% des cas. Cependant, la thrombine bovine est antigénique et peut stimuler la formation d'anticorps humains luttant contre sa présence dans l'organisme. La thrombine de plasma humain présente également quelques inconvénients. Selon les donneurs, elle peut transmettre des virus et des agents de maladie comme Creutzfeldt-Jacob ou autre. De plus, son utilisation peut entraîner la création de caillots sanguins non désirés. La thrombine humaine recombinante est quant à elle une enzyme synthétisée à l'aide de techniques d'ingénierie génétique. Sa limitation concerne son prix plus élevé que la thrombine issue de sources naturelles.

Agents actifs	Nom commercial	Laboratoire	Produit
Thrombine bovine	Thrombin-JMI®	King Pharmaceuticals	
Thrombine plasma humain	Evithrom®	Johnson & Johnson	
Thrombine recombinante	Recothrom®	Zymogenetics	

Tableau 30 : Tableau récapitulatif des différents agents actifs commerciaux.

III.1.2.3 Les matrices

Dans la catégorie des matrices, deux produits différents sont utilisés en bloc opératoire (tableau 31). Le premier, **la matrice de gélatine porcine** se présente sous forme de gel et doit être combinée à de la thrombine pour former un hémostat efficace. Elle peut être utilisée dans tout type de chirurgie sauf en urologie et en ophtalmologie. Avec son utilisation, le processus de l'hémostase s'achève au bout de 10 minutes dans 96,4% des cas (Spotnitz *et al.* 2008). En revanche, cet hémostat peut causer la paralysie des tendons suite à une fibrose prolongée, provoquer des réactions secondaires et causer des syndromes de chocs toxiques.

Le second, **la matrice de gélatine bovine combinée à de la thrombine de plasma humain** se présente sous forme de gel granuleux. Elle est constituée à la fois d'agents actifs et mécaniques permettant de stopper les saignements. Le processus de l'hémostase s'achève en 10 minutes pour 96% des cas lorsque le produit est utilisé (Spotnitz *et al.* 2008). Cependant, cet hémostatique présente l'inconvénient de devoir être préparé avant d'être utilisé extemporanément. La matrice et la thrombine doivent être mélangées pendant 3 minutes pour reconstituer l'hémostat. De plus, ce produit est très sensible, il peut être inactivé par l'alcool, les iodures et les ions métalliques lourds. Enfin, il peut causer des chocs anaphylactiques, des allergies, des infections et des réactions secondaires.

Matrices	Nom commercial	Laboratoire	Produit
Matrice de gélatine porcine	Surgiflo®	Johnson & Johnson	
Thrombine de plasma humain combinée à une matrice de gélatine bovine	Floseal®	Baxter	

Tableau 31 : Tableau récapitulatif des différentes matrices commerciales.

III.1.2.4 Les enduits

Les enduits constituent la deuxième famille de produits utilisés au bloc opératoire pour stopper les saignements. Cette famille se divise en deux sous parties : la fibrine (tableau 4) et les polymères (tableau 32).

Dans la catégorie fibrine, un seul produit est actuellement utilisé : **la fibrine dérivée de plasma humain** (Spotnitz *et al.* 2008). Bien que ce produit appartienne à la famille des enduits, il est également considéré comme un hémostat. Il est constitué de deux composants : le fibrinogène de plasma humain et la thrombine conditionnés séparément. Son mode de fonctionnement est assez simple. Le fibrinogène, en présence de la thrombine, va polymériser et former un caillot de fibrine permettant de stopper les saignements. Bien que cet enduit soit énormément utilisé en bloc opératoire, il peut provoquer des embolies et des ruptures ou compressions de tissus pouvant entraîner des conséquences fatales.

Fibrine	Nom commercial	Laboratoire	Produit
Fibrine dérivée de plasma humain	Evicel®	Johnson & Johnson	

Tableau 32 : Tableau récapitulatif des différents enduits sous forme de fibrine commerciaux.

Dans la catégorie des polymères, deux produits synthétiques différents sous forme d'hydrogel sont utilisés (tableau 33). Le premier est constitué de **deux PEG combinés à du chlorure d'hydrogène et à du phosphate de sodium carbonaté**. Il est notamment utilisé comme complément à l'hémostase en fermant les zones fissurées de vaisseaux sanguins (Spotnitz *et al.* 2008). Le second est quant à lui constitué de deux solutions. La première est composée d'un **PEG ester** et la seconde contient de **l'amine trilisine**. Ces deux solutions, lorsqu'elles se combinent, forment un gel capable de fermer durablement une lésion. L'utilisation de ces enduits permet au processus de l'hémostase de s'achever en 10 minutes dans 86% des cas (Spotnitz *et al.* 2008). Cependant, le fort gonflement de ces produits lors de leur utilisation peut provoquer la compression des nerfs et peut détériorer les tissus. De plus, ces polymères peuvent provoquer des infections, des fuites de liquide cérébrospinal, des dommages rénaux et neurologiques ainsi que des inflammations.

Polymères	Nom commercial	Laboratoire	Produit
PEG combiné à du chlorure d'hydrogène et du phosphate de sodium carbonaté	Coseal®	Baxter	
PEG ester combiné à de l'amine trilisine	Duraseal®	Covidien	

Tableau 33 : Tableau récapitulatif des différents enduits sous forme de polymères commerciaux.

III.1.2.5 Les agents adhésifs

Les agents adhésifs forment la dernière famille de produits utilisés comme outils favorisant le processus de l'hémostase. Cette famille se divise en deux parties : les cyanoacrylates (tableau 34) et l'albumine bovine combinée à du glutaraldéhyde (tableau 35).

Dans la catégorie des cyanoacrylates, trois produits sont utilisés au bloc opératoire pour stopper les saignements : **le 2-octyl cyanoacrylate** et deux formes du **n-butyl-2-cyanoacrylate** (Spotnitz *et al.* 2008). Ils se présentent sous forme de gel et sont tous utilisés comme complément de la suture chirurgicale de lésions cutanées. Ces adhésifs polymérisent en 30 secondes en présence des groupements hydroxyles présents dans la zone lésée et les deux premiers polymères jouent également le rôle de barrière empêchant la pénétration de bactéries à l'intérieur de la plaie. Ils sont également utilisés dans le cas de sutures dermales profondes pour favoriser la reconstruction des tissus. En revanche, ces produits ne peuvent pas être utilisés pour des lésions internes.

Cyanoacrylates	Nom commercial	Laboratoire	Produit
2-octyl cyanoacrylate	Dermabond®	Johnson & Johnson	
n-butyl-2-cyanoacrylate	Indermil®	Covidien	
n-butyl-2-cyanoacrylate	Histoacryl & Histoacryl blue®	Tissueeal	

Tableau 34 : Tableau récapitulatif des différents agents adhésifs cyanoacrylates commerciaux.

L'albumine bovine combinée au glutaraldéhyde est un autre agent adhésif, différent des cyanoacrylates, utilisé au bloc opératoire pour stopper les saignements (Spotnitz *et al.* 2008). Il se présente sous forme d'un gel. Ce produit est un adhésif fort utilisé pour achever l'hémostase dans le cas de sutures de gros vaisseaux sanguins. Son mode de fonctionnement repose sur la réaction entre les groupements aldéhydes du glutaraldéhyde et les groupements amines en surface des tissus qui aboutit à la formation de liaisons fortes. Le produit polymérise en 20 secondes et atteint sa solidité et sa résistance maximale en 2 minutes. Cependant, cet adhésif peut causer la nécrose de certains tissus, l'irritation de la peau, des yeux, du nez et de la gorge, la transmission de maladies et la formation de pseudo anévrisme*.

*pseudo anévrisme : dilatation de la paroi d'une artère, formant une poche communicant avec le flux sanguin. Le sang contenu dans cette poche peut former des caillots responsables d'embolies artérielles (voir thromboembolie) et d'infarctus.

Albumine	Nom commercial	Laboratoire	Produit
Albumine bovine et glutaraldéhyde	Bioglue®	Cryolife	

Tableau 35 : Tableau récapitulatif des différents agents adhésifs à base d'albumine bovine combinée à du glutaraldéhyde commerciaux

III.1.3 Les agents cicatrisants commerciaux

(Shakespeare. 2001, Dhennin. 2002, Rico *et al.* 2002, Vidal *et al.* 2006, Lallement *et al.* 2007)

De nombreux agents cicatrisants sont actuellement commercialisés et utilisés en milieu hospitalier. Ces agents se classent en différentes familles thérapeutiques (tableau 36).

Les pansements antibactériens constituent la première famille d'agents cicatrisants. Ils se présentent sous forme de crème ou de pansements imprégnés et contiennent des antibiotiques ainsi que des dérivés d'argent (sels ou ions). Une application quotidienne permet un effet analgésique tout en limitant les infections locales.

Les hydro colloïdes sont quant à eux composés d'une couche absorbante de CarboxyMéthyl Cellulose (CMC). Ils permettent de maintenir un milieu chaud et humide favorisant tous les stades de la cicatrisation. Ils se présentent sous la forme d'un dispositif autocollant présentant une grande facilité d'emploi mais perd toute adhésion sous l'effet des exsudats pouvant être sécrétés par la plaie. Les hydro cellulaires sont des dérivés du polyuréthane présentant des propriétés très absorbantes et non adhérentes au contact de la plaie. Malgré un coût élevé, les hydro cellulaires permettent une cicatrisation accélérée des plaies. Les hydrogels sont des dérivés de CMC en phase aqueuse sous forme de gel. Ils favorisent la cicatrisation en créant un milieu humide par libération de grandes quantités d'eau dans la plaie. L'application d'hydrogels sur une plaie nécessite un recouvrement par un pansement secondaire évitant le dessèchement du gel. Les hydro fibres sont une forme particulière des hydro colloïdes puisqu'elles sont non tissées. Elles présentent des pouvoirs absorbant et anti bactérien remarquables.

Les alginates sont des polymères d'origine végétale possédant un fort pouvoir absorbant et hémostatique. Ils se présentent sous différentes formes telles que les compresses, les pansements et les hydrogels et peuvent être utilisés pour toutes les phases de la cicatrisation.

Les charbons, également d'origine naturelle, sous forme de compresse imprégnée, présentent l'avantage d'absorber et drainer les germes et les exsudats produits par la plaie. L'élimination des contaminants permet de favoriser la cicatrisation.

Les tulles et interfaces se présentent sous forme de maillage imprégné de corps gras et associé à des produits actifs (corticoïde, antibiotique, antiseptique). Un milieu gras associé à un principe actif favorise le processus de cicatrisation.

Les films en polyuréthane semi perméable favorisent la cicatrisation en protégeant la plaie et en la laissant respirer. Malgré leur faible coût et leur facilité d'emploi, ils favorisent les infections.

Enfin, **les collagènes** constituent la dernière famille d'agents cicatrisants. Formulés le plus souvent en gel, ils présentent une action cicatrisante et anti inflammatoire locale mais nécessitent un traitement de longue durée pour être efficace.

Famille thérapeutique	Nom commercial	Laboratoire	Produit
Crème	Flammazine® Flammacérium® Sicazine® Ialuset plus crème®	Solvay Pharma Solvay Pharma Smith Nephew Genévrier	
Pansement imprégné	Acticoat® Altreet® Flammacérium® Ialuset plus compresses® Aquacel Ag®	Smith Nephew Coloplast Solvay Pharma Genévrier Conva Tec	
Hydrocolloïde	Algoplaque® Urgomed® Comfeel Plus®	Urgo Urgo Coloplast	
Hydrocellulaire	Allevyn adhesive® Mepilex border® Tielle adhésif®	Smith Nephew Molnlycke Health Care Johnson Johnson	
Hydrogel	Urgo hydrogel® Nu Gel® Intrasite conformable®	Urgo Johnson Johnson Smith Nephew	
Hydrofibre	Aquacel® Aquacel Ag®	Conva Tec Conva Tec	
Alginate	Urgo Sorb® Algostéril® Comfeel seasorb® Release Ag®	Urgo Brothier Coloplast Johnson Johnson	
Charbon	Actisorb Ag plus® Carbonet®	Johnson Johnson Smith Nephew	
Tulle	Jelonet® Tulle gras solvay® Corticotulle®	Smith Nephew Solvay pharma Lumière	

Interface	Adaptic® Urgo Tul® Mepitel® Cuticerin® Ialuset acide hyaluronique®	Johnson Johnson Urgo Molnlycke Health Care Smith Nephew Genévrier	
Film	Opsite flexigrid® Omiderm®	Smith Nephew ITG Medev	
Collagène	Dermatix® Mepiform® Cica care®	Valeant Molnlycke Health Care Smith Nephew	

Tableau 36 : Tableau récapitulatif des différents agents cicatrisants commerciaux.

III.1.4 La médecine régénérative

III.1.4.1 Les réseaux de matrice extracellulaire (MEC)

La médecine régénérative et l'ingénierie tissulaire ont pour but d'élaborer des substituts biologiques permettant la reconstruction des tissus endommagés et le développement de nouveaux tissus sains (Zhang *et al.* 2009). Actuellement, les principaux agents utilisés pour la régénération tissulaire sont constitués de protéines provenant de la matrice extracellulaire (MEC). Ils se présentent sous forme d'un réseau de nanofibres pouvant provenir de nombreux tissus et notamment des valves cardiaques, des vaisseaux sanguins, de peau, des nerfs, des tendons, des ligaments, du foie, de vessie, du petit intestin ou bien encore des muscles (Badylak *et al.* 2009). Une trentaine de produits constitués de protéines provenant de la matrice extracellulaire sont actuellement commercialisés et utilisés au bloc opératoire (tableau 37).

Nom	Laboratoire	Composition	Forme
AlloDerm®	Lifecell	Peau humaine	Feuille sèche
AlloPatch®	Musculoskeletal Transplant Foundation	Muscle humain	Feuille sèche
Axis dermis®	Mentor	Derme humain	Feuille sèche
Bard Dermal	Bard	Derme humain cadavérique	Feuille sèche
CuffPatch®	Arthrotek	Muqueuse petit intestin porcine	Feuille hydratée
DurADAPT®	Pegasus Biologicals	Péricarde équin	Feuille sèche
Dura-Guard®	Synovis Surgical	Péricarde bovin	Feuille hydratée
Durasis®	Cook SIS	Muqueuse petit intestin porcine	Feuille sèche
Durepair®	TEI Biosciences	Peau bovin foetal	Feuille sèche
FasLata®	Bard	Muscle humain cadavérique	Feuille sèche
Graft Jacket®	Wright Medical Tech	Peau humaine	Feuille sèche
Oasis®	Healthpoint	Muqueuse petit intestin porcine	Feuille sèche
OrthADAPT®	Pegasus Biologicals	Péricarde équin	Feuille sèche
Pelvicol®	Bard	Derme porcine	Feuille hydratée
Peri-Guard®	Synovis Surgical	Péricarde bovin	Feuille sèche
Permacol®	Tissue Science Laboratories	Peau de porc	Feuille hydratée
PriMatrix®	TEI Biosciences	Peau bovin foetal	Feuille sèche
Restore®	DePuy	Muqueuse petit intestin porcine	Feuille sèche
Stratasis®	Cook SIS	Muqueuse petit intestin porcine	Feuille sèche
SurgiMend®	TEI Biosciences	Peau bovin foetal	Feuille sèche
Surgisis®	Cook SIS	Muqueuse petit intestin porcine	Feuille sèche
Suspend®	Mentor	Muscle humain	Feuille sèche
Tissue Mend®	TEI Biosciences	Peau bovin foetal	Feuille sèche
Vascu-Guard®	Synovis Surgical	Péricarde bovin	Feuille sèche
Veritas®	Synovis Surgical	Péricarde bovin	Feuille hydratée
Xelma®	Molnlycke	Protéine matrice extra cellulaire	Gel
Xenform®	TEI Biosciences	Peau bovin foetal	Feuille sèche
Zimmer Collagen Patch®	Tissue Science Laboratories	Derme porcine	Feuille hydratée

Tableau 37 : Tableau récapitulatif des différents produits commerciaux constitués de matrice extracellulaire et utilisés pour la médecine régénérative.

Les réseaux d'ECM sont constitués de molécules structurales et fonctionnelles sécrétées par les cellules de tissus ou d'organes. Ces molécules s'agencent en une structure 3D complexe et unique présentant des propriétés structurales et biologiques proches du tissu source (Brown *et al.* 2010) (figure 118).

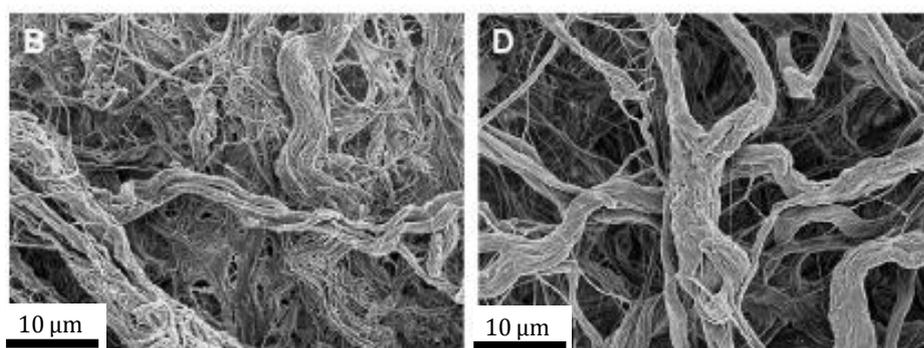


Figure 118 : Images MEB de matrices extracellulaires de vessie de porc réticulée (B) avec du carbodiimide et (D) avec du glutaraldéhyde d'après (Brown *et al.* 2010).

Ces réseaux sont constitués majoritairement de fibres de collagène présentant une architecture et un comportement biomécanique variables en fonction du type de collagène. Par exemple, les fibres de collagène provenant d'un ligament ou d'un tendon sont fortement alignées

ce qui augmente considérablement leur résistance. Sur les 28 espèces de collagène existantes dans l'organisme humain, 18 d'entre elles constituent la matrice extracellulaire (annexe 11). Ces différents collagènes forment une structure dynamique qui interagit avec les cellules et joue un rôle clé dans de nombreux processus cellulaires tels que l'adhésion, la migration, la croissance et la différenciation (Jarvelainen *et al.* 2009).

La régénération de tissus utilisant des protéines de la MEC se déroule en plusieurs étapes (figure 119). Tout d'abord, le tissu source subit une étape de décellularisation et de stérilisation. Le but est d'éliminer les antigènes et les cellules qui pourraient entraîner des réponses immunitaires non désirées et ne conserver que la matrice extracellulaire. Une fois extraite, la matrice est souvent réticulée par des agents chimiques pour consolider sa structure et retarder sa dégradation. Elle est ensuite implantée chirurgicalement dans le tissu ou l'organe lésé. Le processus de remodelage *in vivo* est alors amorcé par l'action des fibres de collagène formant un réseau d'ECM et favorisant la migration et l'infiltration cellulaires. En moyenne une feuille d'ECM de 100 µm d'épaisseur a besoin de 8 semaines pour reconstruire entièrement le tissu sur lequel elle a été implantée (Badylak *et al.* 2010).

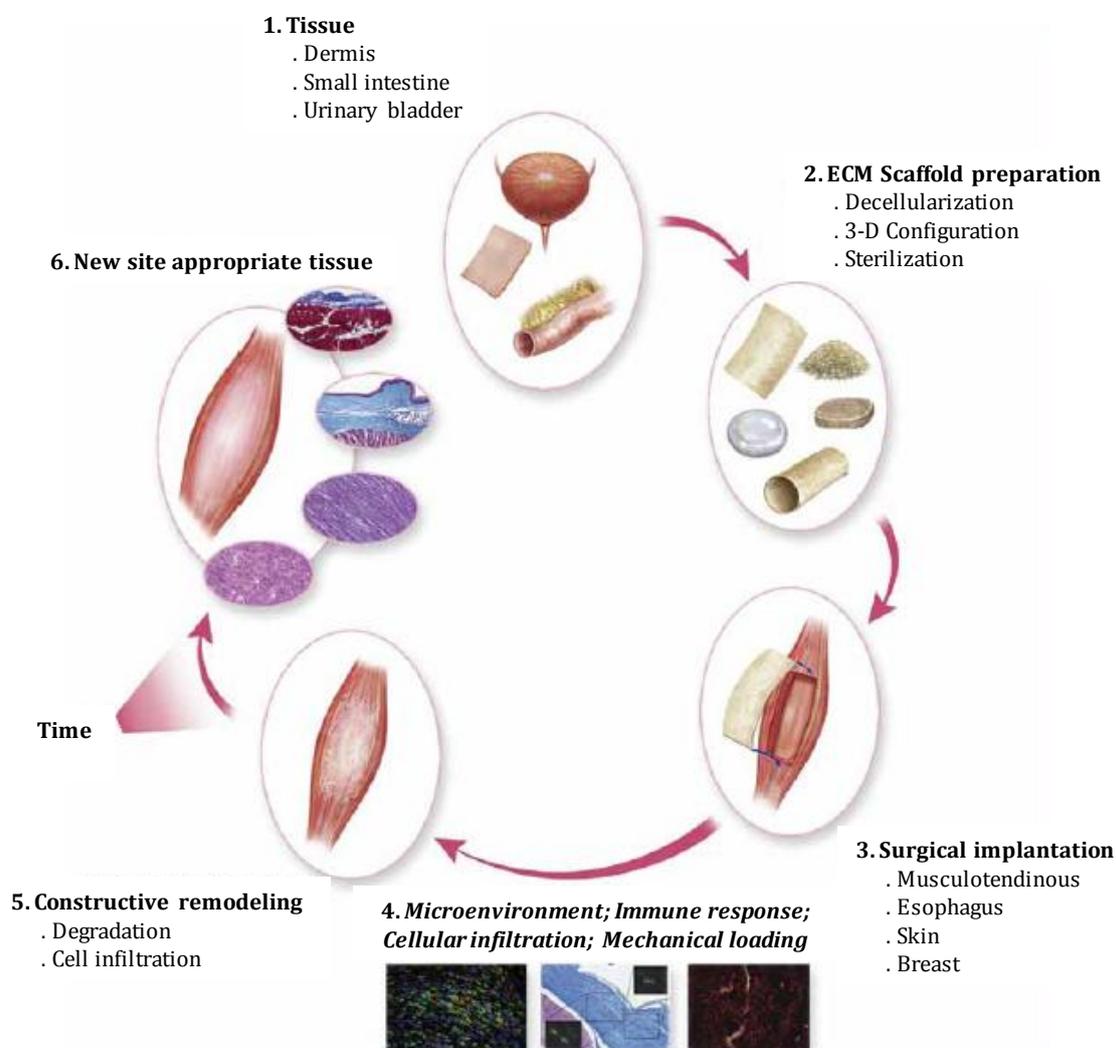


Figure 119 : Schéma des différentes étapes de préparation et de fonctionnement des MEC d'après (Badylak *et al.* 2010).

III.1.4.2 Les réseaux de polymères : cas particulier de la régénération osseuse

Les réseaux de polymères sont également utilisés pour la reconstruction tissulaire et la médecine régénérative. Cette structure à base de fibres permet l'auto-régénération des tissus tout en limitant les risques de rejet et de transmission de maladies fortement présents lors d'une greffe d'un tissu prélevé sur une partie saine du corps. Le réseau de polymère doit agir comme une matrice extracellulaire en présentant un design particulier permettant l'attachement, la croissance et la différenciation cellulaire. De plus, il doit présenter la particularité d'être poreux pour permettre la croissance des tissus. La nature du polymère constituant le réseau a également de l'importance. Il doit être biocompatible et résistant. Pour être plus efficaces, ces réseaux de nanofibres sont souvent « dopés » avec des matériaux en céramique comme les céramiques de phosphate de calcium ou l'hydroxyapatite (HA) présentant la particularité d'être très proches des minéraux osseux en augmentant la biocompatibilité ainsi que l'ostéoconductivité de la structure de nanofibres. (Smith *et al.* 2009). Généralement, ces réseaux sont constitués de nanofibres de poly(acide lactique-co-glycolique) (PLGA), de poly(L-acide lactique) (PLLA), de poly(caprolactone) (PCL) (Engelhardt *et al.* 2011), de poly(oxyde d'éthylène) (PEO), de poly(vinyl d'alcool) (PVA) (Hartwell *et al.* 2011), de poly(ester uréthane) uréa (PEUU) (Hong *et al.* 2011), de gélatine (Matsui *et al.* 2012), de collagène (Zhang *et al.* 2008, Shi *et al.* 2011), de protéines (Romano *et al.* 2011) ou de fibrinogène (figure 120).

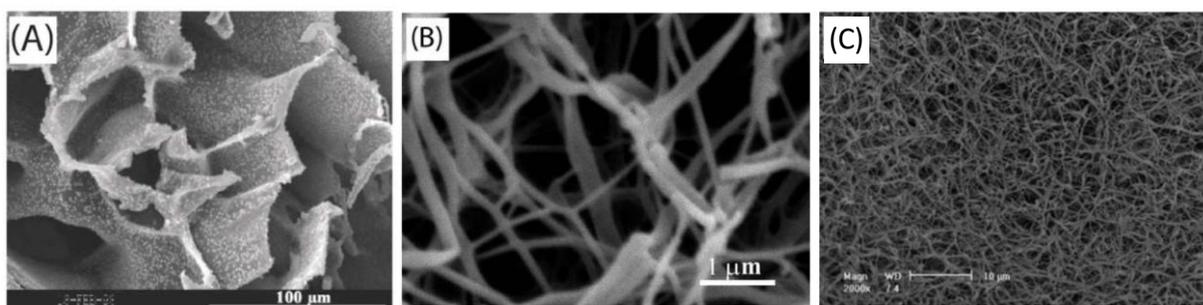


Figure 120 : Photos MEB de matrices de nanofibres de (A) PDLAA, (B) PLLA et (C) PLGA d'après (Smith *et al.* 2009)

III.1.5 Les nouveaux produits à base de nanofibres pour la nanomédecine

De nombreux produits utilisés pour l'hémostase, la cicatrisation et la médecine régénérative sont actuellement commercialisés. Cependant, ces produits présentent encore de forts inconvénients et leur utilisation montrent de nombreuses limites. La solution pour obtenir un agent idéal se trouve peut être à l'échelle nanométrique...

III.1.5.1 Une nouvelle classe d'agents hémostatiques : les nanohémostats

Nanohémostat-1 (NHS-1) est un nouvel agent permettant de stopper les saignements en moins de 15 secondes. Il est constitué d'une chaîne de 4 acides aminés, arginine-alanine-aspartate-alanine, répétée 4 fois présentant la particularité de s'auto-assembler à l'échelle nanométrique, sous l'effet des forces ioniques et de Van Der Waals, pour former une nouvelle structure (Ellis-Behnke *et al.* 2006, Ellis-Behnke. 2011). Cette structure forme un réseau de nanofibres semblable à la matrice extracellulaire native et apporte un environnement *in vivo* pour le contrôle de la croissance, de la migration et de la différenciation cellulaire (figure 121).

La structure ne comporte aucun contaminant chimique ou biologique, contrairement aux hémostatés dérivés des protéines animales, et est immunologiquement inerte ce qui permet d'éviter lors de son utilisation les anaphylaxies* et les rejets.

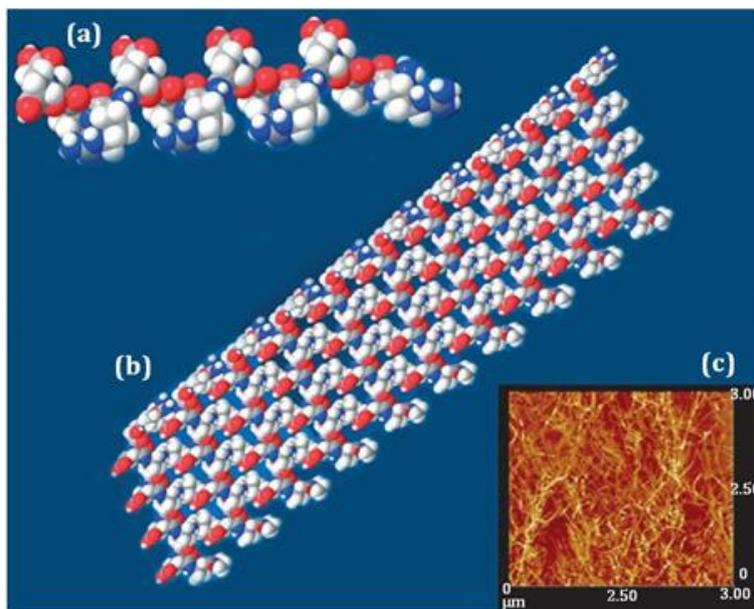


Figure 121 : Modélisation moléculaire (a) des NHS-1 et (b) de l'auto assemblage des NHS-1 sous forme de fibres. (c) Image AFM du nanohémostat d'après (Ellis-Behnke *et al.* 2006).

Le fort pouvoir hémostatique de ce nouvel agent a été mis en évidence par plusieurs tests *in vivo* (Ellis-Behnke *et al.* 2006, Ellis-Behnke. 2011). Pour cela, le temps de coagulation en présence du NHS-1 a été mesuré dans le cas de lésions sévères sur des organes (cerveau, moelle osseuse, foie et artère fémorale). Dans le cas de l'étude réalisée sur le foie, le lobe gauche a été incisé en profondeur. Le premier groupe de rats a été traité avec 100 μ L d'une solution de nanohémostat-1 à 1% massique ce qui a permis une hémostase en 8,6 secondes. Le groupe non traité a quant à lui saigné pendant plus de 5 minutes (figure 122).

*anaphylaxie : réaction allergique sévère et rapide de tout l'organisme pouvant être mortelle.

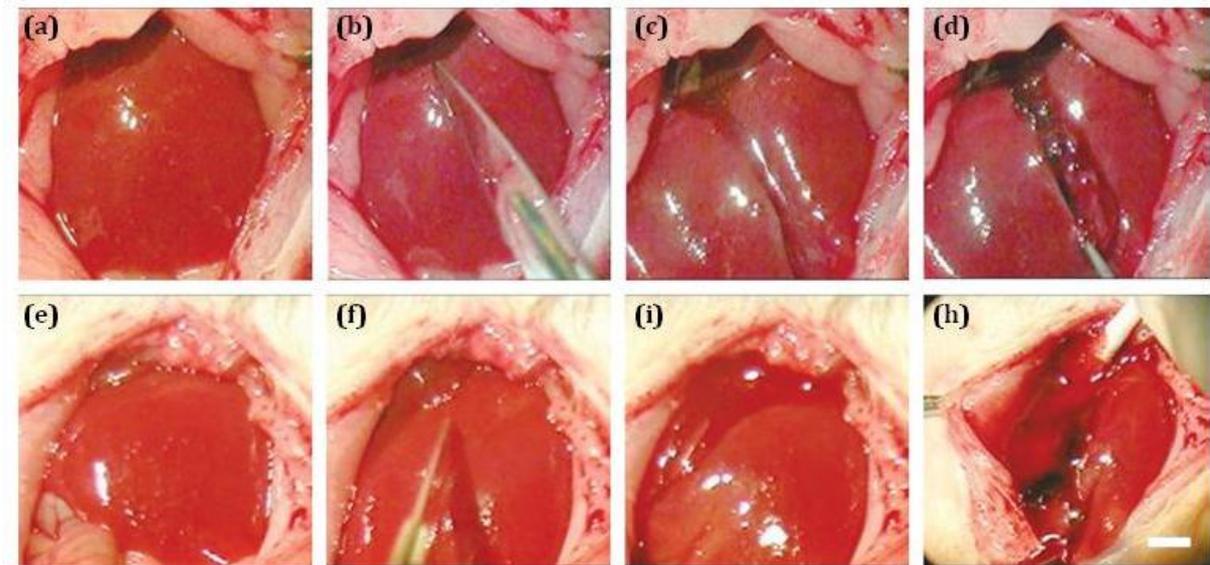


Figure 122 : Images des tests réalisés sur le foie de rats. (a à d) Foie traité par le nanohémostat après création d'une plaie. (e à h) Foie témoin non traité. (a et e) La peau couvrant la cavité intrapéritonéale est ouverte et le foie est exposé. (b et f) Une incision est réalisée sur le lobe gauche du foie. (c et i) La plaie saigne fortement. (d) Une solution de NHS-1 est appliquée sur la plaie. Le processus de l'hémostase s'achève en 8,6 secondes. (h) Pour le contrôle, une solution saline est appliquée sur la plaie. Les saignements ont duré plus de 5 minutes et pour les ralentir et rendre la zone visible, une compresse a dû être utilisée d'après (Ellis-Behnke *et al.* 2006).

Les NHS-1 peuvent stopper une hémorragie en moins de 10 secondes sur des petits animaux. En plus d'être biocompatibles, ils sont faciles à utiliser par injection ou en spray puisqu'ils se présentent d'abord sous une forme liquide puis ils gélifient au contact de la plaie. Enfin, ils ne causent aucun dommage sur les tissus, ni aucune réaction secondaire. Des tests cliniques vont aussi être réalisés prochainement avant de pouvoir valider l'utilisation de ce produit chez l'Homme.

III.1.5.2 Les hydrogels de monomères

Ce nouvel agent, en plus de jouer le rôle de matrice, va également améliorer l'architecture et les propriétés mécaniques de l'élément biologique avec lequel il sera mis en contact (Ayala *et al.* 2011). Sa nature, sa composition et ses propriétés sont donc des paramètres très importants. L'acrylamide est le polymère le plus fréquemment utilisé pour constituer cet hydrogel. La matrice synthétique est créée par copolymérisation de l'acrylamide (Am), permettant la formation de l'hydrogel, et de l'acide 6-aminocaproïque, un monomère acryloyle amino acide (AA) (figure 123). Pour pouvoir contrôler l'hydrophobicité du gel, le nombre de répétition du groupement CH_2 varie de 1 à 10. Plus le groupement CH_2 est répété plus le produit est hydrophobe. Cette variation de la longueur de la chaîne sans modifier le ratio molaire de l'acrylamide et du monomère, permet un contrôle du niveau d'hydrophobicité sans altérer les groupements fonctionnels, la densité de charge, la rugosité de la surface et les propriétés mécaniques.

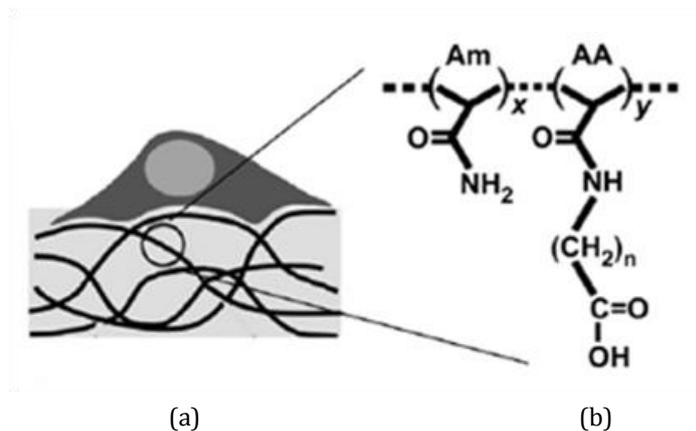


Figure 123 : (a) Schéma de la matrice formée par l'hydrogel de monomères. (b) Structure chimique de la combinaison de l'acrylamide et du monomère d'après (Ayala *et al.* 2011).

Des tests *in vitro* ont montré que le réseau d'acrylamide permet la prolifération, la migration et l'adhésion cellulaire. Ces observations sont également vraies au niveau moléculaire puisque les cytosquelettes d'actine s'agencent au bout de 14 jours dans une organisation unidirectionnelle et parallèle caractéristique (figure 124).

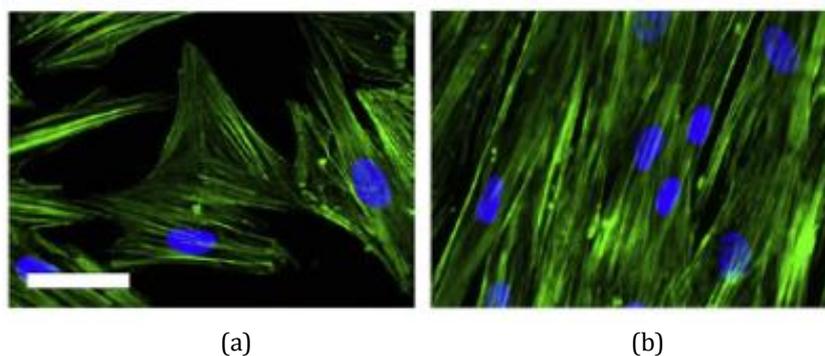


Figure 124 : Images par coloration immunofluorescente de l'actine illustrant l'organisation des cellules hMSCs sur l'hydrogel au bout de (a) 4 jours et (b) 14 jours d'après (Ayala *et al.* 2011).

III.1.5.3 Les biopolymères de chitosan

Ce nouvel agent hémostatique réversible est un biopolymère amphiphile. Le polymère d'origine, le chitosan, dérivé de l'exosquelette des crustacés, présente des propriétés anti bactériennes remarquables. Un faible nombre de queues hydrophobes (benzène-n-octadecyl) ont été greffées sur la surface du chitosan pour créer un chitosan modifié hydrophobiquement : le hm-chitosan. Le mécanisme d'action hémostatique du hm-chitosan repose sur l'ancrage des queues hydrophobes du polymère dans la membrane des cellules sanguines (Dowling *et al.* 2011). Ainsi, les cellules sont connectées par l'intermédiaire des chaînes de biopolymère et forment un réseau en gel pouvant stopper le flux sanguin (figure 125).

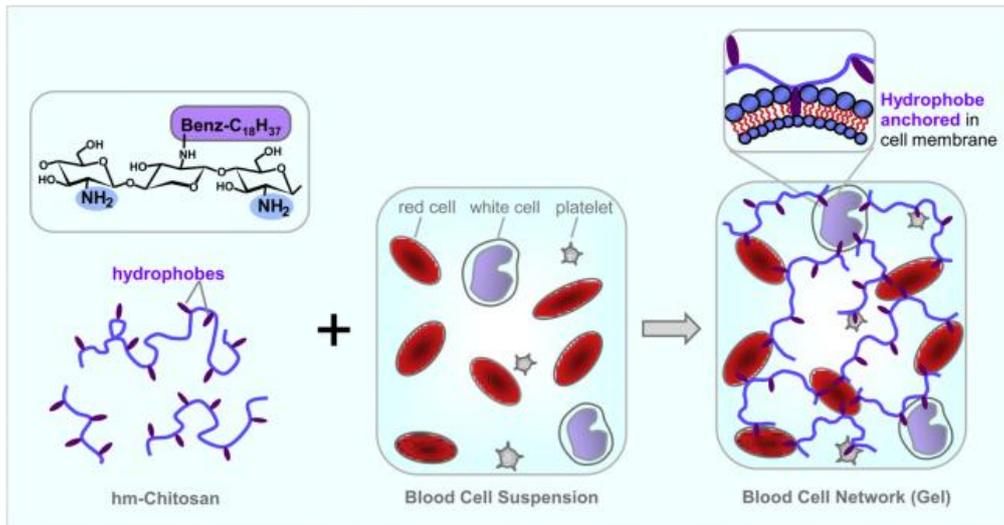


Figure 125 : Schéma illustrant le mécanisme de gélification du sang en contact du hm-chitosan. Le polymère se compose d'un squelette hydrophile en bleu et de queues de benzyloctadecyl hydrophobes en violet. L'assemblage du sang et du polymère forme un réseau en gel d'après (Dowling *et al.* 2011).

Pour inverser ce phénomène et dissocier sur demande le réseau formé, il suffit d'ajouter une supramolécule amphiphile, l' α -cyclodextrin (α -CD) qui va désassembler le gel de hm-chitosan et les cellules sanguines. En effet, la gélification découle de l'affinité hydrophobe des queues greffées en surface du polymère et des queues acyles des lipides des bicouches cellulaires. Pour annuler cette réaction, il suffit alors d'introduire une molécule qui va se lier préférentiellement au polymère hydrophobe et l'obliger ainsi à se dégager de la cellule. Ce rôle est joué par l' α -cyclodextrin qui va instantanément convertir le gel en liquide.

Pour évaluer le pouvoir hémostatique du biopolymère, l'artère fémorale d'un cochon a été complètement sectionnée. Cette blessure, si elle n'est pas traitée rapidement est fatale en moins de 15 minutes. Des bandages de hm-chitosan ont été déposés sur la plaie et après 2 minutes de compression, l'hémorragie a été totalement stoppée (figure 126) (Dowling *et al.* 2011). Tous les cochons ont survécu à l'opération.

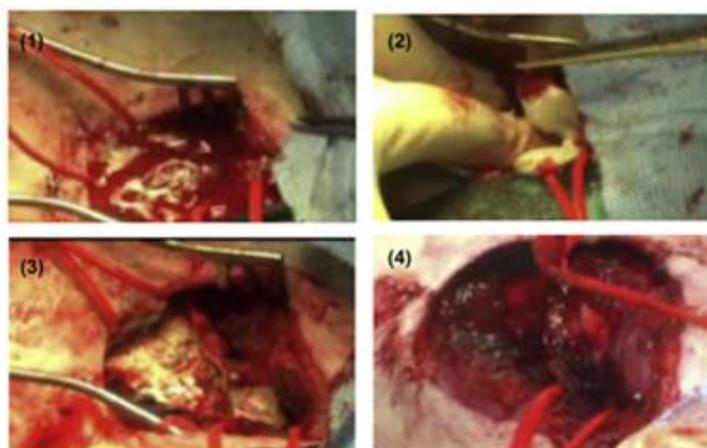


Figure 126 : Image du test réalisé sur l'artère fémorale du cochon. (1) L'artère fémorale est sectionnée et saigne abondamment. (2) Un bandage de hm-chitosan est directement appliqué sur la plaie puis une compression est réalisée. (3) Suite à la compression, le bandage de polymère est attaché sur la plaie. (4) 2 minutes après l'application, le bandage est retiré. L'hémorragie a totalement été stoppée d'après (Dowling *et al.* 2011).

Le hm-chitosan est un agent hémostatique efficace qui peut stopper les fortes hémorragies sur des gros modèles d'animaux. Son pouvoir réversible n'est pour le moment que théorique, des tests devront être réalisés pour confirmer ou non cette propriété particulière lors d'applications *in vivo*. Sa formulation en solution liquide ou en bandage en fait un excellent agent hémostatique pour des plaies internes et externes. Les hydrogels de chitosan sont également utilisés pour la cicatrisation (Jayakumar *et al.* 2011), la libération ciblée de principes actifs (Bhattarai *et al.* 2010), la chirurgie gastrique (Park *et al.* 2006) et la reconstruction tissulaire (Berger *et al.* 2004).

III.1.5.4 Les gels de plaquettes

Les gels de plaquettes sont un nouvel agent permettant une régénération endogène. Ils s'obtiennent en mélangeant du plasma riche en plaquettes (PRP) avec un milieu de culture contenant une forte concentration de calcium libre permettant d'amorcer la gélification en moins de 30 secondes. Ces gels se présentent sous la forme d'une matrice fibreuse possédant des pores interconnectés permettant la pénétration cellulaire (figure 127) (Cheng *et al.* 2012, Shin *et al.* 2012).

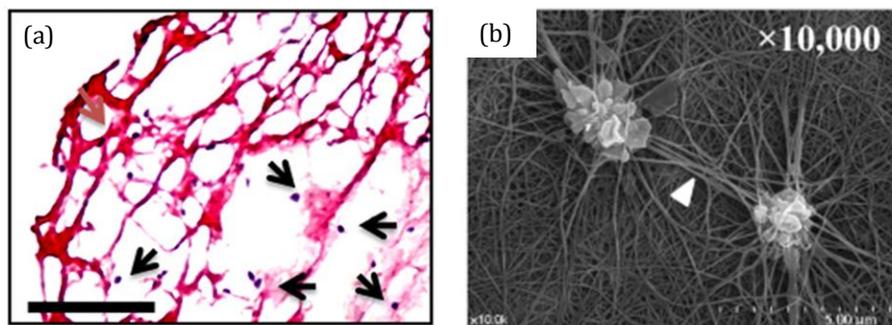


Figure 127 : (a) Image de microscopie à épifluorescence d'un gel de plaquettes. (b) Image MEB d'un gel de plaquettes d'après (Cheng *et al.* 2012).

Lorsque le gel de PRP est appliqué sur site, les cytokines et les nombreux facteurs de croissance tels que PDGF-BB (Platelet Derived Growth Factor) et TGF β (Transforming Growth Factor), contenus dans les plaquettes, sont libérés et vont favoriser notamment la prolifération cellulaire (monocytes et fibroblastes), l'angiogénèse et la régénération tissulaire (Carter *et al.* 2011). L'effet vasoconstricteur et angiogénique de ces facteurs de croissance va permettre *in fine* d'accélérer la cicatrisation des plaies. De plus, les propriétés anti-bactériennes et anti-inflammatoires des gels de plaquettes permettent de favoriser le processus de cicatrisation de plaies chroniques sévères comme les ulcères du diabétique et les sclérodermies (figure 128) (Giuggioli *et al.* 2011).



Figure 128 : (a) Ulcère de la jambe d'un patient atteint de sclérodermie. (b) Ulcère après la première application de gel de plaquettes, (c) après 6 semaines, (d) après 8 semaines et (e) après 10 semaines d'après (Giuggioli *et al.* 2011).

Les gels de plaquettes sont utilisés en tant qu'agent hémostatique mais également pour l'ingénierie et la régénération tissulaire dans le cas d'infarctus du myocarde (Cheng *et al.* 2012) et de chirurgie reconstructive (Napolitano *et al.* 2012).

III.1.5.5 Les protéines recombinantes

L'avènement des technologies issues de l'ADN recombinants ces cinquante dernières années a révolutionné la prise en charge thérapeutique de maladies jusqu'à ici sans traitement. Elles ont permis la synthèse et la production de protéines dites recombinantes.

La production de « protéine recombinante » consiste à forcer un organisme vivant (bactérie, levure, insecte, plantes, animaux supérieurs) ou une cellule issu d'un organisme à produire une protéine en y introduisant un gène d'intérêt et en le recombinant avec le génome de l'organisme hôte. Une fois recombiné, le gène introduit se comporte comme un gène de cet hôte. C'est-à-dire que l'ADN est transcrit en ARN, lui-même traduit en protéine. Cette protéine synthétisée par la cellule est alors dite « recombinante ». Les protéines recombinantes peuvent être des médicaments ou des protéines d'intérêt industriel.

Une avancée majeure de ces dernières années concerne la capacité à créer, synthétiser et produire de nouvelles structures protéiques dérivées de structures existantes. Cette ingénierie permet de disposer de protéines possédant des propriétés supérieures et des applications plus ciblées : ce sont des protéines de deuxième génération.

La formulation de ces protéines thérapeutiques nouvelles reste actuellement un enjeu considérable, notamment pour leur application en médecine régénérative. L'essor de la société française ADOCIA et de sa plateforme technologique de pointe BioChaperone®, spécialisée dans la délivrance de ce type de protéines, en est la preuve. A noter que depuis 1997, Regranex®, un hydrogel contenant comme principe actif des facteurs de croissance PDGF-BB recombinants

(0,01%), est commercialisé aux Etats-Unis et en Europe par la société Health Point Biotherapeutics. Il s'agit de la première protéine recombinante utilisée en médecine régénérative. Il est préconisé pour stimuler la croissance des tissus de granulation et favoriser la guérison des ulcères neuropathiques du diabétique. Cependant, Regranex® a été retiré du marché depuis juin 2011 suite à une mortalité accrue par cancer des patients ayant été traités par ce gel. Ce taux de mortalité est induit par une formulation inadaptée des facteurs de croissance.

III.2 Les propriétés particulières du collagène-like produit par NVH Medicinal

Le collagène est une protéine naturelle présente en abondance dans le monde du vivant. Cependant, il est possible de modifier la structure du collagène naturel pour produire une nouvelle structure présentant une séquence peptidique imposée. Les collagènes modifiés sont alors nommés « collagène-like » (Ramshaw *et al.* 2009). L'assemblage par ingénierie de motifs peptidiques d'intérêt conduit à la synthèse du collagène-like par des organismes génétiquement modifiés tels que les bactéries et les cellules eucaryotes (figure 129) (Werkmeister *et al.* 2012). Cette approche est celle retenue par NVH Medicinal et qui a fait l'objet de dépôts de brevet par cette société.

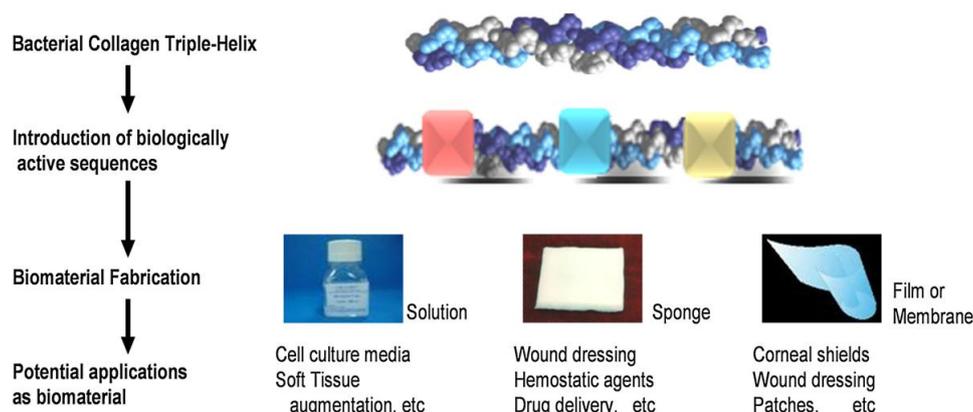


Figure 129 : Schéma illustrant le concept d'un collagène multi-fonctionnel recombinant d'après (Werkmeister *et al.* 2012).

III.3 Tests biologiques *in vitro* des nanorubans nus et fonctionnalisés

Pour commercialiser le nouveau nanobiohybride dans le domaine biomédical, il est indispensable d'évaluer la toxicité des différents éléments le composant. De plus, dans le cas d'une utilisation en tant qu'agent hémostatique, il est nécessaire de prouver le pouvoir du nanobiohybride sur la fonction plaquettaire. Dans cette optique, des tests de toxicité MTT et des tests d'agrégation plaquettaires ont été réalisés.

III.3.1 Etude bibliographique concernant la toxicité des nanoparticules d'oxydes de titane

D'une manière générale, les nanoparticules, quel que soit leur mode de pénétration à l'intérieur de l'organisme (inhalation, ingestion, contact avec la peau et injection dans le système sanguin), ont tendance à s'accumuler dans trois organes majeurs: les poumons, le foie et le cerveau. L'interaction de ces nanoparticules avec les cellules, par l'intermédiaire de différents mécanismes et de cibles intracellulaires variables, engendre des dommages considérables conduisant le plus souvent à l'apoptose des cellules concernées (figure 130) (Hussain *et al.* 2005, Elsaesser *et al.* 2012).

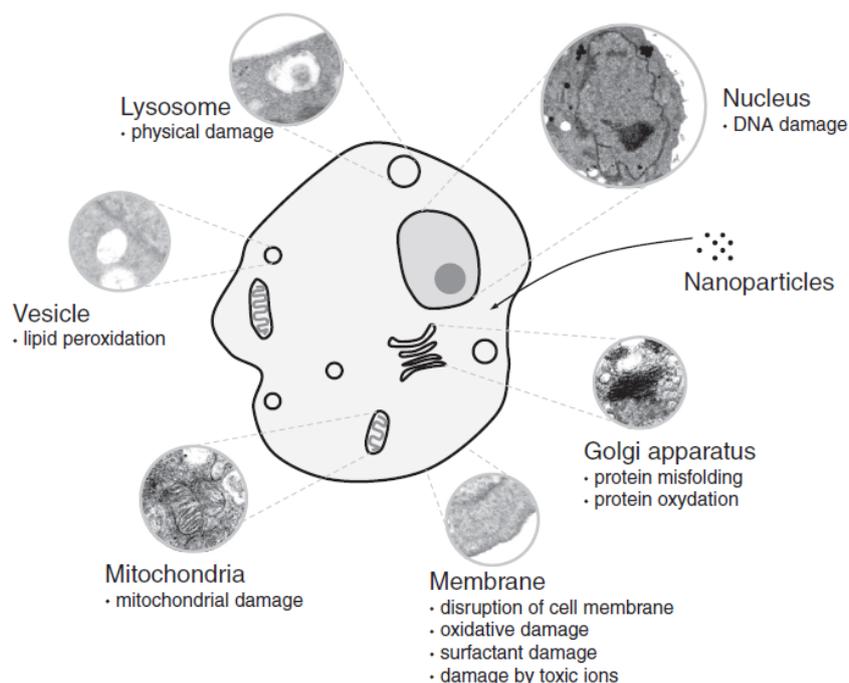


Figure 130 : Schéma des différentes interactions entre les nanoparticules et les cellules : cibles intracellulaires et mécanismes nanotoxicologiques d'après (Elsaesser *et al.* 2012).

Les nanoparticules de TiO_2 , permettant la synthèse des nanorubans de titanates, présentent une toxicité non négligeable (Pan *et al.* 2009). Après 6 jours d'incubation en présence de fibroblastes, l'introduction d'une solution de TiO_2 rutile (taille de grain de 200 ± 13 nm) de concentration $0,4$ et $0,8$ mg.mL^{-1} entraîne une modification de la morphologie. De plus, la présence des nanoparticules affecte la fonction cellulaire et provoque une diminution de la prolifération, de la mobilité et de la faculté à contracter le collagène (Pan *et al.* 2009). Une solution de TiO_2 anatase (taille de grain de 20 ± 3 nm) de concentration plus faible et avec un temps d'incubation moins long entraîne des dommages plus importants que les particules de TiO_2 rutile. Les fibroblastes, incubés pendant 3 jours avec une solution de TiO_2 anatase à $0,3$ mg.mL^{-1} présentent une rupture de leurs fibres d'actine ainsi que de la membrane cellulaire. La modification du cytosquelette d'actine stoppe la prolifération cellulaire et conduit à l'apoptose (Pan *et al.* 2009). De plus, la présence des nanoparticules provoque la formation d'énormes trous dans le cytoplasme cellulaire (figure 131).

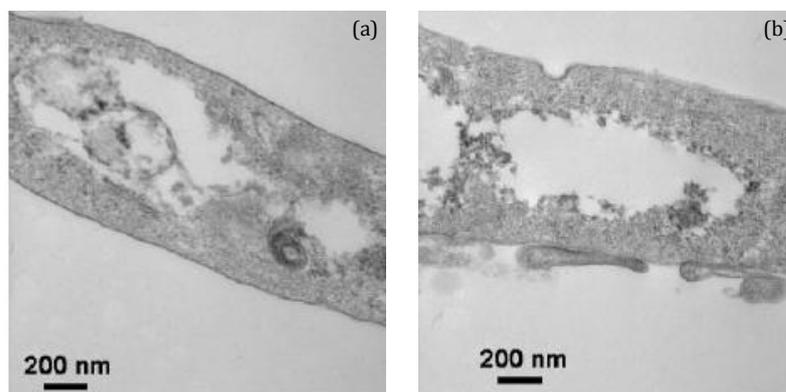


Figure 131 : (a et b) Images MET des cellules incubées pendant 2 jours avec $0,4 \text{ mg.mL}^{-1}$ de nanoparticules de TiO_2 anatase et présentant d'énormes trous induits par la présence des nanoparticules d'après (Pan *et al.* 2009).

Le P25, présentant une taille de grains de 21 nm, affecte quant à lui le comportement et les propriétés des tissus cardiaques. En effet, une solution de nanoparticules de concentration $100 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$ réduit considérablement l'amplitude de contraction des cardiomyocytes au bout de 24h d'exposition. De plus, pour une concentration de $10 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$, le rythme des battements des cardiomyocytes diminue fortement. La mise en culture des fibroblastes avec une solution de TiO_2 P25 de concentration variant entre 5 et $150 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$ affecte la prolifération cellulaire et aboutit à la mort des cellules en 4 jours. Les nanoparticules ont pénétré à l'intérieur des cellules en détériorant la membrane cytoplasmique (Jawad *et al.* 2011).

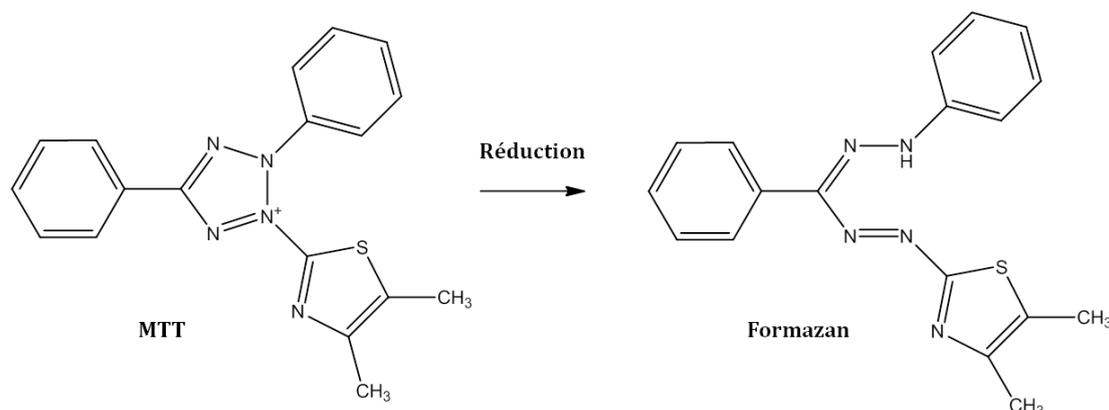
Une étude réalisée sur la toxicité des nanofils de TiO_2 de structure rutile et présentant un diamètre compris entre 4 et 6 nm pour une longueur inférieure à $1 \text{ }\mu\text{m}$, indique qu'ils provoquent des dommages considérables à plusieurs niveaux. L'injection par voie trachéale de doses de nanoparticules de 1 et 5 mg.kg^{-1} induit au bout de 24h une inflammation systémique et pulmonaire avec formation d'oedèmes cardiaque et pulmonaire. De plus, la présence des nanoparticules entraîne une modification profonde de la composition du sang avec une augmentation du nombre de granulocytes et de monocytes ainsi qu'une forte diminution du nombre de plaquettes (Nemmar *et al.* 2007).

Bien que l'introduction de nanoparticules au sein d'un organisme entraîne inévitablement des perturbations cellulaires, il est possible de contrôler le niveau de toxicité des nanoparticules et de limiter les effets néfastes induits par leur présence. En effet, il a été montré que la toxicité des nanoparticules dépend de leur taille, de leur pureté, de leur composition chimique, de leur morphologie, de leur degré d'agglomération et de la dose appliquée (Ferin *et al.* 1992, Oberdorster. 2001, Warheit *et al.* 2008, Krug *et al.* 2011). Dans le cas des nanorubans de titanates, la toxicité ne devrait pas être élevée puisqu'ils ont une taille importante (plusieurs dizaines de μm de long), une pureté élevée (99%) et un fort degré d'agglomération (formation d'un réseau 3D).

De plus, il est possible de diminuer la toxicité par greffage en surface des nanoparticules de chaînes de polymères jouant un rôle important dans la protection des cellules. La présence du polymère permet de limiter l'adhérence des nanoparticules à la membrane cellulaire et réduire la pénétration dans les cellules (Pan *et al.* 2009).

III.3.2 Tests MTT de cytotoxicité sur des fibroblastes et des cardiomyocytes

Pour évaluer la toxicité des nanorubans de titanates, des tests au MTT ont été réalisés sur deux populations de cellules : les fibroblastes et les cardiomyocytes. Ce test permet une quantification rapide et sensible de la viabilité cellulaire. Le réactif utilisé est le sel de tétrazolium MTT (bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tétrazolium). L'anneau de tétrazolium qu'il contient est réduit en formazan par la succinate déshydrogénase mitochondriale produite par les cellules vivantes actives (équation 2).



Équation 2 : Equation de réduction du MTT en formazan.

La réduction forme un précipité de couleur violette principalement dans la mitochondrie et dont la quantité est proportionnelle au nombre de cellules vivantes (Gomez *et al.* 1997). Cette quantité est évaluée par mesure de l'absorbance à 570 nm sur un spectrophotomètre (Victor 3, Wallac) après solubilisation du précipité. Le pourcentage de cellules métaboliquement actives est exprimé par rapport à des cellules en conditions normales (contrôle), dont la valeur est considérée comme égale à 100%.

Pour cela, les cellules en plaque 24 puits ont été mises en contact avec une suspension de nanorubans de concentration 2, 20 ou 70 mg.mL⁻¹. La plus forte concentration, estimée à partir de la surface d'un puit et de la surface spécifique des nanorubans, correspond au cas où la totalité des cellules sont recouvertes par un tapis de rubans. Cette condition mime le cas de la couverture complète d'une plaie par un agent cicatrisant. L'étude s'est déroulée sur 3 jours et les cellules ont été traitées avec différentes doses de nanostructures en présence du milieu de culture Ham complet (tableau 38).

	1 ^{er} jour	2 ^{ème} jour	3 ^{ème} jour	Nombre total de doses
Lot 1 cellules	Suspension nanorubans	PBS	PBS	1
Lot 2 cellules	Suspension nanorubans	Suspension nanorubans	PBS	2
Lot 3 cellules	Suspension nanorubans	Suspension nanorubans	Suspension nanorubans	3

Tableau 38 : Tableau récapitulatif du nombre de doses de nanoparticules (unique ou chronique) appliquées aux cellules pour estimer la toxicité des nanorubans de titanates.

Le premier jour du traitement, le milieu de culture des cellules a été éliminé puis remplacé par 1 mL de suspension de nanorubans ou de PBS. Les cellules ont ensuite été incubées pendant 24h à l'étuve à une température de 37°C et avec 5% de CO₂. Cette étape a été répétée les 2 jours suivants puis au bout de 72h d'étude, le milieu de culture a été éliminé et les cellules ont été rincées deux fois au PBS préalablement chauffé à 37°C. Elles ont été par la suite incubées 1h en présence de 500 µL de MTT à 2 mg.mL⁻¹ dans du milieu Puck G+*. Ce milieu, d'osmolarité parfaite, contient l'ensemble des ions plasmatiques ainsi que du glucose nécessaire à la nutrition des cellules. Puis, la solution de MTT a été éliminée et les cellules ont été lysées pendant 1h à température ambiante par ajout de 500 µL d'isopropanol contenant 0,1 mol.L⁻¹ d'HCL avant d'être analysées par lecture optique à 570 nm.

L'étude a été réalisée sur des fibroblastes cardiaques de rats en culture primaire. Ces cellules ont été retenues car elles jouent un rôle majeur dans le processus de cicatrisation et de régénération. Les résultats indiquent que les nanorubans de titanates présentent une toxicité maximale de 20% puisque la viabilité cellulaire est supérieure à 80% quelle que soit la concentration de la suspension (figure 132). Cependant, une concentration de 2 mg.mL⁻¹ semble la plus adaptée puisqu'elle n'engendre aucune toxicité. La faible toxicité des nanorubans s'explique par leur morphologie. Leur longueur de plusieurs dizaines de micromètres est beaucoup trop importante pour qu'ils soient internalisés par les cellules (figure 18). Cela est confirmé par le fait que l'augmentation de la concentration de la suspension de nanorubans n'induit pas une forte augmentation de la toxicité. Quelle que soit la concentration de la suspension, une application chronique de nanoparticules (3 doses) n'entraîne pas une toxicité plus importante que lorsqu'une seule et unique dose de nanorubans a été appliquée aux cellules le premier jour de l'étude (figure 132).

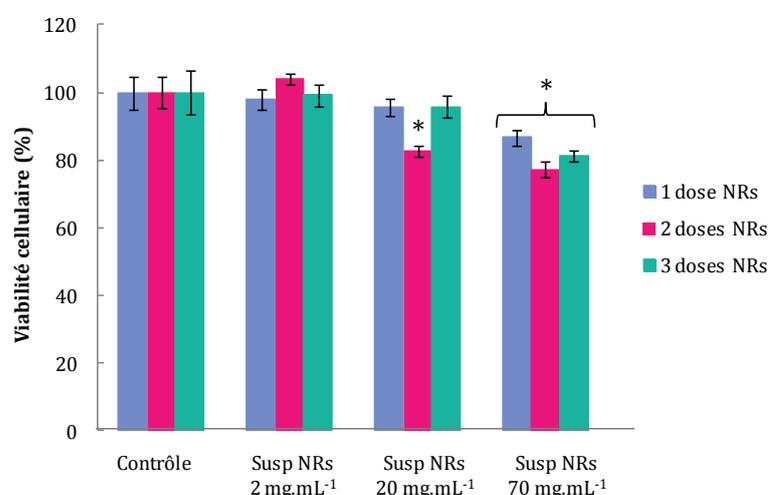


Figure 132 : Mesure de la viabilité cellulaire des fibroblastes incubés en présence de diverses concentrations (2 à 70 mg.mL⁻¹) et doses (1 à 3) de nanorubans. * : différences significatives à p < 0,05 par rapport au contrôle.

Pour évaluer l'effet dose apporté par l'augmentation de la concentration de la suspension de nanorubans, des photos des fibroblastes ont été réalisées après l'application de deux doses de nanostructures (figure 133). Ces clichés confirment également que les nanorubans, sous formes d'agglomérats de plusieurs dizaines de micromètres, ne sont pas internalisés par les cellules et restent à leur périphérie.

*Puck G+ : milieu synthétisé au laboratoire et composé de 126,6 mM de NaCl, 3,8 mM de KCl, 0,11 mM de CaCl₂.2H₂O, 0,62 mM de MgSO₄.7H₂O, 0,86 mM de Na₂HPO₄.2H₂O, 0,61 mM de KH₂PO₄, 14,3 mM de NaHCO₃ et 1,1 g.L⁻¹ de glucose.

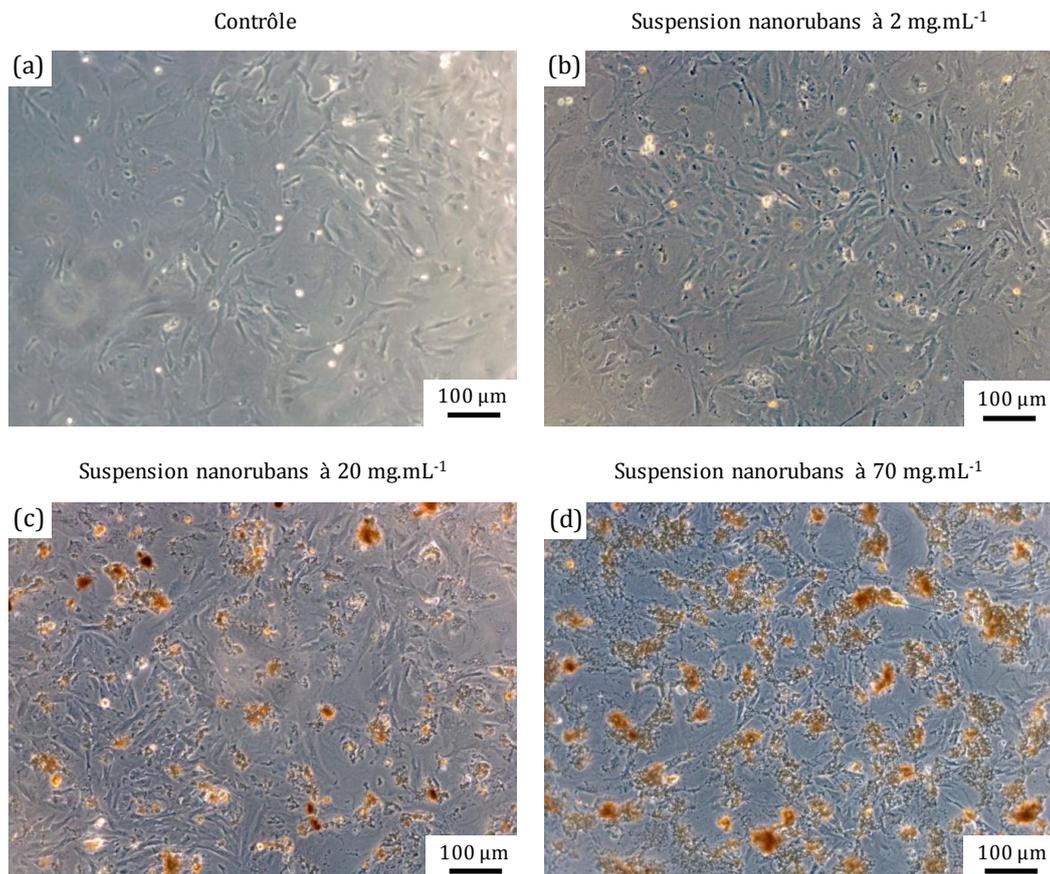


Figure 133 : Photos des fibroblastes incubés en présence d'une suspension de nanorubans de titanates de concentration (a) 0 mg.mL⁻¹, (b) 2 mg.mL⁻¹, (c) 20 mg.mL⁻¹ et (d) 70 mg.mL⁻¹ après une exposition à deux doses de nanoparticules.

Pour confirmer que la morphologie des nanoparticules de titanates influence sur leur toxicité, des tests de forme ont été réalisés. Pour cela, la toxicité de suspensions de nanotubes de concentration 2 et 70 mg.mL⁻¹ a été évaluée par des tests MTT sur des fibroblastes puis comparée à celle des nanorubans (figure 134).

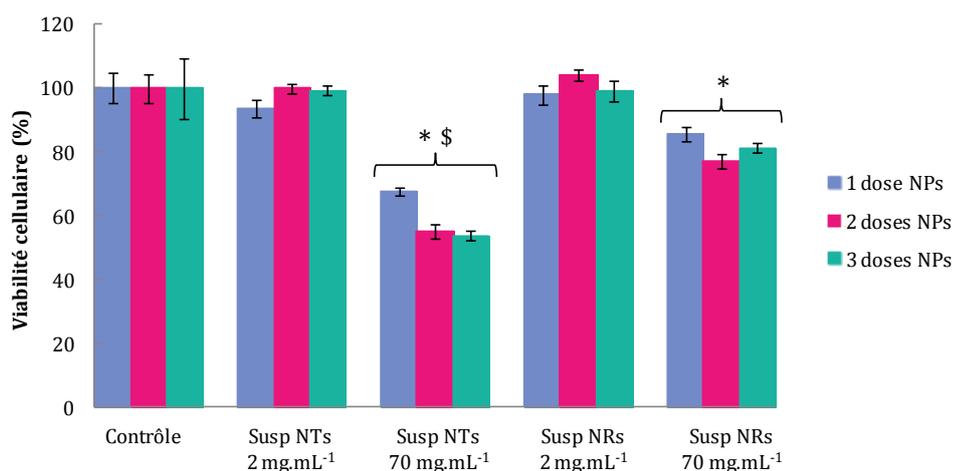


Figure 134 : Mesure de la viabilité cellulaire des fibroblastes incubés en présence de diverses concentrations (2 et 70 mg.mL⁻¹) et doses (1 à 3) de nanotubes ou de nanorubans. * : différences significatives à p < 0,05 par rapport au contrôle. \$: différences significatives à p < 0,05 par rapport aux nanorubans.

Les résultats indiquent que pour une concentration de 2 mg.mL⁻¹ les nanotubes comme les nanorubans présentent une toxicité nulle quel que soit le nombre de dose appliqué (figure 134). En revanche, pour une concentration de 70 mg.mL⁻¹, la toxicité est beaucoup plus importante dans le cas des nanotubes. Après l'application d'une dose de nanoparticules, la viabilité cellulaire est inférieure à 70% et diminue jusqu'à 50% lorsque 2 ou 3 doses sont appliquées. En revanche, dans le cas des nanorubans, la viabilité cellulaire reste stable à 80% quel que soit le nombre de dose appliqué. A forte dose, les nanotubes sont donc beaucoup plus toxiques que les nanorubans. Cela s'explique par le fait que les nanotubes seraient internalisés par les cellules contrairement aux nanorubans.

Pour estimer la toxicité des nanorubans de titanates sur les cellules cardiaques, des tests MTT ont été réalisés sur des cardiomyocytes de rats nouveaux nés. Les résultats indiquent que pour une concentration de 70 mg.mL⁻¹ la viabilité cellulaire est d'environ 70% quelle que soit le nombre de doses de nanorubans appliqué. Pour éviter une toxicité trop élevée il est alors nécessaire de ne pas dépasser la concentration de 20 mg.mL⁻¹ (figure 135). Comme pour les tests menés sur les fibroblastes, le nombre de doses de nanoparticules appliqué aux cellules n'influe pas sur la toxicité. Dans le cas de la suspension à 2 mg.mL⁻¹, pour deux doses de nanostructures appliquées, la viabilité cellulaire atteint une valeur supérieure à 100% du témoin (104,2%). Bien que cette variabilité soit acceptable, il est probable que le test de toxicité MTT, utilisé en routine en biologie, ne soit pas adapté à l'étude des nanoparticules dont les propriétés physico-chimiques pourraient interférer avec les réactifs ou les systèmes de détection de ce test.

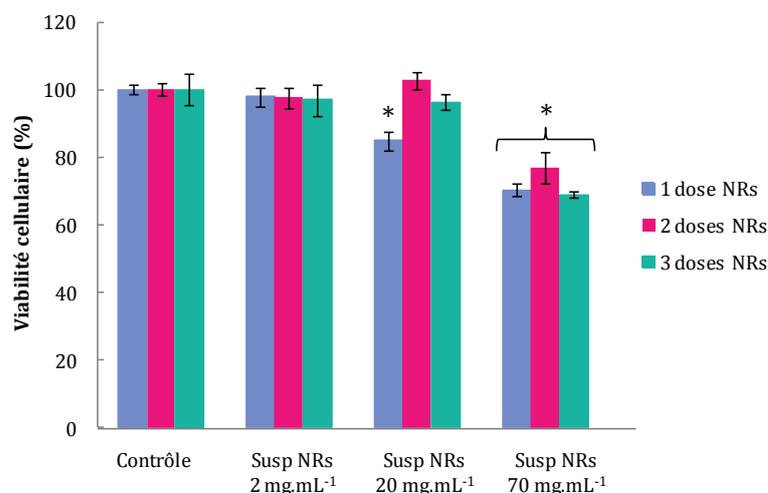


Figure 135 : Mesure de la viabilité cellulaire des cardiomyocytes de rats nouveaux nés incubés en présence de diverses concentrations (2 à 70 mg.mL⁻¹) et doses (1 à 3) de nanorubans. * : différences significatives à p < 0,05 par rapport au contrôle.

III.3.3 Tests d'agrégation plaquettaire

Dans l'optique d'utiliser le nouveau nanobiohybride en tant qu'agent hémostatique, des tests d'agrégation plaquettaire ont été réalisés sur les nanorubans nus. Ces tests ont été effectués sur du PRP (plasma riche en plaquette) d'un d'honneur volontaire (annexe 12). Ce PRP a été préalablement analysé pour contrôler sa teneur en plaquette. Ce taux doit atteindre 350 millions de plaquettes par microlitre. Par la suite, 10 µL de suspension de nanorubans ont été

ajoutés à 290 μL de PRP de façon à obtenir une gamme de concentrations finales de nanoparticules variant de 1 à 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Les concentrations des suspensions de nanorubans sont largement inférieures à celles utilisées lors des tests MTT. Cela s'explique par le fait que les suspensions de nanorubans sont colorées en blanc à fortes concentrations. Les mesures d'agrégation plaquettaire se faisant par lecture optique, il est nécessaire que la suspension soit faiblement colorée, et donc peu concentrée, pour ne pas fausser les résultats. Les suspensions ont été incubées sous agitation pendant 20 minutes à 37°C avant de réaliser des mesures.

Les résultats montrent que la présence des nanorubans n'active pas la fonction plaquettaire puisqu'aucun agrégat n'est détecté après 11 minutes de réaction et ce quelle que soit la concentration de la suspension (figure 136a). Dans le but de déclencher volontairement l'agrégation des plaquettes, 5 μM d'ADP, un agoniste des récepteurs P_2Y_{12} des plaquettes sanguines, a été ajouté au PRP. La proportion d'agrégat augmente alors en quelques secondes et passe de 0 à 90% (figure 136b). Pour une concentration de 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, la présence des nanorubans ne semble pas perturber l'agrégation plaquettaire. En revanche, pour une concentration plus élevée de 250 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, le processus d'agrégation plaquettaire serait freiné par la présence des nanorubans puisque le taux d'agrégats n'est que de 50% (figure 136b). Pour éviter toute interférence non désirée, il est alors préférable de ne pas dépasser une concentration de nanorubans de 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.

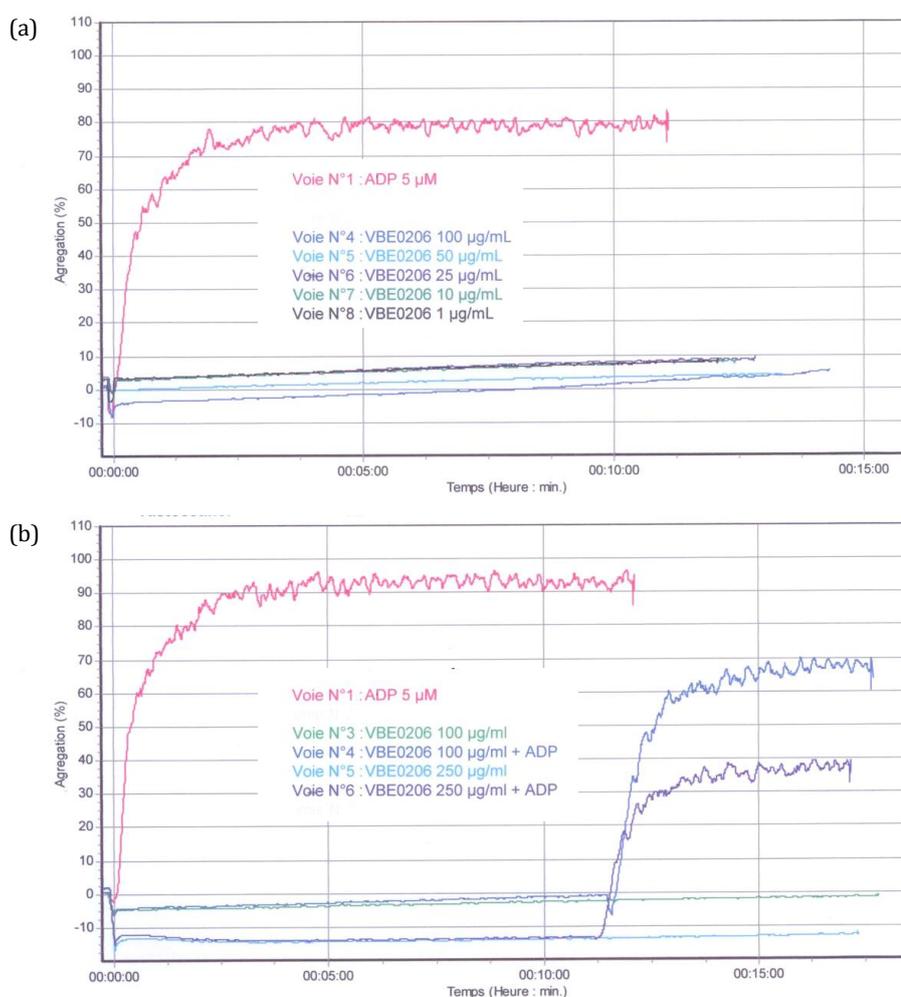


Figure 136 : Courbes de mesure de l'agrégation plaquettaire en présence de différentes concentrations de nanorubans de titanates en fonction du temps (a) sans et (b) avec la présence d'un agoniste des plaquettes sanguines (ADP 5 μM).

III.4 Formulation galénique du nanobiohybride : cas des alginates

Quel que soit le domaine d'application du nanobiohybride, il sera considéré comme un principe actif (Eaton. 2011). Il est alors nécessaire de le formuler sous une forme galénique adaptée à l'application ciblée. Une formulation par l'intermédiaire d'un hydrogel permettant une application *in situ* sur la plaie ou les tissus endommagés semble la plus rapide, la plus simple et la plus efficace et a été privilégiée ici. Ce mode de formulation est d'ailleurs utilisé par la société française de biotechnologie ADOCIA, spécialisée dans le développement de médicaments très performants à base de protéines thérapeutiques déjà approuvées.

III.4.1 Les avantages d'une formulation par hydrogel d'alginate

L'hydrogel est une forme galénique récente puisqu'elle a été utilisée pour la première fois dans le domaine biomédical dans les années 60 (Wichterle *et al.* 1960). Depuis, la technologie des hydrogels a permis des avancées remarquables dans le domaine pharmaceutique et biomédical (Peppas *et al.* 1987, Hoffman. 2003, Kashyap *et al.* 2005, Hamidi *et al.* 2008). La structure particulière des hydrogels sous forme de réseau tridimensionnel permet une utilisation dans des applications thérapeutiques telle que la libération ciblée de principes actifs (Mendoume-Nze. 2008) par l'intermédiaire de processus divers et variés (figure 137) (Censi *et al.* 2012).

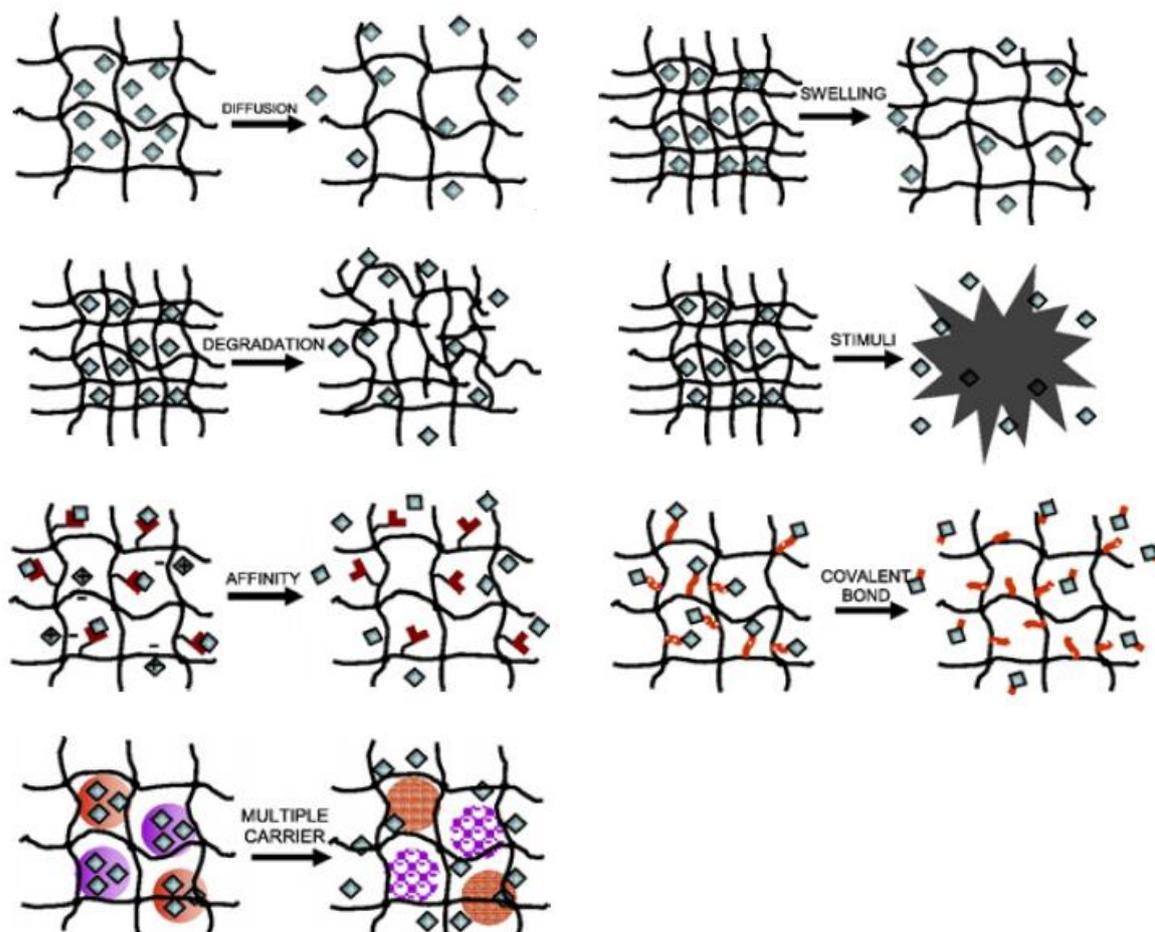


Figure 137 : Schéma représentant les différents modes de libération des principes actifs contenu dans un hydrogel d'après (Censi *et al.* 2012).

Cette structure semblable à celle de la matrice extracellulaire permet également de contrôler le développement des cellules et la morphogénèse tissulaire. Cela permet d'utiliser les hydrogels dans le domaine de la régénération tissulaire (Malafaya *et al.* 2007, Frisman *et al.* 2012, Jabbari. 2011). Les hydrogels présentent également de remarquables capacités d'absorption d'eau et de fluides biologiques (Peppas *et al.* 2000, Hamidi *et al.* 2008) ainsi que des propriétés rafraichissantes, antipurigineuses* et antiphlogistiques* (Deplazes *et al.* 2007).

De plus, les hydrogels peuvent présenter la particularité de gélifier *in situ* (Hatefi *et al.* 2002, Packhaeuser *et al.* 2004, Coviello *et al.* 2007, Van Tomme *et al.* 2008, Sargeant *et al.* 2011, Huynh *et al.* 2011). Il est alors possible d'activer le processus de gélification par photopolymérisation (Li *et al.* 2006), auto-assemblage (Kopesky *et al.* 2009), thermosensitivité (Wu *et al.* 2006) ou sensibilité au pH du milieu environnant (Nguyen *et al.* 2010). La micro-injection de ces hydrogels permet une diminution des chirurgies invasives. Ce mode d'administration particulier, moins agressif pour les tissus, permet de limiter les transfusions par leur rôle hémostatique et de favoriser la convalescence des patients.

Les alginates présentent également des propriétés particulièrement intéressantes. Ce sont des polymères biocompatibles et non toxiques présentant une structure fortement poreuse et une affinité avec les milieux aqueux responsable de leur tendance à gélifier (Tonnesen *et al.* 2002). Ils peuvent également jouer le rôle d'agent cicatrisant puisque leur utilisation permet de maintenir un taux d'humidité propre à la réparation tissulaire et protègent la plaie des chocs extérieurs ainsi que des variations de température (Hulmann. 2010). Différentes formes commerciales d'alginates sont d'ailleurs utilisées pour la cicatrisation de plaies sévères comme les escarres de stade 2, 3 et 4 (Carayon *et al.* 2012, Meaume. 2004) (figure 138) et les brûlures du 3^{ème} degré (Lallement *et al.* 2007).

*antipurigineuse : qui calme la sensation de démangeaison.

*antiphlogistique : qui combat l'inflammation.

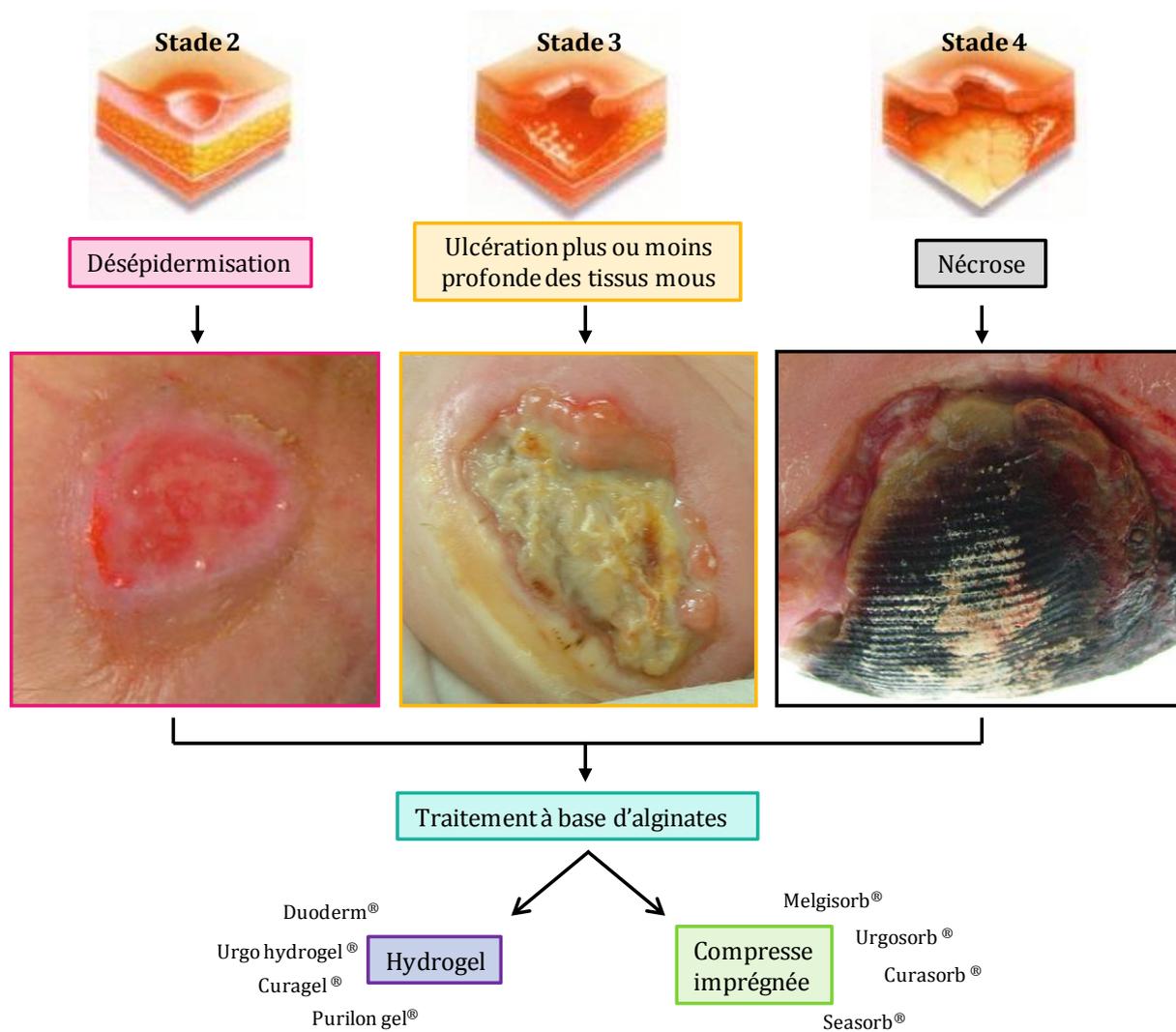


Figure 138 : Schéma représentant les escarres de différents stades pouvant être traités par des alginate sous forme de gel ou de compresse imprégnées d'après (Carayon *et al.* 2012).

Enfin, les alginate sont également utilisés pour la régénération tissulaire car ils favorisent l'organisation et la prolifération cellulaire (Vallée. 2007, Sapir *et al.* 2011, Shachar *et al.* 2011). Ils ont été utilisés dans le cas d'un remodelage cardiaque suite à un infarctus (Landa *et al.* 2008, Leor *et al.* 2009).

III.4.2 Généralité sur les alginate

Les alginate sont contenus dans la paroi cellulaire des phéophycées, des algues brunes marines de l'ordre des laminaires (figure 139).



Figure 139 : Photos de trois familles d'algues brunes laminaires utilisées pour l'extraction de l'alginate de sodium. (a) *Macrocystis pyrifera*, (b) *Laminaria hyperborea* et (c) *Laminaria digitaria*.

Le procédé d'extraction des alginates se déroule en 6 étapes principales. Durant la phase de déminéralisation, les algues sont mises en présence d'un acide de façon à transformer l'alginate de calcium en acide alginique. Puis, le broyage des algues en milieu alcalin transforme l'acide alginique insoluble en alginate de sodium fortement soluble en milieu aqueux. Cette étape permet de retirer les composés insolubles des algues comme la cellulose, qui est éliminée par filtration. Une étape de traitement acide permet de faire précipiter l'alginate de sodium en acide alginique. Puis, suivant l'alginate alcalin souhaité, l'acide alginique est neutralisé par une base alcaline. Le produit est enfin séché et broyé à la granulométrie désirée (Dion *et al.* 2000, Goujon, 2004).

D'un point de vue chimique, les alginates sont des polysaccharides linéaires, anioniques, constitués des sels de deux acides uroniques dérivant du mannose : l'acide β -D-mannuronique (M) et son épimère l'acide α -L-guluroniques (G) (Draget *et al.* 1997). Ces deux acides se lient en 1-4 selon des proportions et des arrangements variables. La structure de la molécule est alors formée d'un enchaînement de trois types de fragments différents. Les deux premiers sont des fragments homogènes d'acide D-mannuronique (blocs M-M-M) et d'acides L-guluronique (blocs G-G-G). Ces deux séquences sont dites dures et difficiles à dépolymériser. Le troisième fragment est une séquence mixte des deux acides (blocs M-G-M-G). Ces fragments sont fragiles et susceptibles de se rompre. La proportion de ces différents fragments dépend de l'algue de laquelle est extrait l'alginate (figure 140).

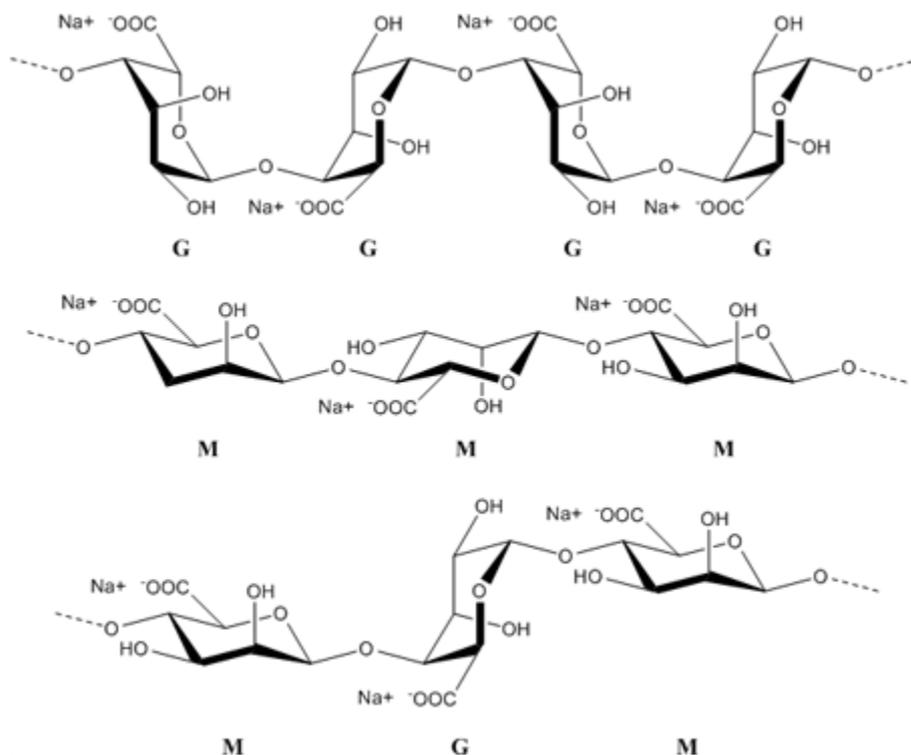


Figure 140 : Structure chimique des fragments homogènes d'acide D-mannuronique (blocs M-M-M), d'acides L-guluronique (blocs G-G-G) et des fragments mixtes des deux acides (blocs M-G-M-G) d'après (Draget *et al.* 1997).

Les alginates de sodium et de calcium sont plus connus, dans le domaine de l'industrie agroalimentaire, sous le nom de E401 et E404. Ce sont des agents de texture notamment utilisés en tant que gélifiants, épaississants, émulsifiants et stabilisants dans les glaces, les bonbons, les crèmes dessert, le ketchup, le poisson pané, la charcuterie, le lait... Ils sont également employés pour des applications industrielles et rentrent dans la composition chimique des peintures, textiles, papiers, latex, plâtres, produits horticoles... (Jouanneau. 2007). Les alginates sont également un produit officinal puisqu'ils sont utilisés en tant que principe actif ou excipient. Ils sont donc certifiés par la Pharmacopée Européenne (Parm. Eur. 2002) et sont utilisés dans de nombreux produits cosmétiques et pharmaceutiques comme les crèmes, les pansements, le dentifrice, les sirops....

III.4.3 Elaboration et caractérisation d'hydrogels d'alginate de sodium

La formation d'un hydrogel d'alginate de sodium est réalisée par simple dissolution de poudre d'alginate de sodium dans de l'eau déionisée à une température de 20°C. Sous l'effet de l'hydratation, la poudre va gonfler et former un gel. Pour obtenir un gel homogène, il est nécessaire de respecter un protocole de fabrication rigoureux. Avant d'introduire la poudre d'alginate, il est important que l'eau soit sous agitation mécanique vigoureuse (480 tours.min⁻¹) de façon à créer un vortex. L'alginate est ensuite ajouté progressivement en le saupoudrant au dessus du vortex pour éviter la formation de grumeaux. Le gel a été agité pendant une durée de 30 minutes pour assurer une dissolution complète de l'alginate puis il est stocké 24h au frigo pour éliminer les bulles d'air formées (Qin *et al.* 2007, Meena *et al.* 2008).

Une gamme d'hydrogel de concentration variant de 0,5% à 10% (m/v) a été réalisée à partir d'une poudre d'alginate de sodium provenant de Sigma Aldrich (figure 141).

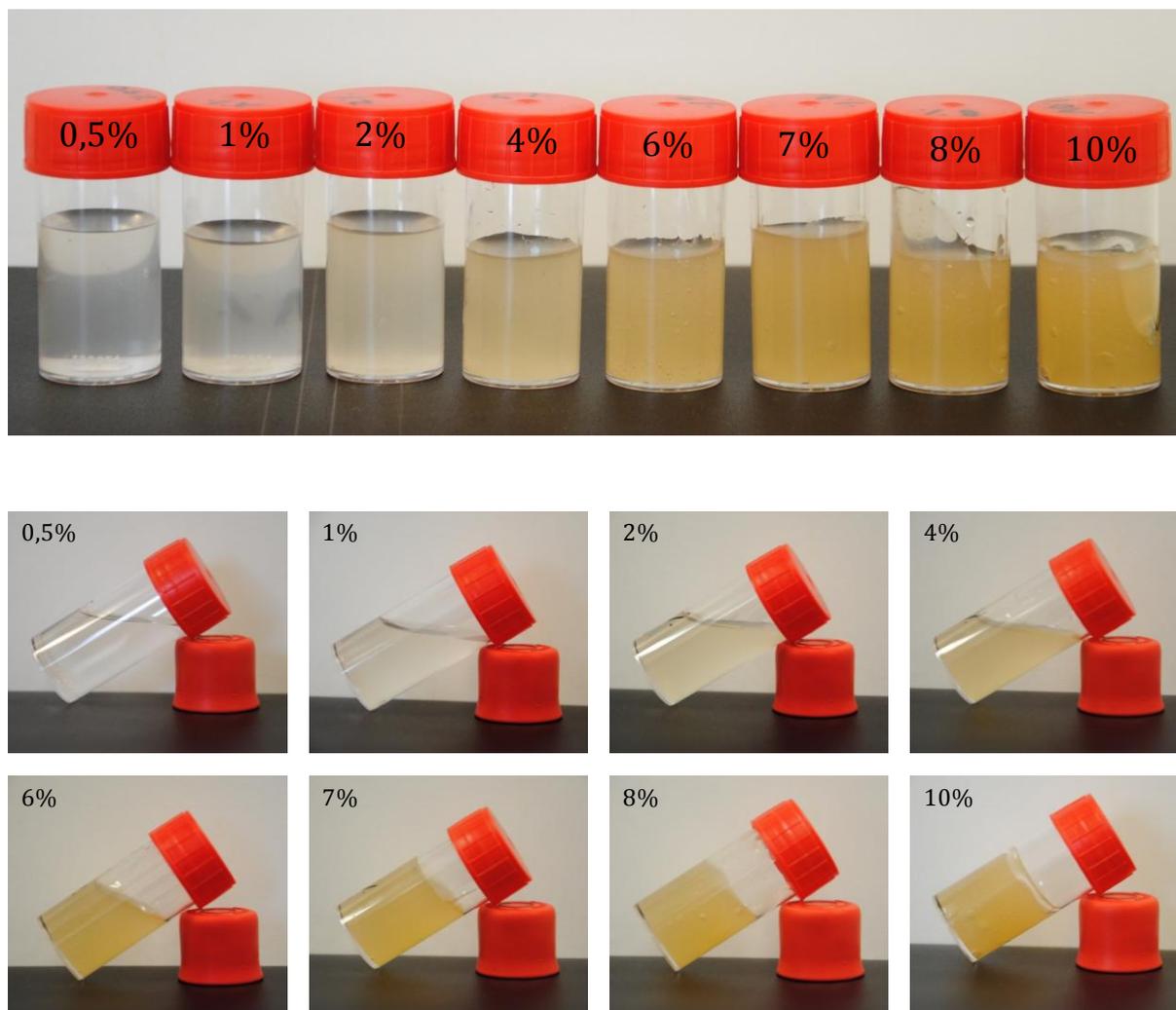


Figure 141 : Photos de la gamme d'hydrogels d'alginate de sodium réalisée permettant de visualiser les différences de concentration et de viscosité. Les photos ont été prises 2 minutes après la préparation du montage.

Pour caractériser cette gamme d'hydrogels, des tests de viscosité ont été réalisés puis leurs propriétés rhéologiques ont été comparées à trois hydrogels d'alginate commerciaux : Duoderm®, Purilon® et Aquacel®. Ces tests ont été réalisés à température ambiante puis à 37°C pour étudier leur comportement dans des conditions se rapprochant d'une application cutanée (figure 142).

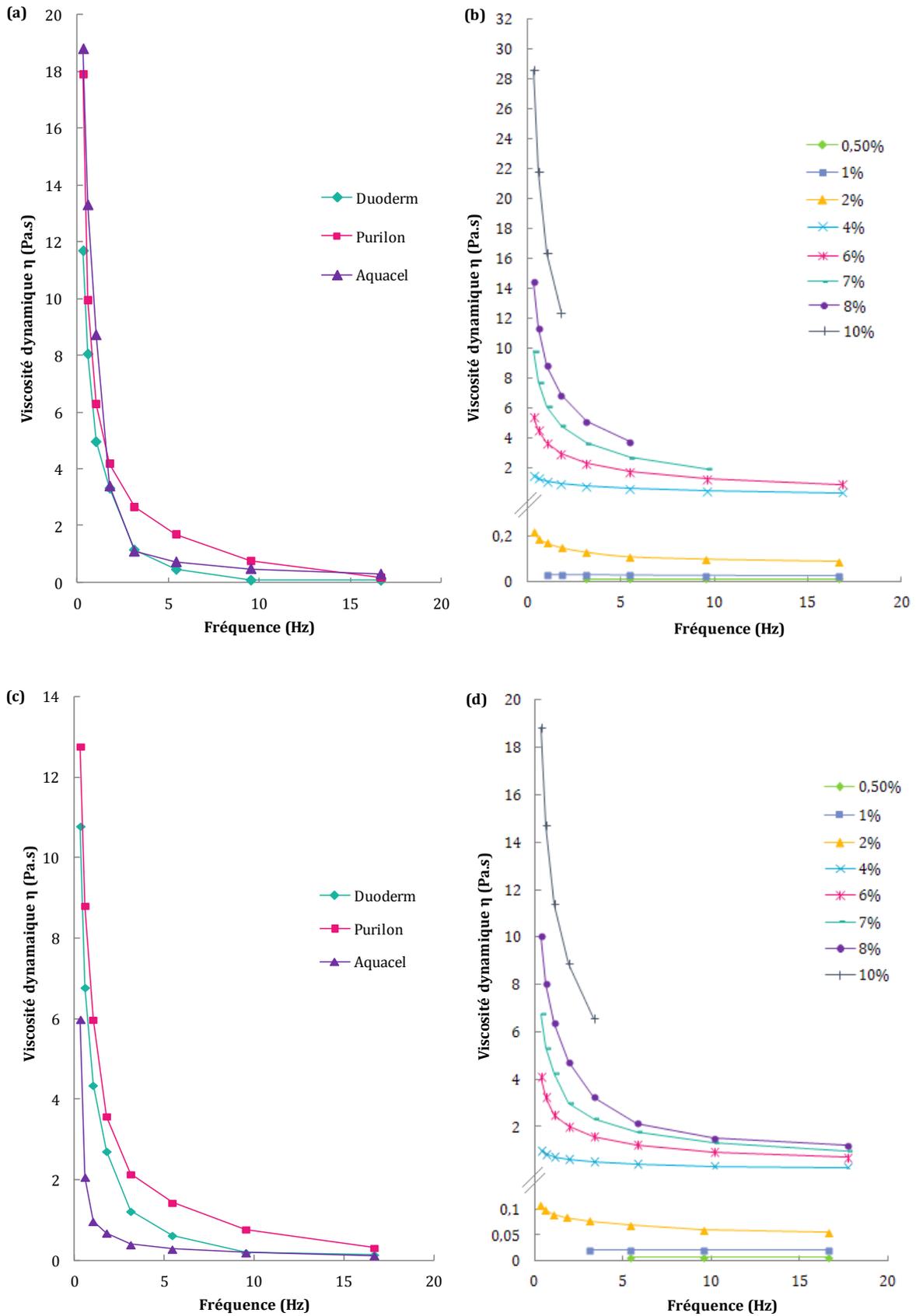


Figure 142 : Courbes représentant la viscosité dynamique en fonction de la fréquence (a et c) des hydrogels commerciaux et (b et d) de la gamme d'hydrogels d'alginate de sodium à température ambiante et à une température corporelle de 37°C.

Le gel à 7% est le gel choisi pour la suite de l'étude car il présente une viscosité, à température ambiante et à 37°C, proche de celle des trois hydrogels commerciaux. De plus, sa texture douce et sa facilité d'étalement sur la peau en font un excellent candidat pour la formulation du nouveau nanobiohybride. Ce gel présente un caractère thermoréversible puisque sa viscosité diminue d'environ 30% lorsque la température augmente et atteint 37°C (figure 143a). De plus, l'allure du rhéogramme $\tau(\dot{\gamma})$ du gel à 7%, présentant la variation de la contrainte de cisaillement (en Pa) en fonction de la vitesse de déformation (en s^{-1}), indique que l'hydrogel a un comportement rhéofluidifiant ou pseudoplastique. Sa viscosité diminue lorsque le taux de cisaillement augmente (figure 143b) (Couarraze *et al.* 1983).

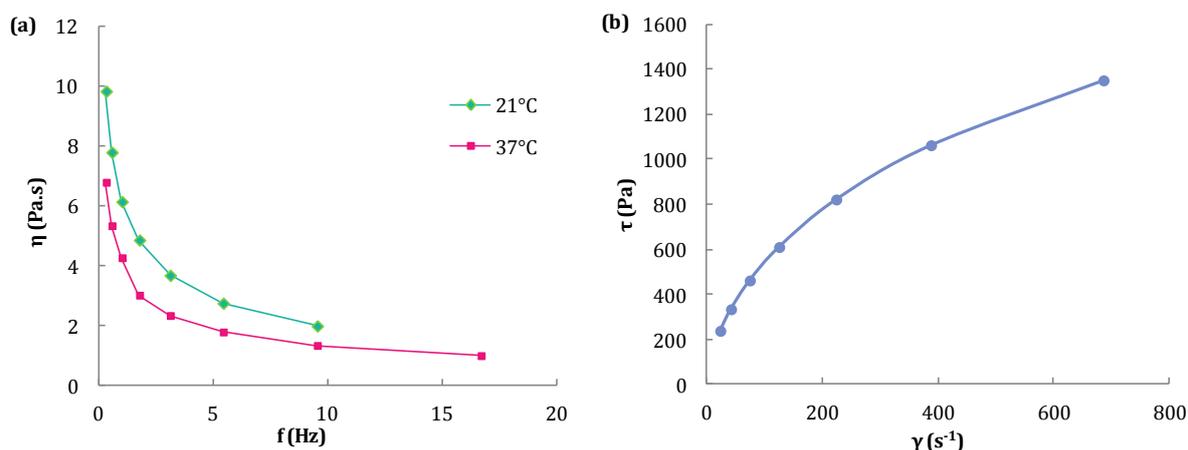


Figure 143 : (a) Courbe représentant la viscosité dynamique du gel d'alginate de sodium à 7% en fonction de la fréquence à 20 et 37°C. (b) Courbe de la variation de la contrainte de cisaillement du gel d'alginate de sodium à 7% en fonction de la vitesse de déformation.

Pour évaluer l'étalement du gel au cours du temps, des tests de maintien en fluidité ont également été réalisés. Pour cela, 200 μ L de gel ont été déposés à l'aide d'une seringue sur un support en verre et la goutte formée a été mesurée à $t=0$ et à $t=1h$ (réalisée 20 fois). Le matériel utilisé étant initialement destiné à évaluer le maintien en fluidité des ciments, il n'était pas possible de thermostatier le support à 37°C. Du gel à 6% a alors été utilisé pour mimer le gel à 7% à une température corporelle. Ce gel présente à température ambiante une viscosité identique à celle du gel à 7% à 37°C (figure 144).

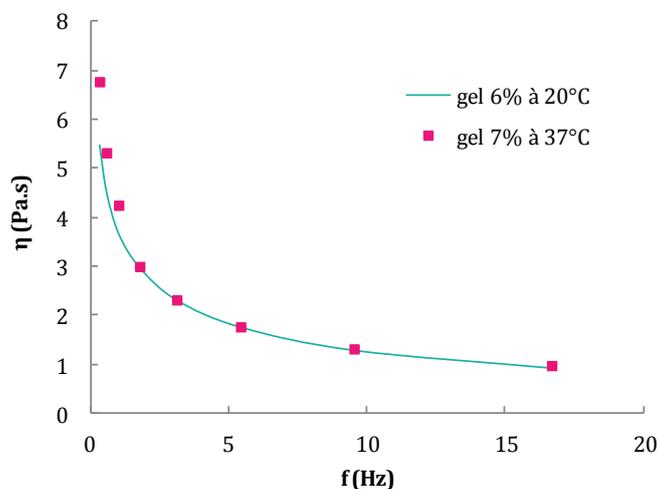


Figure 144 : Courbes représentant la viscosité dynamique des gels d'alginate de sodium à 6% et 7% en fonction de la fréquence.

Dans le cas du gel à 7%, la goutte mesurant initialement $0,6 \pm 0,05$ cm s'étale et atteint au bout d'une heure un diamètre de $0,9 \pm 0,05$ cm. Dans le cas du gel à 6%, mimant le gel à 7% à une température de 37°C , le diamètre de la goutte passe de $0,7 \pm 0,05$ cm à $1,25 \pm 0,05$ cm en une heure (figure 145). La surface couverte par le gel d'alginate de sodium à 7% augmente ainsi de 50% à température ambiante et de 64% à température corporelle. Ce taux d'étalement, identique à celui du gel commercial Duoderm®, permet au gel une fois appliqué de rester *in situ* sans qu'il n'y ait de forts écoulements.

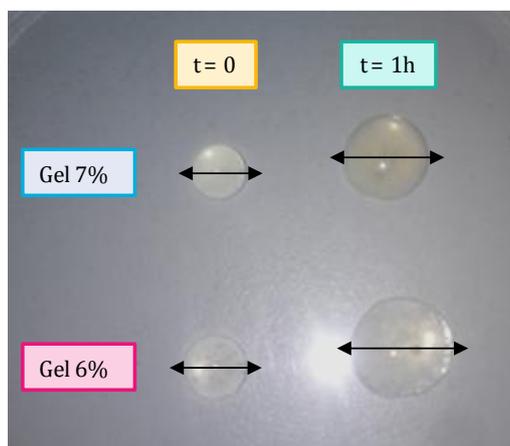


Figure 145 : Photo de l'étalement d'une goutte de $200 \mu\text{L}$ d'hydrogel d'alginate de sodium à 6% et 7% sur une plaque de verre à 20°C à $t = 0$ et $t = 1\text{h}$.

La porosité de l'hydrogel est une caractéristique structurale importante. En effet, la taille des pores doit être suffisamment élevée pour laisser diffuser et circuler le principe actif ainsi que les cellules pour permettre une application dans le domaine de la médecine régénérative, de l'hémostase et de la cicatrisation. Pour déterminer la porosité des hydrogels, il est possible d'utiliser des techniques de porosimétrie au mercure ou d'adsorption d'azote (BET). Cependant, ces techniques nécessitent l'utilisation de gels secs ce qui n'est pas représentatif de leur état lors de leur utilisation. De même, la microscopie à balayage, requiert un séchage préalable de l'échantillon afin de figer sa structure. Le gel est alors congelé dans l'azote liquide puis lyophilisé pendant plusieurs jours. Le protocole de congélation est l'étape critique de la méthode et les résultats obtenus sont fonction de la cinétique de congélation. La taille des pores est contrôlée par la taille des cristaux de glace formés. Des études ont démontré que selon le gradient thermique appliqué au système, la congélation du gel aboutit à des structures très différentes (Chung *et al.* 2002). Plus la congélation se fait rapidement, plus les cristaux formés sont petits et plus la porosité est fine (figure 146).

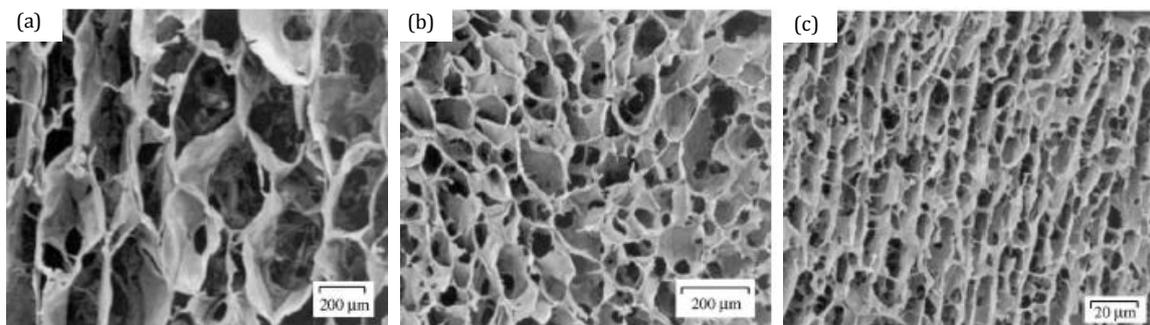


Figure 146 : Images MEB environnemental des éponges de mélanges alginate/chitosane ayant subi des congélations à différentes températures : (a) -20°C , (b) -70°C , (c) azote liquide (-196°C) d'après (Chung *et al.* 2002).

Les observations en microscopie électronique environnementale semblent être alors la technique la moins destructive pour déterminer la taille des pores des hydrogels puisqu'elles s'effectuent à une pression et à un taux d'humidité proche de ceux de l'air ambiant. Cependant, des essais réalisés sur le MEB environnemental de l'INRA à Dijon et de l'INSA de Lyon n'ont pas permis de visualiser la porosité des hydrogels. La faible pression appliquée au système provoque la vaporisation des molécules d'eau contenues au sein de la structure interne entraînant la destruction du squelette du gel. Une technique de cryogénie de pointe avec une congélation quasiment instantanée pour éviter la détérioration de la structure des gels est alors nécessaire pour estimer sa porosité. Une étude réalisée sur les hydrogels d'alginate et utilisant la cryogénie pour l'observation MEB des échantillons indique que lorsque la concentration du gel est de 2%, la taille des pores avoisine $150\ \mu\text{m}$ (figure 147). L'augmentation de la concentration du gel entraîne une diminution de la taille des pores. Cette tendance laisse supposer qu'un gel d'alginate de sodium à 7% présenterait une taille de pores avoisinant les $70\ \mu\text{m}$ permettant la circulation des cellules (Yao *et al.* 2012).

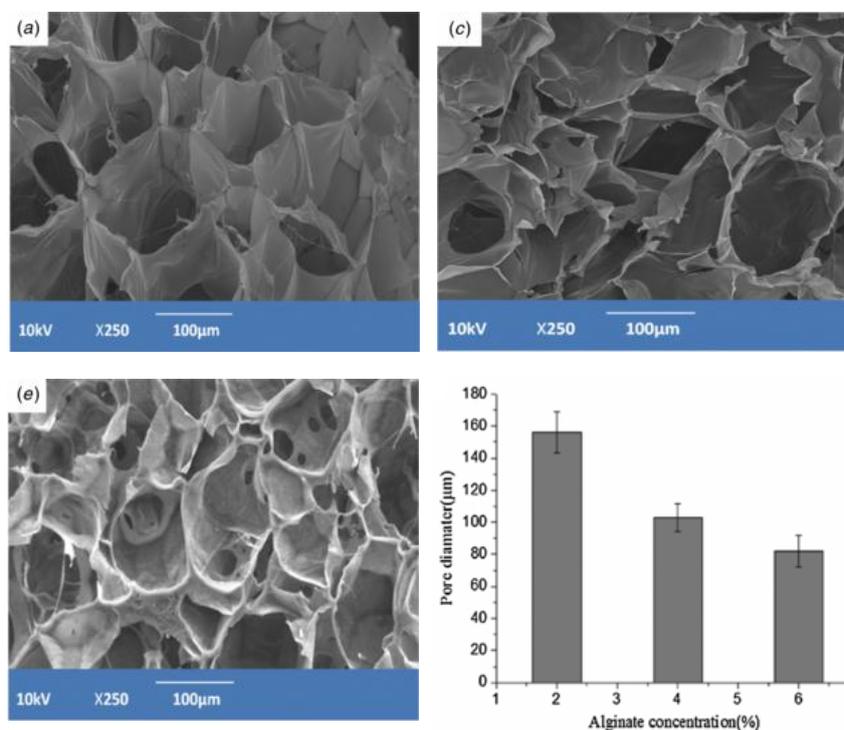


Figure 147 : Images MEB environnemental d'hydrogels d'alginate de sodium de concentration (a) 2%, (c) 4% et (e) 6% et histogramme représentant la taille des pores du gel en fonction de la concentration d'après (Yao *et al.* 2012).

III.4.4 Elaboration d'hydrogels d'alginate de calcium : le principe de la « boîte à œuf »

La poudre d'alginate de calcium n'est soluble dans l'eau qu'à pH basique. Pour former un hydrogel d'alginate de calcium à pH physiologique, il est alors nécessaire d'utiliser la méthode de transfert d'ions. Comme 90% des ions Na^+ contenus dans une solution d'alginate de sodium peuvent être facilement déplacés par des ions calciques (Seely *et al.* 1974), l'échange entre les ions Na^+ et Ca^{2+} se fait le plus généralement par mise en contact d'un hydrogel d'alginate de sodium et d'une solution de CaCl_2 (Iijima *et al.* 2002, Mazens *et al.* 2005, Li *et al.* 2009). La présence des ions Ca^{2+} va provoquer un processus de polymérisation avec formation d'un réseau tridimensionnel de type « boîte à œuf » (figure 148) (Draget *et al.* 1997).

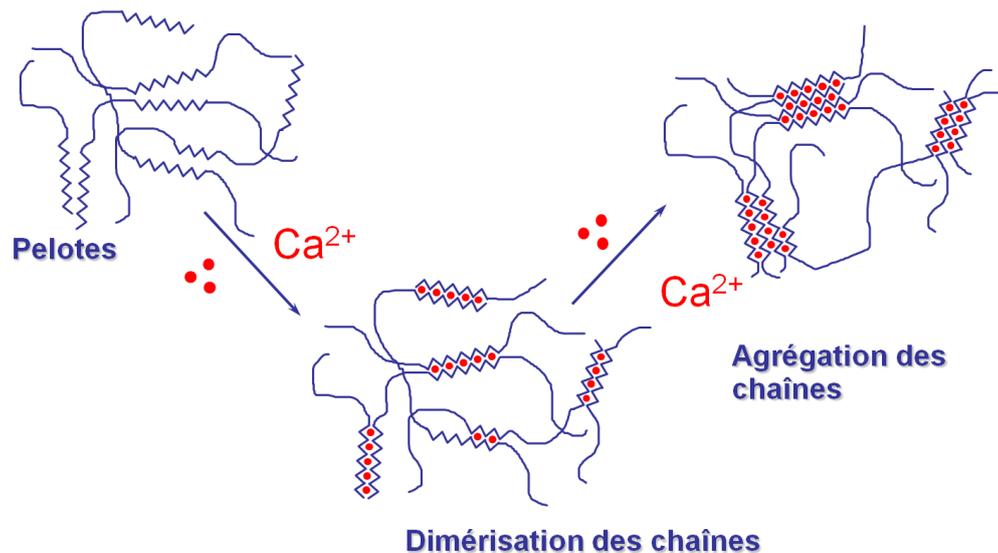


Figure 148 : Schéma représentant la formation d'un hydrogel d'alginate de calcium par polymérisation avec formation d'un réseau tridimensionnel de type « boîte à œuf » d'après (Draget *et al.* 1997).

Cependant, le transfert d'ions étant une réaction très rapide, le mélange direct de ces deux produits conduit à une précipitation instantanée (Draget *et al.* 2005, Nunamaker *et al.* 2007). Il est alors nécessaire de contrôler la cinétique d'échange pour obtenir un gel homogène et éviter la formation de billes (figure 149). Cette forme est idéale pour l'encapsulation de principes actifs (Velings *et al.* 1995) et de cellules comme les îlots de Langerhans, les hépatocytes et les cellules parathyroïdes (Sun. 1993, Moustafa. 2007) mais est inappropriée pour recouvrir une plaie et favoriser la cicatrisation.

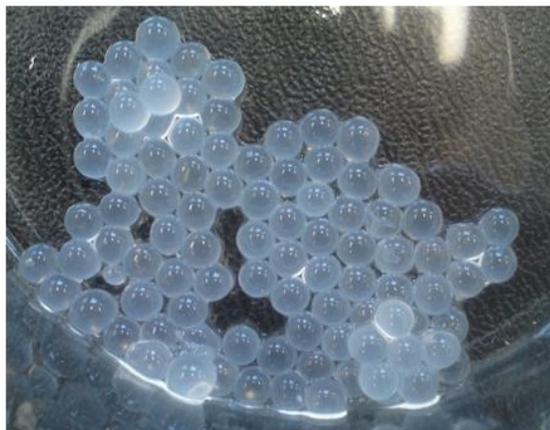


Figure 149 : Photo des billes d'alginate de calcium formées par ajout direct d'un hydrogel d'alginate de sodium dans une solution de CaCl_2 .

Différentes techniques sont alors envisageables pour contrôler la cinétique d'échange d'ions et obtenir un gel homogène. Tout d'abord, il est possible d'utiliser un sel de calcium à diffusion lente tel que le CaSO_4 (Palluault 2010). L'emploi d'un sel retardateur présentant un pouvoir séquestrant vis-à-vis du calcium comme les pyrophosphates et les phosphates alcalins tels que l'hexamétophosphate de sodium ou le tripolyphosphate de sodium semble également approprié pour l'obtention d'un gel homogène (Goujon 2004). Une autre méthode consiste à utiliser une solution de NaCl lors du transfert d'ions permettant d'accroître l'enchevêtrement des chaînes et de ralentir leur migration. L'équilibre des charges entre la solution d'alginate et la solution de chlorure de sodium évite le déplacement de l'alginate vers la zone de gélification (Rastello *et al.* 2004, Mazens *et al.* 2005). Enfin, un processus de gélification interne basé sur le mélange d'une forme inactive de l'ion calcium avec une solution d'alginate en présence d'un agent retardateur comme le D-glucono- δ -lactone (GDL), à partir duquel la libération des ions H^+ conduit à l'activation du cation chélatant au sein même du mélange de polymère (Draget *et al.* 1997, Neiser *et al.* 1999). En plus de contrôler la cinétique de transfert entre les ions Na^+ et Ca^{2+} , il est également indispensable de maîtriser les concentrations et les quantités de réactifs mis en jeu pour obtenir la formulation souhaitée (figure 150) (Rastello 2002).

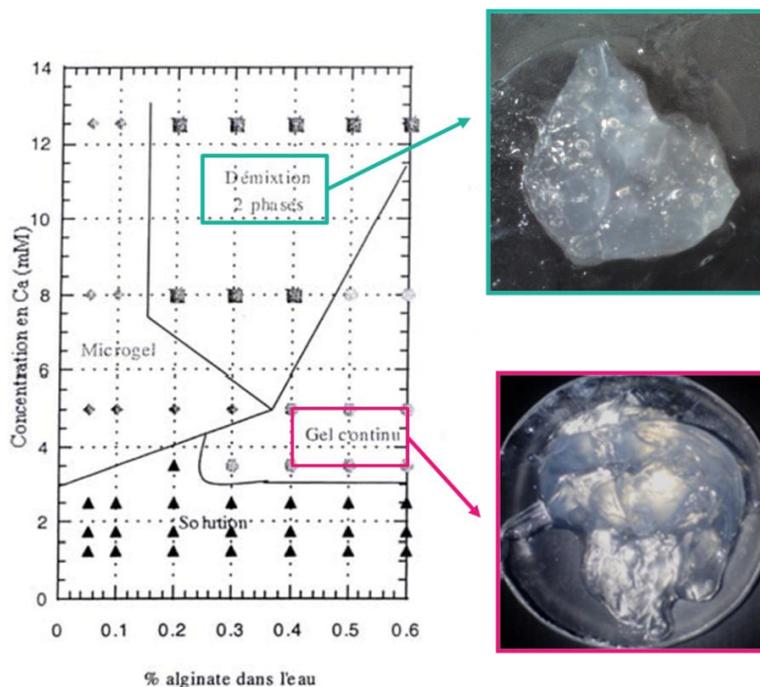


Figure 150 : Diagramme de phases alginate/Ca²⁺ et photos d'un gel d'alginate de calcium en démixtion et d'un gel homogène d'alginate de calcium d'après (Rastello, 2002).

En tenant compte de tous ces paramètres, plusieurs essais ont été réalisés pour élaborer un hydrogel d'alginate de calcium. La technique ayant apporté les meilleurs résultats repose sur l'utilisation d'une solution de CaSO₄ permettant une diffusion lente des ions Ca²⁺. En accord avec le diagramme de phase alginate/Ca²⁺, un hydrogel d'alginate de sodium à 1% a été utilisé pour obtenir un gel homogène et continu d'alginate de calcium et éviter la zone de démixtion (figure 150). Pour déterminer la teneur en ion Na⁺ de la poudre d'alginate de sodium utilisée, des analyses ICP ont été réalisées. Les résultats indiquent que la concentration en ions sodium est de 6,5 mg.L⁻¹. Le gel d'alginate de sodium à 1% contient alors 0,0028 mol d'ions Na⁺. Pour obtenir un degré de conversion des ions de 100%, le rapport molaire entre les ions Ca²⁺ et Na⁺ doit être de 0,5 (Goujon, 2004). Une solution de CaSO₄ de concentration 2,4 g.L⁻¹ et contenant 0,014 mol de Ca²⁺ a alors été préparée puis ajoutée à l'hydrogel d'alginate de sodium pour former un gel d'alginate de calcium (figure 150). Les deux réactifs ne sont laissés en contact que quelques minutes pour éviter la formation d'une enveloppe dure en surface du gel le rendant plus difficile à étaler. Etant donné la complexité de la mise en forme d'un hydrogel d'alginate de calcium, les gels d'alginate de sodium sont conservés pour la suite de l'étude.

III.4.5 Etude de la répartition des nanorubans à l'intérieur des hydrogels

Pour évaluer le comportement des nanorubans de titanates au sein de l'hydrogel d'alginate, différents modes d'incorporation des nanoparticules ont été testés (figure 151). Pour le premier mode, 50 mL de gel d'alginate de sodium ont été préparés (paragraphe III.4.3). Puis, 10 mg de nanorubans, sous forme de poudre lyophilisée, ont été incorporés progressivement au gel sous forte agitation mécanique (480 tours.min⁻¹). L'ensemble a été laissé sous agitation pendant une durée de 5 minutes pour favoriser l'homogénéité de la distribution des nanoparticules au sein du gel. La quantité de nanorubans introduites est volontairement élevée

pour obtenir un effet visuel permettant d'évaluer la qualité de la répartition des nanoparticules. Pour le deuxième mode d'incorporation, 10 mg de nanorubans ont été mis en suspension dans 50 mL d'eau déionisée par agitation manuelle. 3,5 g de poudre d'alginate de sodium ont ensuite été incorporés progressivement à la suspension sous forte agitation mécanique (480 tours.min⁻¹) puis l'ensemble a été laissé 5 minutes sous agitation. Pour le dernier mode, 10 mg de nanorubans lyophilisés et 3,5 g de poudre d'alginate de sodium ont été mélangés dans un mortier. Le mélange de poudre a ensuite été incorporé progressivement à 50 mL d'eau déionisée sous forte agitation mécanique (480 tours.min⁻¹). L'ensemble a été laissé sous agitation pendant une durée de 5 minutes.

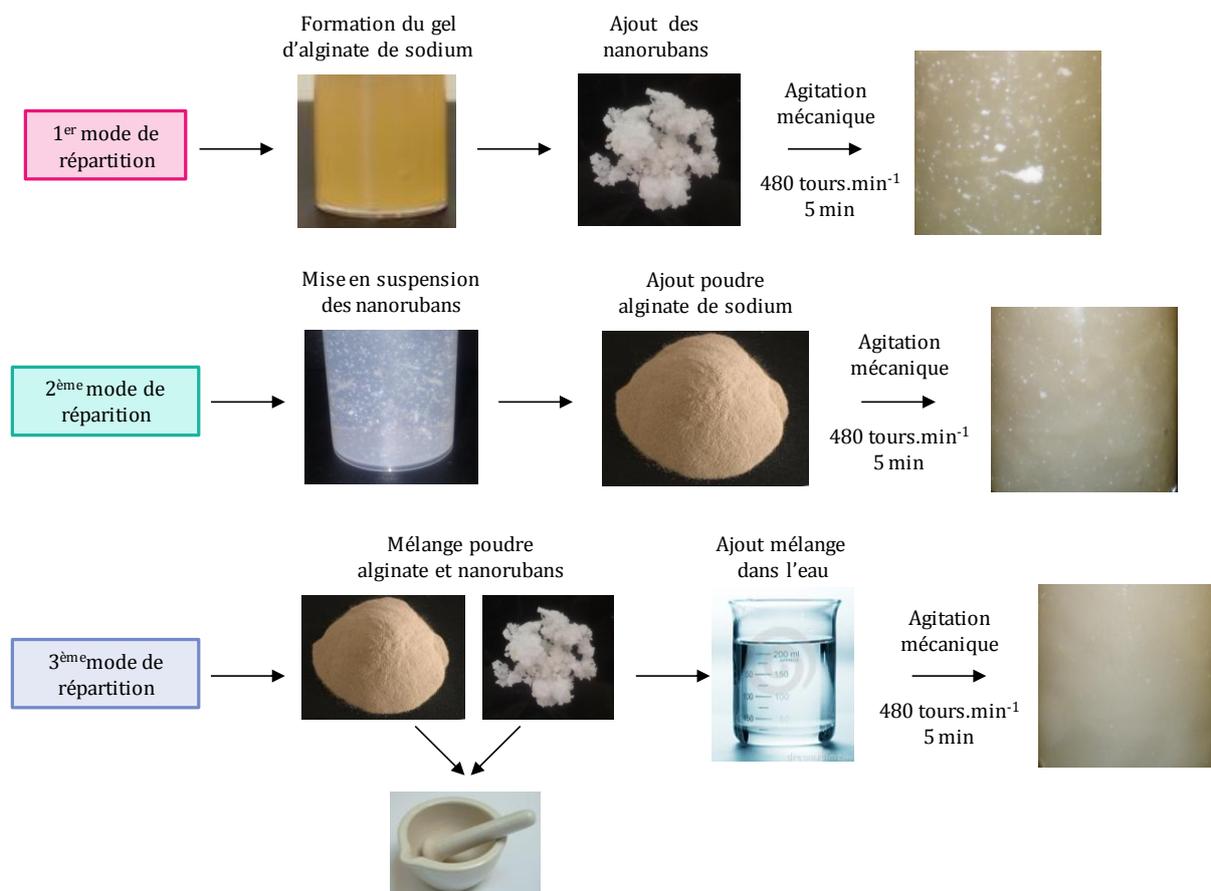


Figure 151 : Schéma expliquant les différents modes de répartition testés pour incorporer des nanorubans de titanates au sein de l'hydrogel d'alginate de sodium.

L'observation des différents gels formés indique que le premier mode d'incorporation conduit à une répartition inhomogène des nanorubans. De plus, ceux-ci se présentent sous la forme d'agglomérats de dimensions variables (figure 151). Le deuxième mode d'incorporation permet quant à lui une distribution plus homogène des nanorubans. La taille des particules est également beaucoup plus uniforme ce qui laisse penser que l'étape de mise en suspension des rubans permet de casser les gros agglomérats (figure 151). Dans le cas du dernier mode d'incorporation, aucune particule n'est visible à l'œil nu. Cela suppose que les nanorubans ont été parfaitement intégrés à la structure du gel et que leur répartition est homogène (figure 151). Ce mode d'incorporation des nanoparticules sera alors conservé pour la suite des travaux. Des études complémentaires devront cependant être réalisées pour valider définitivement ce mode de répartition des nanoparticules au sein du gel et l'appliquer au cas du nouveau nanobiohybride.

III.4.6 Vers la commercialisation des hydrogels d'alginate

Lorsque les hydrogels d'alginate sont conservés au réfrigérateur ($T = 4^{\circ}\text{C}$), une contamination fongique est visible 3 semaines après leur conception (figure 152). Il est alors nécessaire d'augmenter leur pouvoir de conservation. La stérilisation de la poudre ou des gels d'alginate par autoclave, oxyde d'éthylène ou rayons gamma n'est cependant pas réalisable car elle provoque des altérations importantes au sein de la structure du gel (dépolymérisation et perte de viscosité) (Draget 2000).



Figure 152 : Photos de la contamination microbienne des hydrogels d'alginate de sodium au bout de 3 semaines.

Pour favoriser la conservation des gels au cours du temps, il est alors indispensable d'utiliser de l'eau et une verrerie stérile pour leur mise en forme. Il est également envisageable de réaliser une filtration stérilisante ou d'ajouter des conservateurs. Les parabens tels que le parahydroxybenzoate de méthyl ou de propyl sont régulièrement utilisés en cosmétique ou en pharmacologie pour la conservation des produits. Cependant, ils présentent une toxicité non négligeable. Il est alors préférable d'utiliser des sels d'acide benzoïque ou sorbique, de l'alcool benzoïque ou de l'acide déhydroacétique. Ces conservateurs sans paraben se retrouvent dans la composition de produits annoncés « bio » et sont certifiés par l'ANSM (agence nationale de sécurité du médicament).

III.4.7 Effets produits par les hydrogels d'alginate de calcium sur la cicatrisation d'une plaie externe : tests *in vivo*

III.4.7.1 Sans présence de principe actif

Pour évaluer le pouvoir cicatrisant de l'hydrogel d'alginate de sodium, des tests de cicatrisation *in vivo* ont été réalisés sur une population de 10 souris mâles de 30-40 g de modèle SWISS (protocole complet annexe 13). Pour cela, deux plaies dorsales ont été réalisées sur chaque souris à l'aide d'un poinçon de 6 mm permettant d'éliminer l'épiderme, le derme et la couche musculaire sous-dermique appelée *paniculosus carnosus*. Pour favoriser une cicatrisation par ré-épithélialisation en évitant la rétractation des tissus et de la peau, une attèle en silicone (13 mm de diamètre) a été mise en place autour de chaque plaie (figure 153 a et b). De plus, pour éviter tout contact entre les plaies et les souris, des collerettes commerciales ont été placées autour du cou de chaque sujet (figure 153 c).

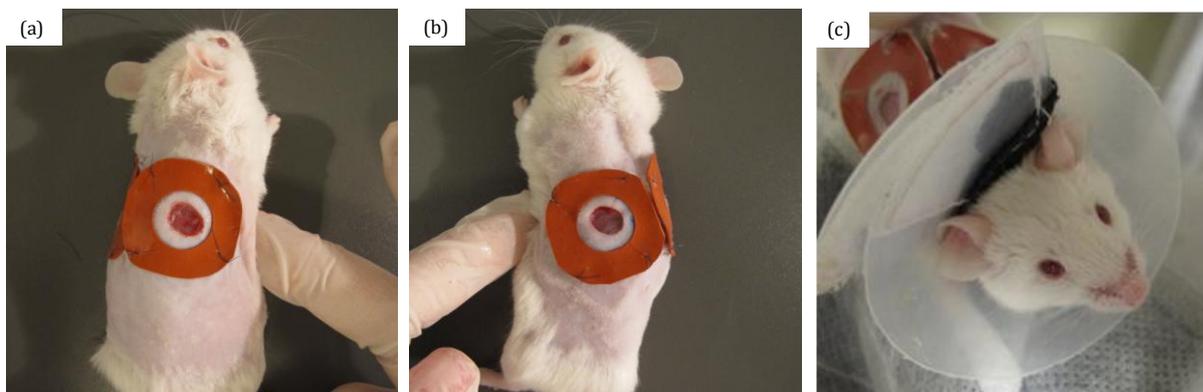


Figure 153 : (a) Photo d'une plaie dorsale droite réalisée sur une souris à l'aide d'un poinçon de 6 mm et protégée par une attèle en silicone. (b) Photo d'une plaie dorsale gauche réalisée sur une souris à l'aide d'un poinçon de 6 mm et protégée par une attèle en silicone. (c) Photo du dispositif de protection de la plaie par une collerette commercial.

Les plaies ont ensuite été recouvertes soit par un hydrogel commercial (Duoderm®), soit par le gel d'alginate de sodium à 7%. Pour servir de témoin, une partie des plaies n'a pas été traitée et une autre partie a été traitée par du PBS ne possédant aucun pouvoir cicatrisant. Le traitement a été renouvelé tous les 3 jours jusqu'à cicatrisation complète et totale des plaies au bout de 17 jours. Pour éviter le dessèchement des gels et pour favoriser la protection contre les contaminants extérieurs, les plaies ont été recouvertes par un pansement commercial non occlusif (Tegaderm®).

Pour évaluer l'effet des différents produits sur le processus de cicatrisation, des photos ont été réalisées à différents temps de traitement (figure 154).

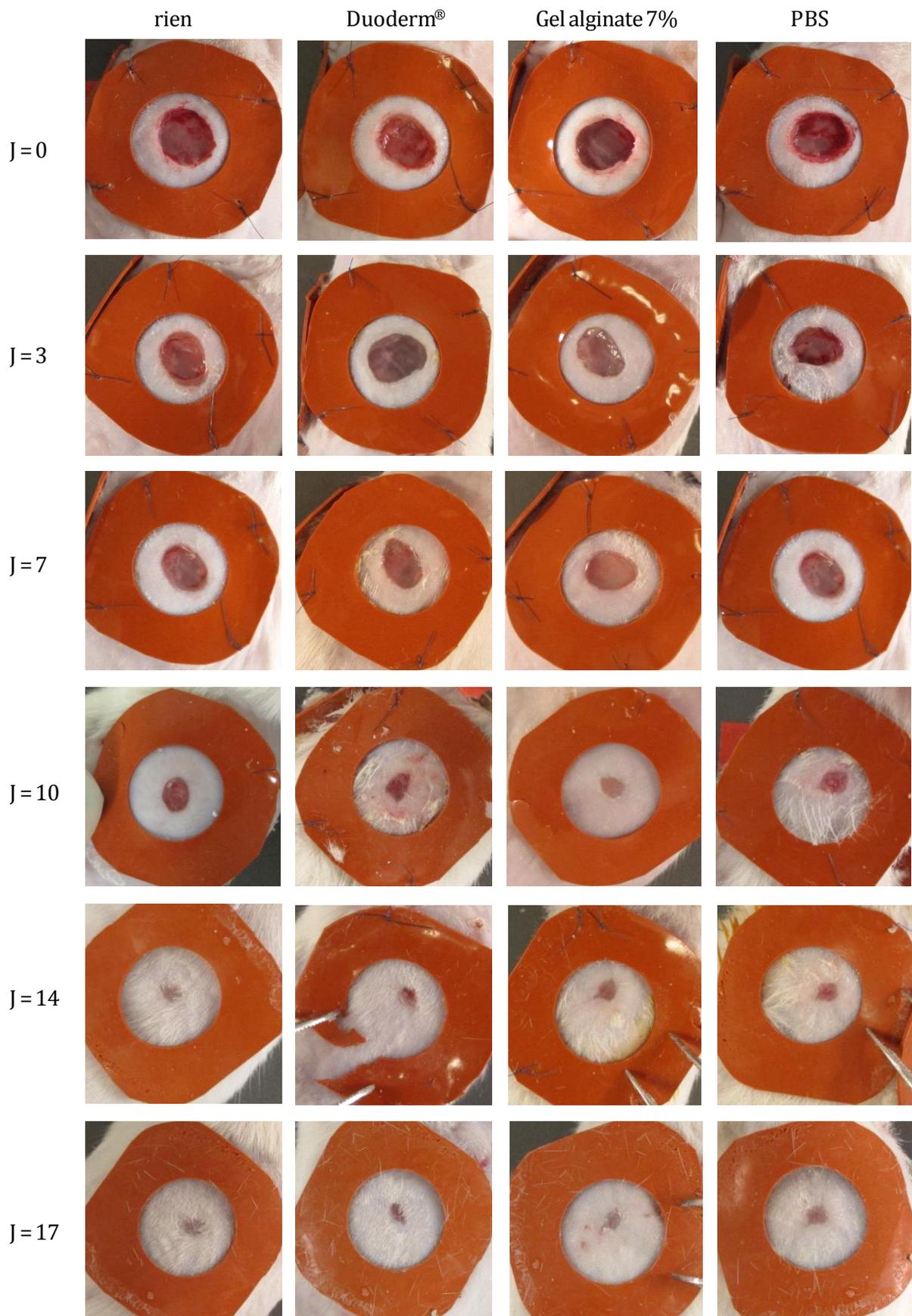


Figure 154 : Photos des plaies dorsales non traitées et traitées avec l'hydrogel commercial, l'hydrogel d'alginate de sodium à 7% et le PBS à différents temps de cicatrisation (J = 0 à 17 jours).

Les observations des zones lésées montrent que pour chaque temps de cicatrisation, les plaies sont identiques quel que soit le traitement appliqué. Aucun écart notable du taux de cicatrisation n'est visible et dans tous les cas, la cicatrisation des plaies est complète au bout de 17 jours. L'hydrogel d'alginate de sodium à 7% ne semble donc pas présenter un pouvoir cicatrisant plus important que les autres produits testés. Il est cependant intéressant de noter que l'application de ce gel n'induit pas de réaction inflammatoire ni d'infection au niveau des plaies.

Pour évaluer avec plus de précisions l'impact des différents produits testés sur la cicatrisation, la taille des plaies a été mesurée. Ces mesures, réalisées à l'aide d'un logiciel de calcul, sont exprimées en pourcentage d'aire par rapport à la surface de la plaie à J = 0 fixée à 100%. Les résultats, exprimés sous forme d'histogramme (figure 155a), indiquent que le meilleur taux de cicatrisation correspond aux plaies traitées avec de l'alginate à 7% et avec le PBS jusqu'à 7 jours de traitement. A ce stade, l'hydrogel d'alginate de sodium est plus efficace que le gel commercial. Cependant, à J = 10, la tendance s'inverse puisque ce sont les plaies traitées avec le gel commercial qui atteignent le meilleur taux de cicatrisation. A partir de J = 14 et jusqu'à J = 17, le taux de cicatrisation des plaies atteint le même niveau quelque soit le traitement appliqué. L'hydrogel d'alginate de sodium, tout comme le gel commercial, ne semble donc pas posséder de pouvoir cicatrisant.

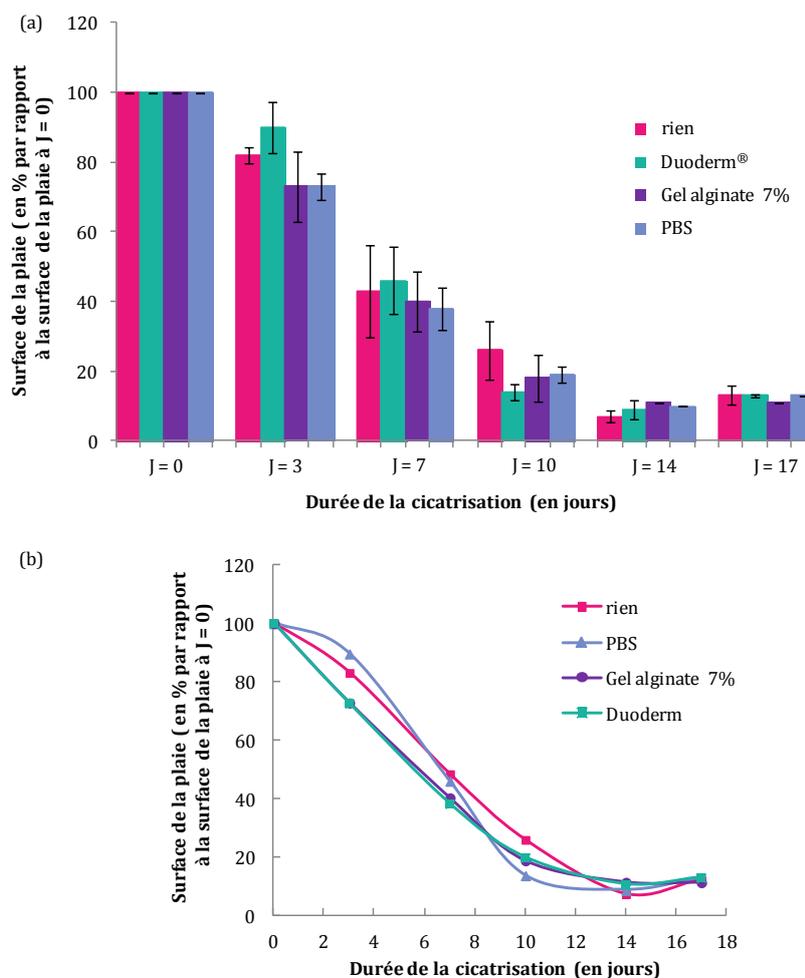


Figure 155 : (a) Histogramme représentant l'évolution de la taille des plaies non traitées et traitées avec un gel commercial, un gel d'alginate de sodium à 7% et du PBS en fonction du temps de cicatrisation. (b) Graphique représentant l'évolution du taux de cicatrisation des plaies non traitées et traitées avec un gel commercial, un gel d'alginate de sodium à 7% et du PBS en fonction du temps de traitement.

Pour représenter l'évolution simultanée du processus de cicatrisation, les mesures de la taille des plaies ont été exprimées sous forme de graphique (figure 155b). Les résultats indiquent que l'évolution du taux de cicatrisation est identique pour les plaies traitées au PBS ou à l'alginate. Il semble donc, à première vue, ne pas y avoir de différence significative de cicatrisation entre les plaies suivant le produit appliqué (annexe 14). Cependant, dans le cas de l'utilisation du gel commercial, l'allure générale du graphe montre que le taux de cicatrisation est faible jusqu'à 3 jours de traitements puis augmente fortement entre 3 et 10 jours de traitement, contrairement aux autres cas qui présentent un taux de cicatrisation plus régulier entre $J = 0$ et $J = 10$.

Les tests *in vivo* réalisés montrent que l'hydrogel d'alginate de sodium à 7% ne possède pas de pouvoir cicatrisant par lui-même. Lors de la formulation du nouveau nanobiohybride, l'hydrogel d'alginate aura alors uniquement un rôle d'excipient. La cicatrisation ne sera favorisée que par le nanobiohybride jouant quant à lui le rôle de principe actif.

III.4.7.2 Avec présence de principe actif : le collagène de type III

Une seconde série de tests *in vivo* a été réalisée pour étudier la diffusion et l'action sur site lésé du collagène de type III contenu dans une matrice de PBS et d'alginate de sodium. Le collagène de type III a été utilisé pour ce test préliminaire mais sera remplacé par la suite par du collagène-like synthétisé par NVH Medicinal. Le protocole appliqué pour ce modèle de cicatrisation est identique à celui utilisé pour le premier test *in vivo* (annexe 13).

Les observations des zones lésées indiquent que pour chaque temps d'observation il n'y a aucune différence notable du taux de cicatrisation des plaies et ce, quel que soit le traitement appliqué (figure 156). De plus, dans tous les cas, la cicatrisation est complète au bout de 17 jours. La présence de collagène au sein des matrices de PBS et d'alginate ne semble donc pas favoriser le processus de cicatrisation.

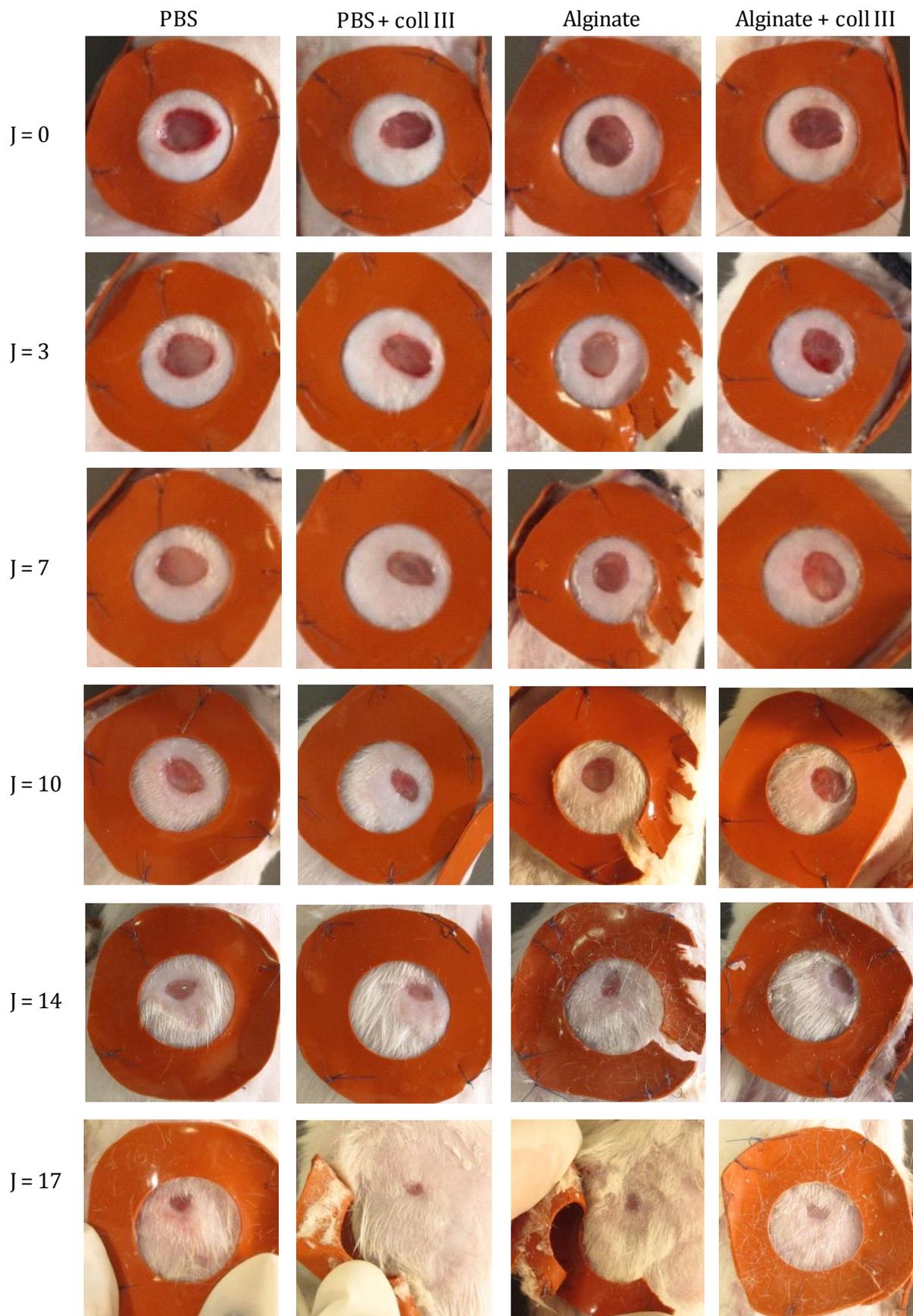


Figure 156 : Photos des plaies dorsales traitées avec du PBS, du PBS contenant 0,05% de collagène de type III, de l'hydrogel d'alginate de sodium à 7% et de l'hydrogel d'alginate de sodium à 7% contenant 0,05% de collagène de type III à différents temps de cicatrisation (J = 0 à 17 jours).

La représentation de la taille des plaies sous forme d'histogramme (figure 157a) et de graphique (figure 157b) montre que les plaies traitées à l'aide de PBS cicatrisent d'une manière générale plus vite que celles traitées à l'aide d'alginate, et cela indépendamment de l'ajout ou non de collagène de type III. A J = 3, J = 7 et J = 10, la cicatrisation la plus lente est observée au niveau des plaies traitées avec de l'alginate alors que la cicatrisation la plus rapide est observée au niveau des plaies traitées avec du PBS. A J = 14 et J = 17, la cicatrisation la plus lente est cette fois-ci observée au niveau des plaies traitées avec l'alginate contenant 0,05% de collagène de type III tandis que la cicatrisation la plus rapide est observée au niveau des plaies traitées au PBS contenant 0,05% de collagène de type III. L'effet de l'ajout de collagène de type III n'est alors visible qu'à partir de 14 jours de traitement. Cela laisse penser que sa présence augmenterait la vitesse de cicatrisation lorsqu'il est appliqué au niveau des plaies par l'intermédiaire du PBS mais de manière surprenante, diminuerait la vitesse de cicatrisation lorsqu'il est appliqué au niveau des plaies par l'intermédiaire de l'alginate. Ce phénomène s'explique par le fait que l'hydrogel d'alginate a tendance à sécher une fois qu'il est appliqué sur la plaie ce qui limiterait le phénomène de diffusion du collagène sur site.

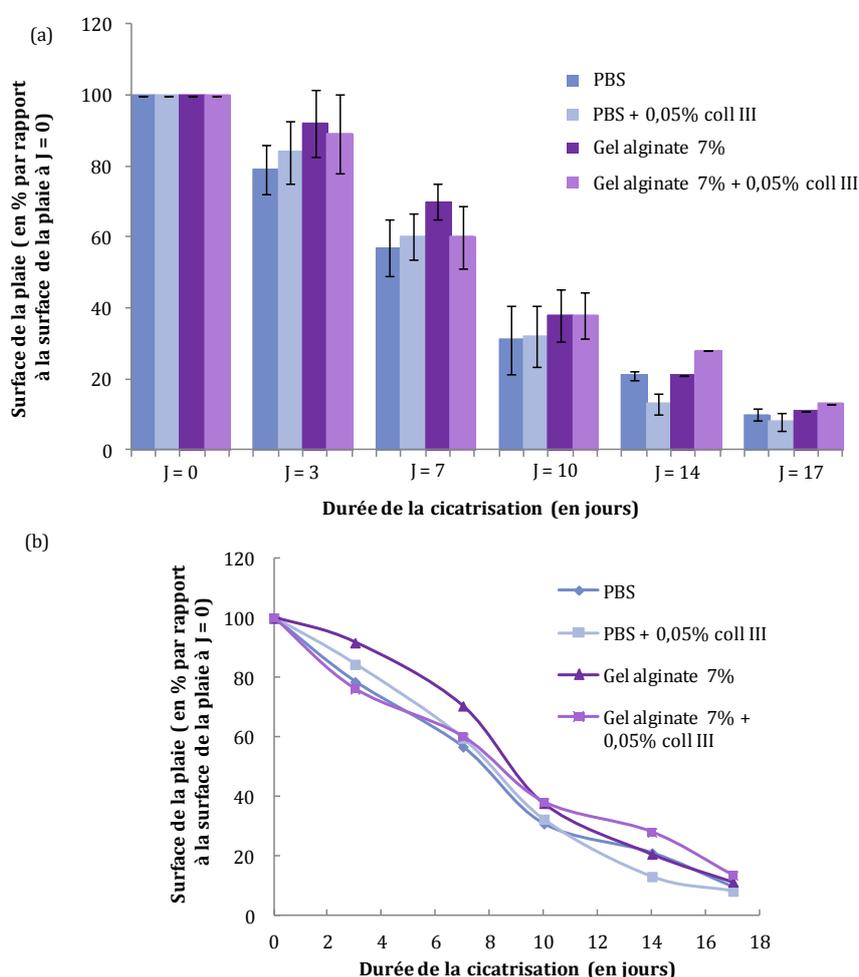


Figure 157 : (a) Histogramme représentant l'évolution de la taille des plaies traitées avec du PBS, du PBS contenant 0,05% de collagène de type III, de l'hydrogel d'alginate de sodium à 7% et de l'hydrogel d'alginate de sodium à 7% contenant 0,05% de collagène de type III en fonction du temps de cicatrisation. (b) Graphique représentant l'évolution du taux de cicatrisation des plaies traitées avec du PBS, du PBS contenant 0,05% de collagène de type III, de l'hydrogel d'alginate de sodium à 7% et de l'hydrogel d'alginate de sodium à 7% contenant 0,05% de collagène de type III en fonction du temps de traitement.

Pour étudier plus précisément l'influence du collagène de type III sur le processus de cicatrisation, des marquages et des colorations immuno-histochimiques ont été réalisés sur les peaux de souris. Quatre marqueurs différents ont été utilisés. Le marqueur cytokératine 6 va permettre de visualiser la fermeture de la plaie par recolonisation de kératinocytes de l'épiderme. Lors de la cicatrisation par ré-épithélialisation, il y a formation d'un tissu de granulation (figure 158). Cela se traduit par une migration au niveau de la zone lésée des fibroblastes du derme et une différenciation en myofibroblastes contractiles (Yildirimer *et al.* 2012). L'utilisation du marqueur actine de muscle lisse va permettre de révéler ce phénomène au niveau de la plaie. Le marqueur CD31 va quant à lui mettre en évidence la formation de nouveaux vaisseaux lors du processus de reconstruction du tissu lésé. Enfin, la prolifération et la différenciation des cellules du derme au niveau de la zone lésée afin de reconstruire le tissu manquant seront révélées par l'utilisation du marqueur Ki67. Seuls les résultats obtenus par les marqueurs cytokératine 6 et actine de muscle lisse seront présentés dans ce chapitre.

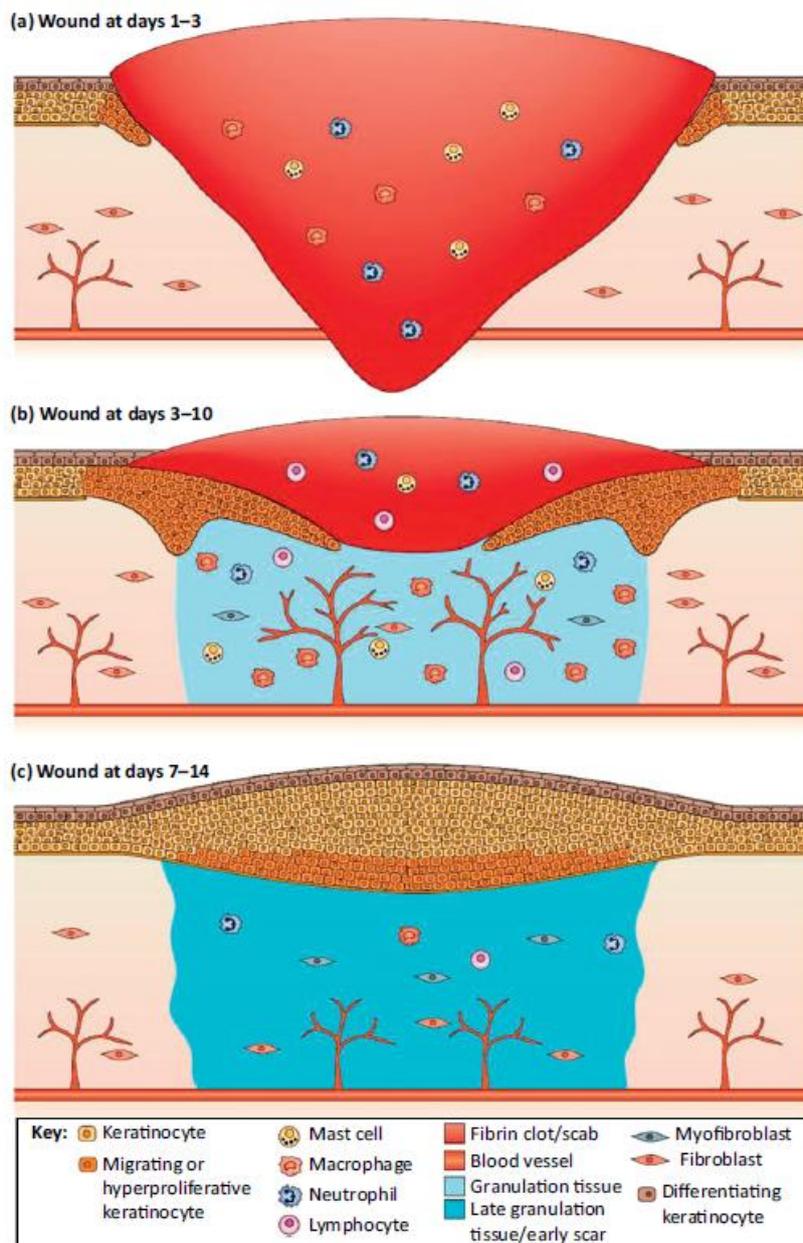


Figure 158 : Schéma représentant le processus normal de cicatrisation d'une plaie par ré-épithélialisation d'après (Yildirimer *et al.* 2012).

Le marquage à la cytokératine 6 indique qu'il n'y a aucun kératinocyte au niveau de la plaie à J = 0, hormis au niveau des follicules pileux, en raison de la repousse des poils (figure 159a). Après 3 jours de cicatrisation, un début de ré-épithélialisation est visible à partir des berges de la plaie (figure 159b). Ce phénomène est homogène pour toutes les souris observées, qu'elles soient traitées à l'alginate ou au PBS et avec ou sans collagène. L'ajout de collagène de type III ne semble donc pas favoriser la migration des kératinocytes de l'épiderme en direction de la plaie.

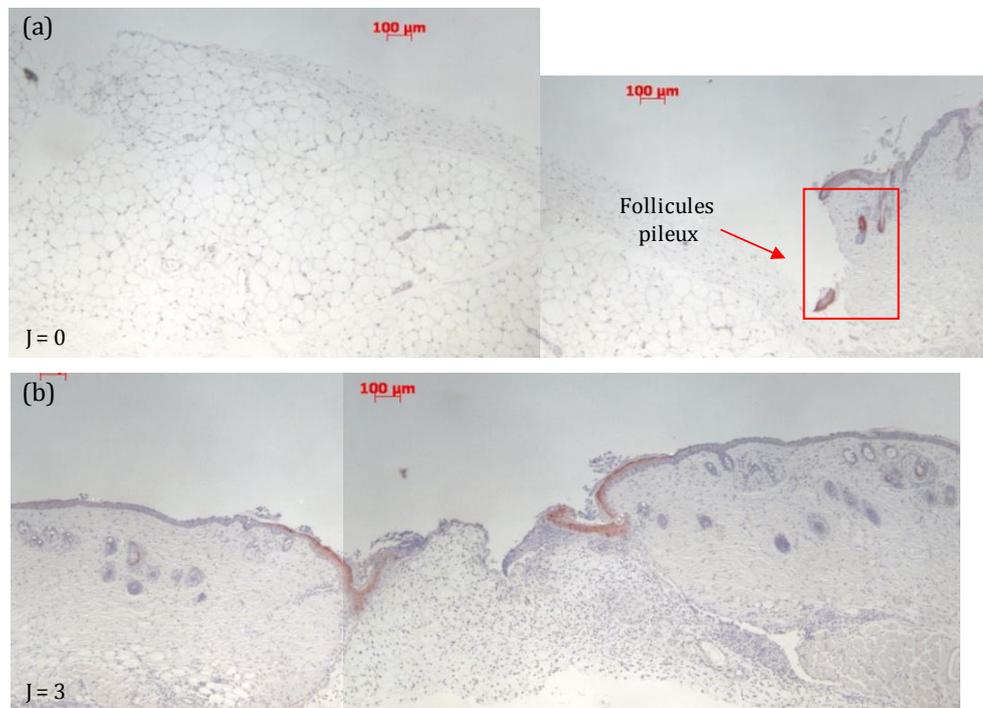


Figure 159 : Photos des observations réalisées au microscope optique des peaux lésées de souris traitées avec un hydrogel d'alginate de sodium contenant 0,05% de collagène de type III et marquées avec de la cytokératine 6 à (a) J = 0 et (b) à J = 3.

Après 10 jours de cicatrisation, la ré-épithélialisation des plaies est complète pour les souris traitées avec du PBS. Il est plus difficile de déterminer le stade de cicatrisation des plaies des souris traitées avec du PBS contenant du collagène de type III. Soit la ré-épithélialisation est complète et peu marquée soit elle est incomplète à cause d'une croûte au niveau des plaies. Le collagène ne semble donc avoir aucun impact à ce stade de la cicatrisation sur la migration des kératinocytes, lorsque celui-ci est ajouté au niveau des plaies à l'aide de PBS. Dans le cas des souris traitées avec le gel d'alginate, la ré-épithélialisation n'est pas complète au niveau des plaies (figure 160a). Cela peut s'expliquer par le fait que l'hydrogel a tendance à sécher ce qui freinerait le phénomène de détersion* et conduirait donc au ralentissement du processus de cicatrisation par ré-épithélialisation au niveau cellulaire. En revanche, pour les plaies traitées avec de l'alginate contenant du collagène l'avancement de la ré-épithélialisation est beaucoup plus prononcée, ce qui laisse supposer un effet de l'ajout du collagène de type III (figure 160b).

*détersion : évacuation des débris nécrotiques et fibrineux par phagocytose et protéolyse au niveau du site lésé. La phase de détersion est une étape fondamentale dans le processus de cicatrisation car elle a pour but de faciliter la croissance du tissu de granulation et d'épidermisation.

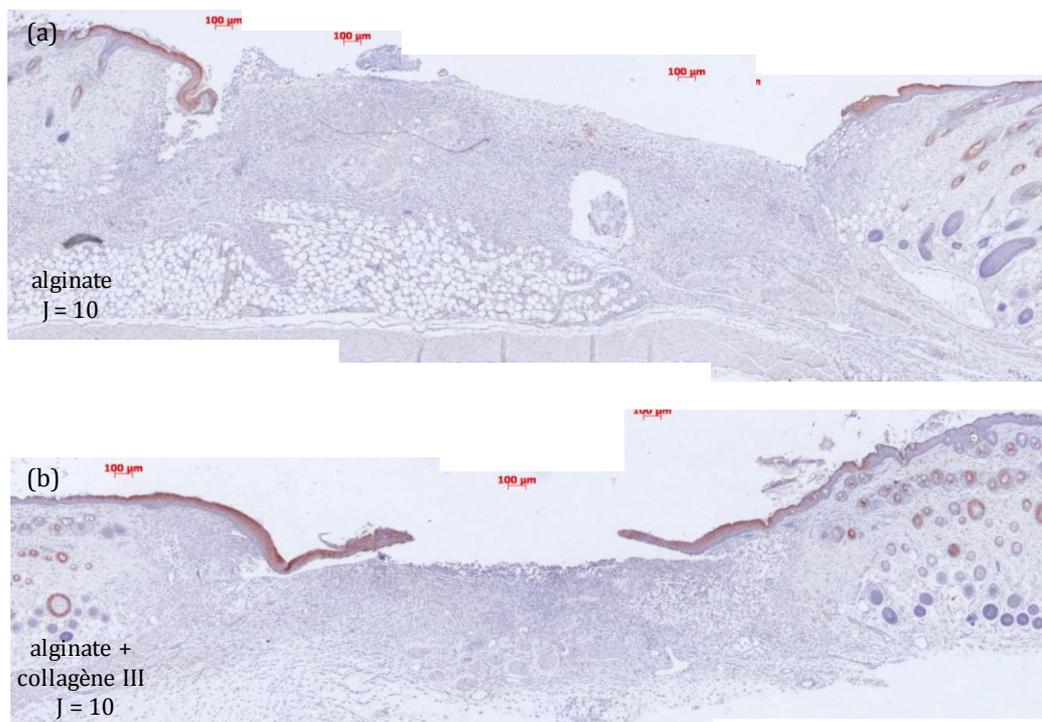


Figure 160 : Photos des observations réalisées au microscope optique des peaux lésées de souris traitées avec (a) un hydrogel d'alginate de sodium et (b) avec un hydrogel d'alginate de sodium contenant 0,05% de collagène de type III et marquées avec de la cytochrome 6 à J = 10.

Après 17 jours de cicatrisation, la ré-épithélialisation est complète quel que soit le mode de traitement de la plaie (figure 161), hormis si l'exsudat fibrino-leucocytaire ne s'est pas totalement détaché de la zone lésée. Les marquages sont plus ou moins importants et plus ou moins intenses selon la vitesse de cicatrisation des plaies. Une plaie qui cicatrise vite présentera au bout de 17 jours un marquage à la cytochrome 6 essentiellement localisé au centre de la plaie avec une couche cornée plus marquée que la couche basale au niveau de l'épiderme nouvellement formé. Une plaie qui cicatrise moins vite présentera, quant à elle, un marquage cytochrome 6 sur toute la longueur de la plaie avec une intensité de marquage homogène sur toute l'épaisseur du nouvel épiderme. L'ajout de collagène de type III à ce stade de la cicatrisation n'a pas d'effet au niveau de la prolifération ou de la migration des kératinocytes.

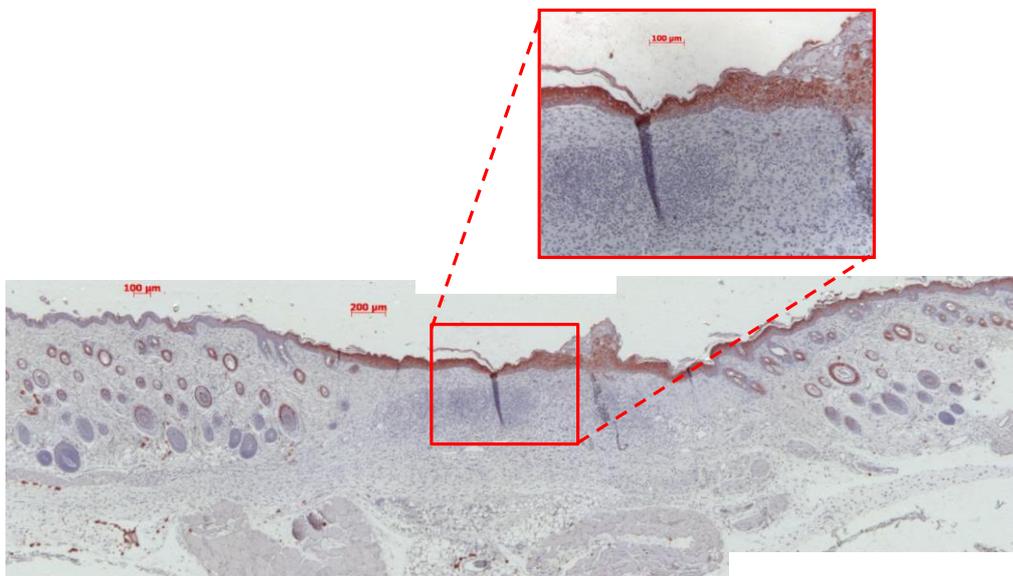


Figure 161 : Photos des observations réalisées au microscope optique des peaux lésées de souris traitées avec un hydrogel d'alginate de sodium contenant 0,05% de collagène de type III et marquées avec de la cytokeratine 6 à J = 17.

Quel que soit le mode de traitement, la cicatrisation des plaies par ré-épithélialisation débute très tôt (2 à 3 jours après l'agression). Les kératinocytes de l'épiderme adjacent vont se multiplier et migrer entre l'exsudat et le tissu de granulation de manière à recouvrir entièrement la plaie. Cette migration est facilitée par le réseau d'intégrines et les collagénases exprimées et sécrétées par les kératinocytes. Par contre, elle est freinée par la mauvaise évacuation des débris nécrotiques et fibrineux. Il est donc essentiel de maintenir un milieu humide au niveau de la plaie de manière à favoriser une bonne détersion et un nettoyage efficace des plaies. Cependant, la ré-épithélialisation semble facilitée lorsque les plaies sont traitées à l'aide de PBS contrairement à l'alginate, qui lui, a tendance à sécher et à se coller sur la plaie. Dans ce cas, le processus de ré-épithélialisation étant retardé, le collagène de type III semble avoir un effet visible au niveau de la prolifération et de la migration des kératinocytes.

Le marquage à l'actine de muscle lisse indique qu'il n'y a pas de migration de myofibroblastes à J = 0, hormis au niveau du muscle profond et des vaisseaux présents dans le tissu sous-cutané, tous deux situés sous la plaie (figure 162a). Après 3 jours de cicatrisation, quel que soit le mode de traitement de la plaie, le tissu de granulation n'est pas encore visible. A ce stade du processus de cicatrisation, l'ajout de collagène ne semble avoir aucun effet sur la ré-épithélialisation des plaies (figure 162b).

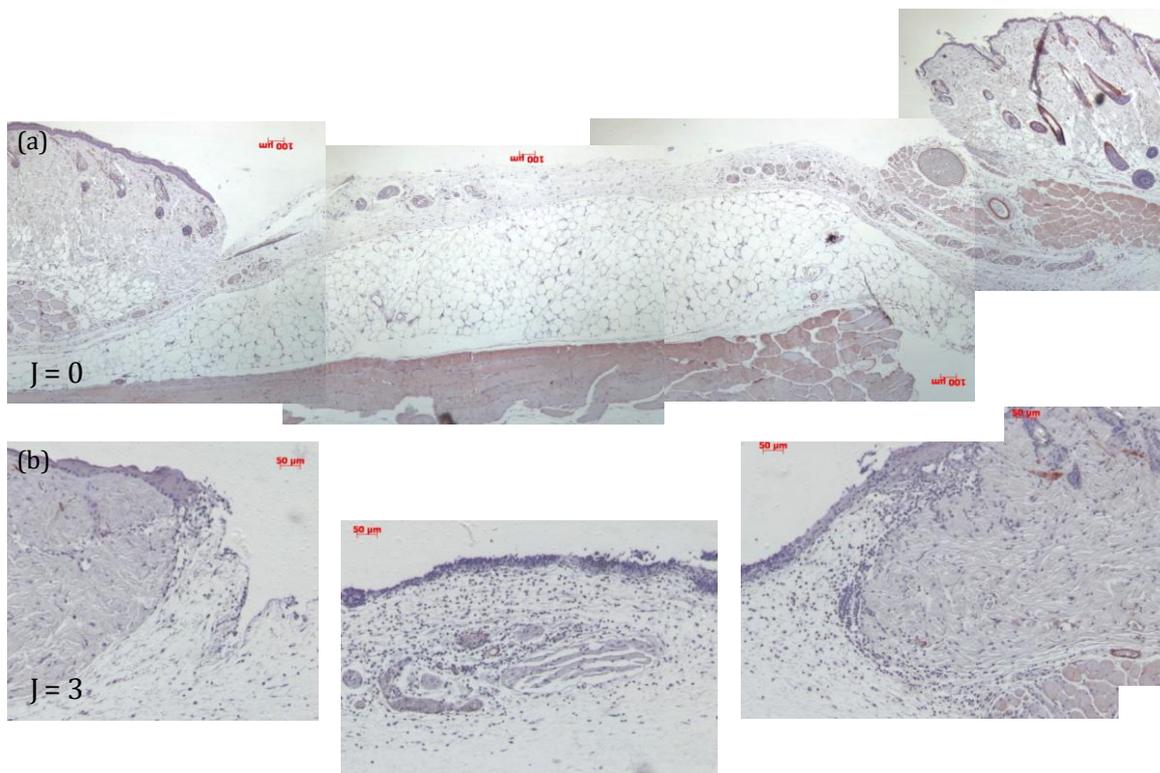


Figure 162 : Photos des observations réalisées au microscope optique des peaux lésées de souris traitées avec un hydrogel d'alginate de sodium contenant 0,05% de collagène de type III et marquées avec de l'actine de muscle lisse à (a) J = 0 et (b) J =3.

Après 10 jours de cicatrisation, dans le cas des souris traitées avec du PBS, un très beau tissu de granulation s'est formé sur les bords, le dessus et le centre des plaies, avec différenciation des fibroblastes en myofibroblastes exprimant l'actine de muscle lisse (figure 163a). Cependant, les résultats étant non reproductibles d'une souris à l'autre en raison de la variabilité inter-individuelle, il est difficile d'évaluer l'effet du collagène de type III sur la cicatrisation. Dans le cas des souris traitées avec de l'alginate, très peu d'actine de muscle lisse est visible au niveau des plaies (figure 163b). Il semble que la présence de l'alginate ralentirait la formation du tissu de granulation certainement à cause de la persistance de l'exsudat inflammatoire. De plus, malgré un traitement identique, les marquages ne sont pas homogènes d'une souris à l'autre en termes de quantité d'actine sm. L'effet de l'ajout du collagène de type III sur le processus de cicatrisation n'est une fois de plus pas évident à démontrer.

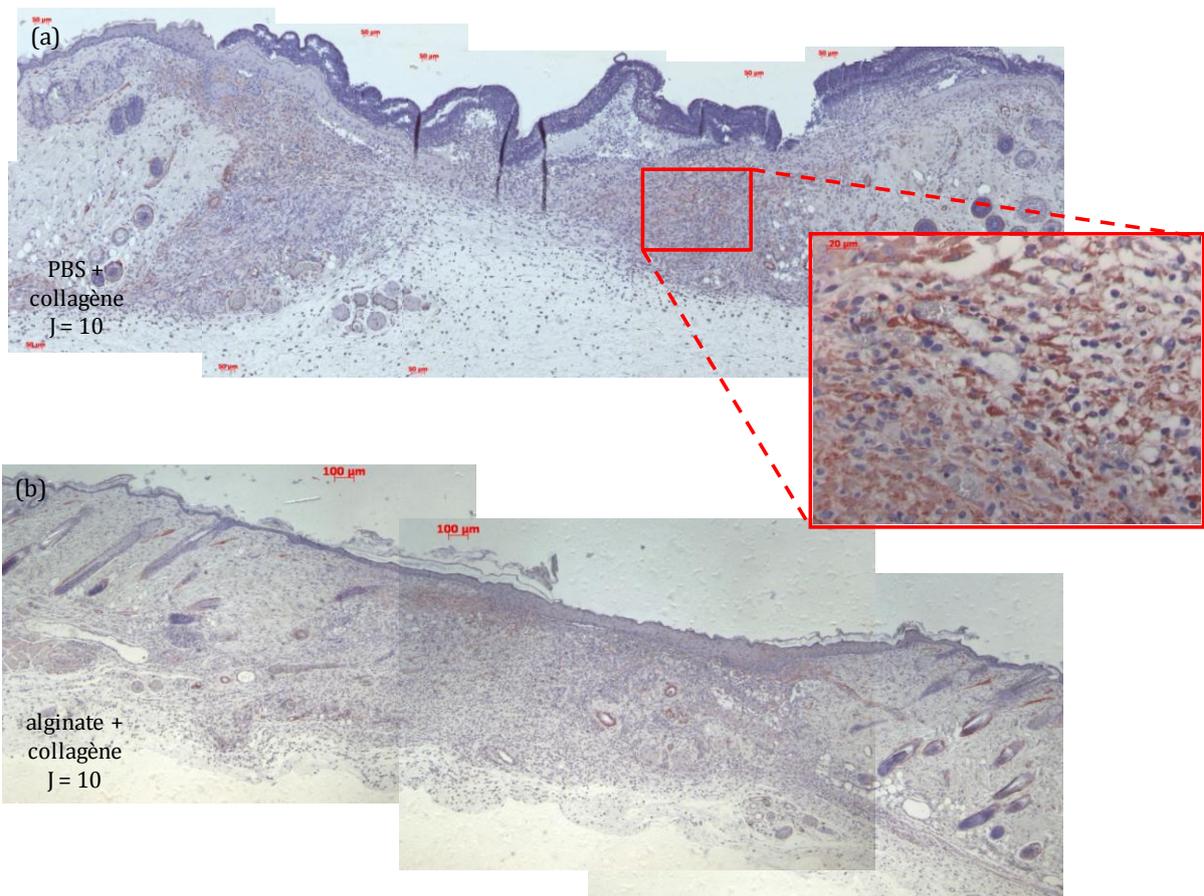


Figure 163 : Photos des observations réalisées au microscope optique des peaux lésées de souris traitées avec (a) du PBS contenant 0,05% de collagène de type III et (b) de l'alginate contenant 0,05% de collagène de type III et marquées avec de l'actine de muscle lisse à J = 10.

Au bout de 17 jours de cicatrisation, l'actine de muscle lisse est beaucoup moins présente au niveau des plaies en termes de quantité qu'à J = 10 et cela quelque soit le mode traitement utilisé (figure 164). Cependant, elle est répartie de manière plus régulière sur toute la surface de la plaie. Comme précédemment, les résultats ne sont pas reproductibles d'une souris à l'autre. A ce stade, l'effet du collagène sur la cicatrisation n'est pas clairement démontré et il est difficile de déterminer la matrice la plus efficace pour la formulation et l'application du collagène.

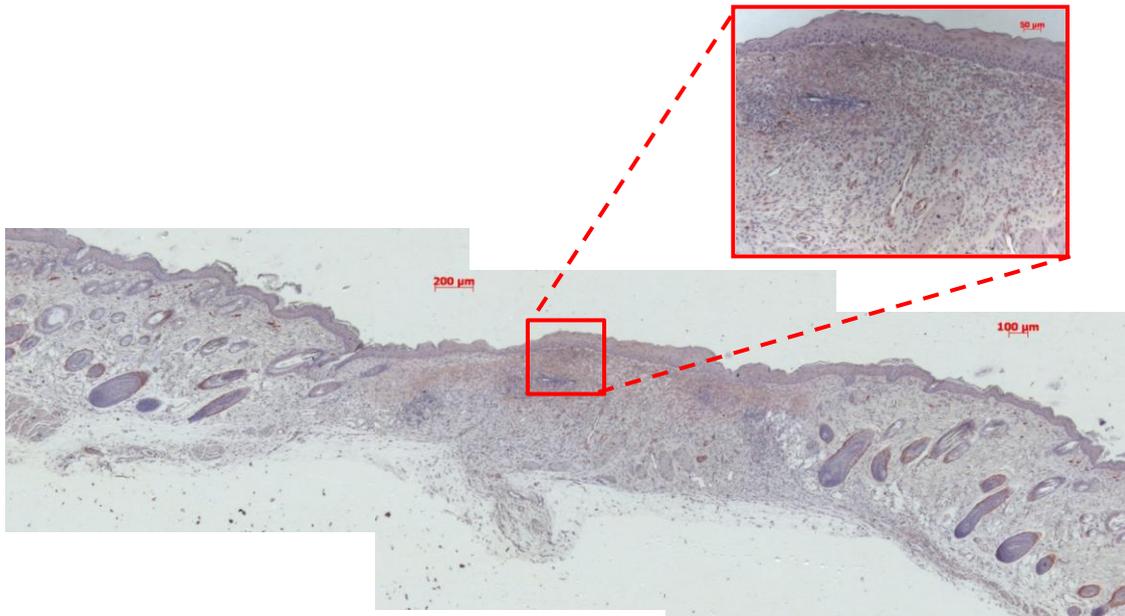


Figure 164 : Photos des observations réalisées au microscope optique des peaux lésées de souris traitées avec un hydrogel d'alginate de sodium contenant 0,05% de collagène de type III et marquées avec de l'actine de muscle lisse à J = 17

Dans ce modèle de cicatrisation, la formation d'un tissu de granulation dans lequel les fibroblastes se différencient en myofibroblastes exprimant de l'actine de muscle lisse et sécrétant du collagène est mise en évidence. La formation du tissu de granulation semble facilitée lorsque les plaies sont traitées à l'aide de PBS. Le rôle du collagène de type III au niveau de la prolifération des myofibroblastes est difficile à préciser car les résultats obtenus ne sont pas homogènes d'une souris à l'autre, certainement en raison de la variabilité inter-individuelle. De manière générale, il ne semble pas y avoir de différence de cicatrisation entre les plaies supplémentées ou non en collagène de type III, PBS et alginate confondus. Cela peut s'expliquer par le fait que la quantité de collagène utilisée est trop faible pour permettre d'améliorer le processus de cicatrisation. Il est également probable que le PBS et l'alginate ne soient pas des matrices adaptées pour le dépôt de molécules. Le PBS serait trop liquide pour maintenir le collagène sur site et permettre son action tandis que l'alginate séchant trop vite ne permettrait pas au collagène de type III d'aller sur site et d'exercer son action vis-à-vis du processus de cicatrisation. Enfin, la dernière possibilité est que pour ces modèles *in vivo*, des souris « saines » ne présentant aucun problème de cicatrisation ont été utilisées. Le collagène de type III ne peut alors pas avoir d'effet et améliorer un processus non défaillant (Tsuboi *et al.* 1990, Marrotte *et al.* 2010). Pour obtenir des résultats plus significatifs, les prochains tests de cicatrisation *in vivo* se feront sur des modèles de souris pathologiques (souris db/db) qui présentent un retard de cicatrisation du fait de leur diabète.

Les résultats de ces tests *in vivo* montrent également qu'un hydrogel d'alginate ne semble pas une forme galénique appropriée pour formuler le nouveau nanobiohybride. En effet, une fois appliqué sur la zone lésée, le gel a tendance à sécher ce qui freinerait le phénomène de détersion et conduirait donc au ralentissement du processus de cicatrisation par ré-épithélialisation au niveau cellulaire. Cela empêcherait également la diffusion d'un principe actif sur site. Pour limiter ces phénomènes, la forme galénique hydrogel devra être associée à un film imperméable pour éviter la déshydratation et le dessèchement. Par ailleurs, il semblerait que la présence d'alginate engendre malheureusement la persistance d'exsudats fibrino-leucocytaires

qui ralentirait la formation du tissu de granulation (figure 165). Une autre forme galénique devra être envisagée pour formuler le nouveau nanobiohybride.

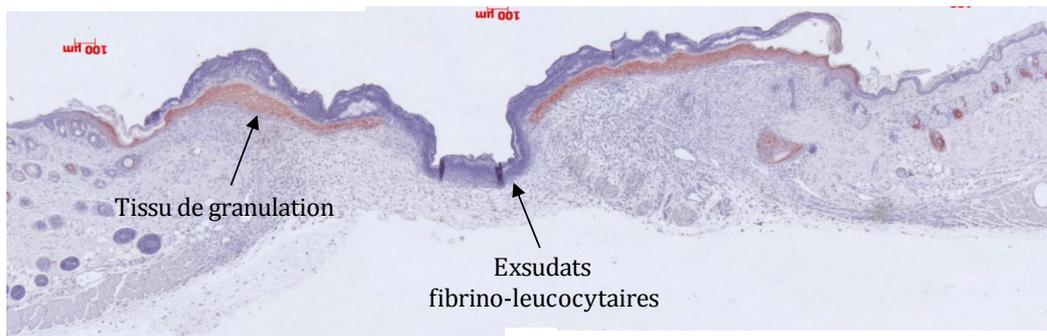


Figure 165 : Photo illustrant le ralentissement de la formation du tissu de granulation induit par la persistance d'exsudats fibrino-leucocytaires dans le cas des souris traitées avec un hydrogel d'alginate de sodium contenant 0,05% de collagène de type III à J = 10.

III.5 Conclusion

Les travaux réalisés dans ce troisième chapitre se divisent en trois grands axes.

La première partie, consacrée à une étude bibliographique approfondie des différents agents hémostatiques et cicatrisants utilisés au bloc opératoire, a permis de montrer les limitations de ces produits commerciaux et de mettre en avant les nombreuses attentes dans le domaine de la régénération et de l'ingénierie tissulaire. Cette étude s'est également étendue aux nouveaux produits à base de nanofibres destinés à la nanomédecine. Leurs remarquables propriétés en font des agents idéaux pour favoriser le processus de cicatrisation et de régénération des tissus lésés.

La deuxième partie de ce travail a été dédiée à l'évaluation des propriétés biologiques des nanorubans de titanates. Leur toxicité et leur pouvoir agrégeant ont notamment été déterminés.

- D'après les tests MTT réalisés sur deux populations de cellules (fibroblastes et cardiomyocytes), les nanorubans ne présentent aucune toxicité pour des concentrations inférieures à 2 mg.mL^{-1} . A plus forte dose (jusqu'à 70 mg.mL^{-1}), la viabilité cellulaire n'est plus que de 80%. Cependant, des tests de forme visant à comparer les rubans et les tubes, ont montrés que les nanorubans présentent une toxicité beaucoup moins importante que les nanotubes car ils ne sont pas internalisés par les cellules.
- Les tests d'agrégation plaquettaire ont quant à eux révélés la passivité des nanorubans de titanates face au processus d'agrégation. A faibles concentrations, ils ne semblent pas interagir avec les plaquettes sanguines ni perturber leur agrégation même quand celle-ci est déclenchée par un agoniste des récepteurs plaquettaires P_2Y_{12} .

Enfin, la dernière partie a été consacrée à la formulation galénique des nanorubans de titanates. Notre choix s'est porté sur les hydrogels d'alginate de sodium et de calcium. Après avoir optimisé leur synthèse et avoir étudié la répartition des nanorubans au sein de ces gels, des tests *in vivo* ont été réalisés. La première série de test a permis de montrer que les gels d'alginate ne possèdent aucun pouvoir cicatrisant lorsqu'ils sont utilisés seuls. La deuxième série de tests, réalisée avec des hydrogels d'alginate contenant du collagène de type III comme principe actif, a montré que les hydrogels ne sont pas une forme galénique appropriée pour la formulation du nouveau nanobiohybride. Leur tendance à sécher lorsqu'ils sont sur sites empêcherait la libération du principe actif et ralentirait le phénomène de déterision responsable de la cicatrisation par ré-épithélialisation. Cette formulation nécessite donc d'être améliorée ou remplacée par une autre forme galénique.

Conclusion générale

Ce travail de thèse avait pour objectif final la conception et l'ingénierie d'un nouveau nanobiohybride permettant de favoriser les processus de cicatrisation et de régénération des tissus lésés. L'élaboration de ce nouvel agent destiné à la nanomédecine s'est divisée en plusieurs parties.

La première étape de ce travail consistait à synthétiser des nanorubans de titanates constituant de base du nouveau nanobiohybride. Le mode de synthèse choisi a été le traitement hydrothermal en milieu fortement basique. Les différentes études réalisées ont montré qu'il est nécessaire de maîtriser les différents paramètres de synthèse pour avoir un contrôle sur les caractéristiques morphologiques, structurales et chimiques des nanorubans. Pour ce faire, deux réactifs ont été utilisés pour obtenir des nanorubans de titanates de composition proche de $\text{Na}_y\text{H}_{2-y}\text{Ti}_n\text{O}_{2n+1} \cdot x\text{H}_2\text{O}$ et présentant des dimensions homogènes : largeur comprise entre 100 et 200 nm, longueur de plusieurs dizaines de micromètres et épaisseur variant de 3 à 40 nm. Ces réactifs, un précurseur de TiO_2 commercial de type P25 de taille de grains avoisinant les 25 nm et une solution de soude de concentration 10 mol.L^{-1} , ont subi un traitement hydrothermal de 20h, à une température de 180°C , une pression autogène de 7 bar, ceci sous une agitation mécanique de $150 \text{ tours.min}^{-1}$. Avant le traitement hydrothermal de ces deux réactifs, il a été montré qu'une étape de traitement aux ultrasons est essentielle pour l'obtention de nanorubans de dimensions homogènes. En revanche, des étapes de refroidissement brutal et de lavage acide du précipité en sortie de synthèse ne sont pas recommandées car elles perturbent la structure et la composition chimique des nanorubans avec notamment l'apparition d'un nouvel état cristallin ou la formation d'une surstructure. Un mécanisme de formation des nanorubans a également été proposé pour expliquer les variations morphologiques qui ont lieu au cours du traitement hydrothermal et notamment le passage de « tubes » à « rubans ». De plus, une caractérisation approfondie des nanorubans a permis de déterminer pour la première fois leur épaisseur et leur organisation particulière. Les différentes techniques de microscopie électronique développées comme la reconstruction 3D, la tomographie ou bien encore la spectroscopie des pertes d'énergie (EELS) ont montré que l'épaisseur des nanorubans, dimension encore jamais étudiée dans la littérature, est comprise entre 3 et 40 nm. Ces nanorubans élémentaires s'assemblent entre eux pour former une super-structure. Enfin, les nanorubans de titanates étant destinés à être commercialisés dans le domaine biomédical, la reproductibilité de leur synthèse a été prouvée et leur pureté a été augmentée par élimination de sous-produits non désirés. La synthèse des nanorubans de titanates par traitement hydrothermal est ainsi maîtrisée, optimisée, reproductible et le produit pur à 99%. La caractérisation fine des nanorubans a quant à elle permis d'avoir une connaissance approfondie de leur morphologie et de leur structure.

La deuxième étape de ce travail de thèse consistait à synthétiser un polymère hétérobifonctionnel. Plusieurs approches et plusieurs fonctions ont été envisagées, notre choix s'est au final porté sur le Si-PEG₅₀₀₀-Mal. Cette synthèse a été réalisée au laboratoire à partir d'un polymère commercial : le HO-PEG-NH₂. Dans un premier temps, le groupement maléimide a été greffé sur l'extrémité amine du PEG par l'intermédiaire de l'ester activé succinimido-4-maléimido benzoate et en présence de dichlorométhane. Les réactifs nécessaires à la synthèse du HO-PEG-Mal ainsi que les différents paramètres de greffage ont été préalablement optimisés.

La réaction s'est déroulée pendant une durée de 16h, à une température de 20°C, sous agitation mécanique de 700 tours.min⁻¹ et avec une proportion molaire de réactifs de 5 : 1 par rapport au PEG. Une fois synthétisé, le polymère a été purifié par une étape de chromatographie flash nécessaire à l'élimination de l'ester activé n'ayant pas réagi et du N-hydroxysuccinimide formé lors de la réaction. Après purification, le niveau de pureté du HO-PEG-Mal, initialement de 70%, a été augmenté à 90%. Un groupement silane a ensuite été greffé sur l'extrémité hydroxyle du HO-PEG-Mal. Des essais préliminaires de silanisation du mPEG₅₀₀₀ ont été réalisés pour déterminer les conditions appropriées au greffage du groupement Si. La silanisation a été réalisée par l'intermédiaire l'alkoxysilane 3-isocyanato propyltriéthoxysilane et en présence de dichlorométhane. Les conditions de greffage ont été un temps de réaction de 5 jours, une température de réaction de 20°C, une proportion molaire de réactif de 5 : 1 par rapport au PEG, une agitation magnétique de 700 tours.min⁻¹ et une atmosphère inerte. A ce stade, le Si-PEG-mal synthétisé a atteint une pureté de 80%. Les techniques spectroscopiques IR et RMN ¹H ont été mises en œuvre pour appréhender les rendements de ces réactions et la pureté des produits.

La troisième étape de ce travail était la fonctionnalisation des nanorubans de titanates par le Si-PEG-Mal. Cette étape correspond à la première phase de l'ingénierie du nouveau nanobiohybride. La fonctionnalisation des nanorubans a été réalisée par un mélange de polymères contenant 5% de Si-PEG-Mal et 95% de mPEG-Si. Le PEG hétérobifonctionnel a pour mission le greffage ciblé de protéines par l'intermédiaire du groupement maléimide qui présente une forte affinité avec les cystéines contenues dans la séquence d'acides aminés de nombreuses protéines, alors que le PEG monofonctionnel est utilisé pour limiter les adsorptions aspécifiques en surface des rubans. Un temps de réaction de 48h, une température de 20°C, un grand volume de dichlorométhane (typiquement 100 mL pour 10 mg de nanorubans), une agitation magnétique de 150 tours.min⁻¹ et une atmosphère inerte ont été nécessaires au greffage du mélange de polymère en surface des nanorubans de titanates. Lorsque la fonctionnalisation s'est déroulée dans des proportions massiques de polymères de 3 : 1 par rapport aux nanorubans, la densité de greffage en surface des rubans a atteint une valeur de 1,1 chaînes du mPEG-Si et 0,1 chaîne de Si-PEG-Mal par nm² de nanorubans. La fonctionnalisation des nanorubans de titanates a également été réalisée par un Si-PEG-Mal commercial dans le but de comparer la réactivité des polymères en fonction de leur provenance. Les premiers résultats de cette étude sont encourageants puisqu'il semblerait que le PEG synthétisé au laboratoire présenterait une meilleure stabilité vis-à-vis du phénomène d'hydrolyse. Enfin, pour valider le concept d'association de ce nouveau nanobiohybride à toutes sortes de molécules biologiques, les nanorubans de titanates ont également été fonctionnalisés par un autre PEG hétérobifonctionnel commercial : le Si-PEG-NHS. En effet, le groupement NHS présente une forte affinité avec les lysines qui, comme les cystéines, sont présentes dans la séquence d'acides aminés de nombreuses protéines.

La quatrième étape de ce travail consistait à greffer de manière ciblée des protéines en surface des nanorubans fonctionnalisés. Cette étape correspond à la deuxième phase de l'ingénierie du nouveau nanobiohybride. Les premiers essais de greffage ciblé ont été réalisés uniquement avec les nanorubans fonctionnalisés par le Si-PEG-Mal synthétisé au laboratoire. Deux peptides (avec et sans cystéine) et un tripeptide mimant la partie C-terminal du collagène-like synthétisé par NVH Medicinal ont été testés. Dans un premier temps, ces peptides ont été réduits en présence de TCEP pour rendre les cystéines accessibles et réactives par clivage des ponts disulfures. Les nanorubans de titanates ont quant à eux été passivés avec de la BSA à 3% pour limiter tout greffage aspécifique avant d'être incubés en présence des peptides pendant une durée de 30 minutes, à une température de 20°C et sur une table vibrante (600

secousses.min⁻¹). Les peptides ont été introduits en large excès avec un rapport molaire par rapport aux groupements maléimide de 5 : 1. Les résultats du test d'Ellman, permettant le dosage des cystéines contenues dans le surnageant après l'étape d'incubation, ont montrés que le greffage spécifiques des peptides par l'intermédiaire du couplage Mal/Cys n'est pour le moment pas observé puisque la quasi-totalité des peptides ont été greffés en surface des nanorubans traduisant un phénomène d'adsorption non-spécifique. Le quatrième objectif de ce travail de thèse n'a donc, pour le moment, pas été atteint.

La cinquième étape de ce travail reposait sur la formulation du nanobiohybride. La forme galénique choisie a été l'hydrogel d'alginate de sodium. La formation de ce gel a été réalisée au laboratoire par dissolution progressive de la poudre d'alginate de sodium dans de l'eau déionisée à une température de 20°C et sous agitation mécanique vigoureuse de 480 tours.min⁻¹. Le gel a ensuite été agité pendant une durée de 30 minutes pour assurer une dissolution complète de l'alginate et la formation d'un gel homogène. Pour que l'hydrogel présente des propriétés rhéologiques proches des celles des hydrogels commerciaux, une concentration de 7% (m/v) a été choisie. Après avoir été synthétisé, la répartition des nanorubans de titanates à l'intérieur du gel a été étudiée. Le meilleur mode d'incorporation des nanoparticules au sein du gel consiste à mélanger les nanorubans lyophilisés et la poudre d'alginate de sodium dans un mortier avant de les incorporer progressivement dans l'eau déionisée sous forte agitation mécanique de 480 tours.min⁻¹. De cette manière, les nanorubans sont parfaitement intégrés à la structure du gel et leur répartition est homogène. Enfin, pour évaluer le pouvoir cicatrisant du gel d'alginate de sodium, une première série de tests *in vivo* a été réalisée sur une population de souris SWISS. Les résultats ont montrés que le gel ne possède aucun pouvoir cicatrisant. Il n'aura alors qu'un rôle d'excipient, ce qui était le prérequis souhaité. Une deuxième série de tests, réalisée avec des hydrogels d'alginate de sodium contenant du collagène de type III comme principe actif, a montré que les hydrogels ne sont pas une forme galénique appropriée pour la formulation du nouveau nanobiohybride. Leur tendance à sécher lorsqu'ils sont sur site freinerait le phénomène de déterSION et conduirait au ralentissement du processus de cicatrisation par ré-épithélialisation au niveau cellulaire. De plus, il semblerait que la présence d'alginate engendre malheureusement la présence d'exsudats inflammatoires qui ralentiraient la formation du tissu de granulation. Enfin, la déshydratation du gel une fois appliqué sur la plaie réduirait la taille de ces porosités et empêcherait la libération du principe actif sur site.

La dernière étape de ce travail de thèse a été d'évaluer le couple potentiel/risque biologique des différents composants constituant le nouveau nanobiohybride par des tests de toxicité et d'agrégation plaquettaire. A ce jour, seuls les nanorubans de titanates ont été testés. D'après les tests MTT réalisés sur des fibroblastes et des cardiomyocytes de rats nouveau-nés, les nanorubans ne présentent aucune toxicité pour des concentrations inférieures à 2 mg.mL⁻¹ et ce, quelle que soit la dose de nanoparticules appliquées (1 à 3 doses). En revanche, à plus forte concentration (jusqu'à 70 mg.mL⁻¹), la viabilité cellulaire n'est plus que de 80%. De plus, des tests de forme ont été réalisés sur des fibroblastes dans le but de montrer l'influence de la morphologie des nanoparticules sur la toxicité. Pour ce test, la toxicité des nanorubans de titanates a été comparée à celle des nanotubes. Les résultats ont montrés que les nanorubans présentent une toxicité beaucoup moins importante car contrairement aux nanotubes, ils ne sont pas internalisés par les cellules. Les tests d'agrégation plaquettaire, réalisés sur du plasma riche en plaquettes d'un donneur volontaire, ont quant à eux révélé la passivité des nanorubans de titanates face au processus d'agrégation à faibles concentrations. En effet, lorsque la concentration est comprise entre 1 et 100 µg.mL⁻¹, ils ne semblent pas interagir avec les plaquettes sanguines ni perturber leur agrégation même quand celle-ci est déclenchée par un

agoniste des récepteurs plaquettaires P_2Y_{12} . En revanche, pour une concentration plus élevée de $250 \mu\text{g.mL}^{-1}$, le processus d'agrégation plaquettaire est freiné par la présence des nanorubans puisque le taux d'agrégats est divisé par deux par rapport au contrôle. Pour éviter toute interférence lors du processus d'agrégation des plaquettes, une concentration maximum de nanorubans de $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ est alors recommandée.

Perspectives

Le nanobiohybride développé dans cette thèse est constitué de trois composants différents. Les deux premiers, les nanorubans de titanates et le polymère hétérobifonctionnel Si-PEG-Mal, ont été synthétisés avec succès au laboratoire durant ce travail. Cependant, certains points méritent d'être améliorés et approfondis.

Au niveau des nanorubans de titanates, il serait intéressant de réaliser des analyses complémentaires pour avoir une connaissance parfaite de leurs caractéristiques structurales et chimiques. Il serait alors nécessaire d'effectuer des analyses DRX approfondies ainsi qu'une étude en spectroscopie Raman des effets isotopiques des différents atomes constituant les nanorubans. La différence de masse atomique entre les isotopes crée un décalage de la position des pics ce qui permet de les identifier et de déterminer la structure de l'échantillon analysé (Hase *et al.* 1979). En ce qui concerne leur morphologie, des mesures supplémentaires de leur épaisseur devront être réalisées sur un panel de 100 rubans pour être statistiquement plus représentatifs. Il serait notamment judicieux de déployer les différentes techniques de détermination de l'épaisseur (tilt et mesure de projection, tomographie et reconstruction 3D et EELS) sur les mêmes rubans pour obtenir une analyse plus précise. Enfin, le mécanisme de formation des nanorubans de titanates par traitement hydrothermal proposé n'est qu'une ébauche. Il serait alors nécessaire de le compléter et de valider certaines étapes supputées par des synthèses et des caractérisations supplémentaires.

En ce qui concerne le Si-PEG-Mal, sa synthèse se fait à partir d'un autre PEG hétérobifonctionnel commercial. Dans le but d'être indépendant d'un fournisseur et pour avoir une connaissance parfaite des sous produits de synthèses et des impuretés, il serait judicieux de réaliser également la synthèse de ce polymère de départ. Cette synthèse repose sur des interactions entre des oxydes d'éthylène et de l'eau en présence d'un catalyseur acide et est suivit d'un phénomène de polymérisation (Huang *et al.* 1993). De plus, une fois synthétisé, la pureté du Si-PEG-Mal, atteint un taux de 80%. Pour augmenter ce taux, les conditions de purification du polymère par chromatographie flash devront être optimisées. Enfin, le PEG étant destiné à être utilisé dans le domaine biomédical, il serait judicieux d'améliorer son protocole de synthèse en remplaçant les CMR utilisés par des solvants non toxiques.

Les différentes étapes de l'ingénierie du nouveau nanobiohybride ont également été accomplies durant ce travail de thèse. Néanmoins, certaines de ces étapes n'ont été que partiellement réalisées et nécessitent d'être développées.

La fonctionnalisation des nanorubans de titanates par un mélange de polymères mono et bifonctionnels a été optimisée. De ce fait, seule la quantité de polymère permettant le greffage ciblé devra être adaptée à la quantité de protéines nécessaires pour favoriser les processus de cicatrisation et de régénération des tissus lésés, lorsque celle-ci aura été déterminée.

Le greffage ciblé de protéines en surface des nanorubans par l'intermédiaire du couplage Mal/Cys est une étape qui nécessite quant à elle d'être approfondie. Les essais préliminaires réalisés ont montré que la réduction des peptides permettant de libérer et d'activer les cystéines n'a pas fonctionné. Il est donc impératif d'optimiser les conditions de réduction afin de favoriser le greffage spécifique. De plus, l'étape de passivation des nanorubans, permettant de limiter les phénomènes d'adsorption non-spécifiques n'a également pas apporté les résultats escomptés. Des tests complémentaires devront donc être réalisés pour déterminer les conditions optimales de passivation des nanorubans. Lorsque les paramètres favorisant un greffage ciblé auront été déterminés, différentes protéines pourront être testées pour valider le concept du nanobiohybride pour des applications biomédicales diverses et variées.

En ce qui concerne la formulation du nanobiohybride, la forme galénique choisie semble présenter de nombreuses limitations. En effet, les hydrogels d'alginate ont tendance à sécher lorsqu'ils sont appliqués sur une plaie. Ce phénomène de déshydratation freine la libération du principe actif et ralentit le phénomène de cicatrisation par ré-épithélialisation. Cette formulation nécessite donc d'être améliorée notamment en la combinant à l'utilisation d'un film hydrophobe limitant le dessèchement. Si aucune amélioration n'est visible, une autre formulation galénique devra être envisagée.

Enfin, au niveau des tests biologiques réalisés (test de cytotoxicité MTT et test d'agrégation plaquettaire), seuls les nanorubans ont été analysés. Les autres composants, ainsi que le nanobiohybride à différents stades de son ingénierie, devront également être testés pour évaluer leur toxicité, indispensable pour la confection d'un médicament, et leur pouvoir agrégeant, nécessaire à la validation du concept de ce nouvel agent cicatrisant.

Une fois la conception du nouveau nanobiohybride terminée, il devra être testé *in vitro* et *in vivo* pour prouver son action en tant qu'agent hémostatique et agent cicatrisant. Dans un premier temps, ce modèle est destiné principalement à des patients diabétiques présentant des processus de cicatrisation et de régénération défectueux. Il pourra également, dans un second temps, être appliqué à d'autres domaines notamment en odontologie et dans le domaine cardiovasculaire. Ce nouveau nanobiohybride pourrait par exemple favoriser la régénération de tissus cardiaques lésés (infarctus) en induisant par la différenciation et la prolifération de cellules souches (figure 166).

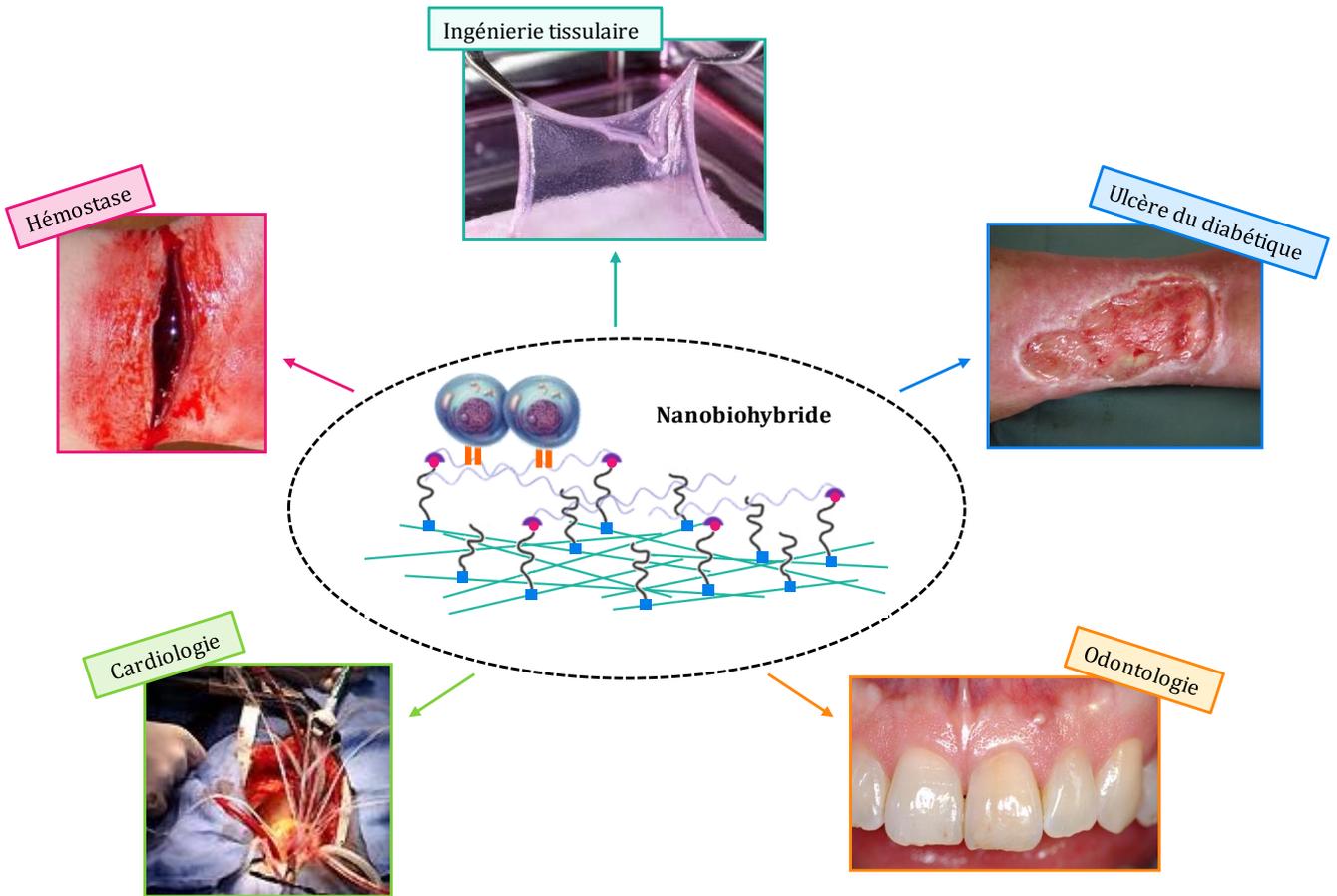


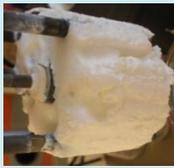
Figure 166 : Schéma illustrant les différents domaines dans lesquels le nouveau nanobiohybride pourrait être utilisé.

Annexe 1 : Récapitulatif des différentes techniques de caractérisation utilisées

Techniques	Appareil	Caractéristiques
ATG	Setaram TAG 24	Flux d'air reconstitué : N ₂ /O ₂ = 0,12/0,04 L.min ⁻¹ Montée en température : 2°C.min ⁻¹ Température : 20 à 800°C
BET	Autosorb 1C-Quantachrome	Molécule sonde : azote ou krypton Désorption : 150°C durant 3h Logiciel : Belsorp
DRX	Inel CPS 120 tube cuivre	Rayonnement k _{α1} = 1,54056 Å Monochromateur avant Ge 111 Logiciels : EVA et Fityk
Spectrophotomètre	Wallac VICTOR 3 (Perkin-Elmer)	570 nm (MTT) Logiciel
MEB	JEOL JSM - 7600F	Tension accélération 30 kV Résolution 1 nm à 15 kV Résolution 1,5 nm à 1 kV Préparation des échantillons
MET	JEOL JEM - 2100 LaB ₆	Résolution point à point 0,25 nm Tension d'accélération 200 kV Préparation des échantillons Logiciel DigitalMicrograph
MET	JEOL JEM - 2100F	Résolution point à point 0,19 nm Tension d'accélération 200 kV Préparation des échantillons Logiciel : DigitalMicrograph
Raman	inVia Ramishow	Laser YAG : Nd ³⁺ double λ = 532 nm
Spectromètre IR	Bruker Equinox 55	En transmission Nombre d'onde : 400-4000 cm ⁻¹ Résolution 2 cm ⁻¹ Nombre de scans : 100 Préparation des échantillons : pastille de KBr Logiciel : Opus
Spectromètre RMN ¹ H	Bruker 300	300 MHz Préparation des échantillons : solvant chloroforme deutéré
Thrombo-Agrégomètre	Ta8v SD Medical	-
XPS	SIA 100 Riber/Cameca	Sources K _α Al (énergie 1486,6 e V) K _α Mg (énergie 1486,6 e V) Tension 12 kV Puissance 200 W Préparation des échantillons Logiciel : CasaXPS

Annexe 2 : Catalogue des différentes synthèses réalisées

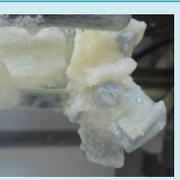
Nom	Précurseur TiO ₂	Quantité précurseur	[] soude	V soude	T°C	Temps	Agitation	Présonication	Précipité
VB-01-16	P25 Φ ≈ 25 nm	440 mg	10M	110 mL	180°C	36h	150 rpm	non	
VB-02-01	P25 Φ ≈ 25 nm	440 mg	10M	110 mL	180°C	20h	150 rpm	non	
VB-02-02	P25 Φ ≈ 25 nm	440 mg	10M	110 mL	150°C	20h	150 rpm	non	
VB-02-04	Anatase Φ entre 10 et 15 nm	440 mg	10M	110 mL	180°C	20h	150 rpm	non	
VB-02-05	Anatase Φ entre 10 et 15 nm	440 mg	10M	110 mL	180°C	20h	150 rpm	Oui 30 min canne US par pulse de 2 sec Puissance 375 W	
VB-02-06	P25 Φ ≈ 25 nm	440 mg	10M	110 mL	180°C	20h	150 rpm	Oui 30 min canne US par pulse de 2 sec Puissance 375 W	

Nom	Précurseur TiO ₂	Quantité précurseur	[] soude	V soude	T°C	Temps	Agitation	Présonication	Précipité
VB-02-07	P25 Φ ≈ 25 nm	4,4 g	10M	110 mL	180°C	20h	150 rpm	non	
VB-02-08	Anatase Φ entre 5 et 10 nm	440 mg	10M	110 mL	180°C	20h	150 rpm	non	
VB-02-09	Anatase Φ entre 5 et 10 nm	440 mg	10M	110 mL	180°C	20h	150 rpm	Oui 30 min canne US par pulse de 2 sec Puissance 375 W	
VB-02-10	P25 Φ ≈ 25 nm	440 mg	10M	110 mL	180°C	20h	50 rpm	Oui 30 min canne US par pulse de 2 sec Puissance 375 W	
VB-02-11	Anatase Φ entre 5 et 10 nm	440 mg	10M	110 mL	180°C	24h	150 rpm	Oui 30 min canne US par pulse de 2 sec Puissance 375 W	
VB-02-12	P25 Φ ≈ 25 nm	440 mg	10M Soude neuve	110 mL	180°C	20h	150 rpm	Oui 30 min canne US par pulse de 2 sec Puissance 375 W	

Nom	Précurseur TiO ₂	Quantité précurseur	[I] soude	V soude	T°C	Temps	Agitation	Présonication	Précipité
VB-02-13	P25 $\Phi \approx 25$ nm	440 mg	10M	110 mL	180°C	20h	150 rpm	Oui 30 min canne US par pulse de 2 sec Puissance 375 W	
VB-02-14	P25 $\Phi \approx 25$ nm	440 mg	15M	110 mL	180°C	20h	150 rpm	Oui 30 min canne US par pulse de 2 sec Puissance 375 W	
VB-02-15	P25 $\Phi \approx 25$ nm	440 mg	10M	110 mL	180°C	24h	150 rpm	Oui 30 min canne US par pulse de 2 sec Puissance 375 W	
VB-02-16	P25 $\Phi \approx 25$ nm	440 mg	10M	110 mL	180°C	24h	150 rpm	Oui 30 min canne US par pulse de 2 sec Puissance 375 W	
VB-02-17	P25 $\Phi \approx 25$ nm	440 mg	10M	110 mL	180°C	20h	150 rpm	Oui 30 min canne US par pulse de 2 sec Puissance 375 W	
VB-02-18	P25 $\Phi \approx 25$ nm	440 mg	10M	110 mL	180°C	20h	150 rpm	Oui 30 min canne US par pulse de 2 sec Puissance 375 W	

Nom	Précurseur TiO ₂	Quantité précurseur	[J] soude	V soude	T°C	Temps	Agitation	Présonication	Précipité
VB-02-19	P25 φ ≈ 25 nm	440 mg	10M 40 min à l'air libre	110 mL	180°C	20h	150 rpm	Oui 30 min canne US par pulse de 2 sec Puissance 375 W	
VB-02-20	P25 φ ≈ 25 nm	440 mg	10M	110 mL	180°C	20h	150 rpm	Oui 30 min canne US par pulse de 2 sec Puissance 375 W	
VB-02-21	P25 φ ≈ 25 nm	440 mg	10M	110 mL	180°C	20h	150 rpm	Oui 30 min canne US par pulse de 2 sec Puissance 375 W	
VB-02-22	P25 φ ≈ 25 nm	440 mg	10M	110 mL	180°C Arrêt brutal par système de trempe	20h	150 rpm	Oui 30 min canne US par pulse de 2 sec Puissance 375 W	
VB-02-23	Rutile φ ≈ 174 nm	440 mg	10M	110 mL	180°C	20h	150 rpm	Oui 30 min canne US par pulse de 2 sec Puissance 375 W	
VB-02-24	P25 φ ≈ 25 nm	440 mg	10M	110 mL	180°C	12h	150 rpm	Oui 30 min canne US par pulse de 2 sec Puissance 375 W	

Nom	Précurseur TiO ₂	Quantité précurseur	[] soude	V soude	T°C	Temps	Agitation	Présonication	Précipité
VB-01-25	P25 Φ ≈ 25 nm	440 mg	10 M	110 mL	180°C	4h	150 rpm	Oui 30 min canne US par pulse de 2 sec Puissance 375 W	
VB-02-26	P25 Φ ≈ 25 nm	440 mg	10 M	110 mL	180°C	16h	150 rpm	Oui 30 min canne US par pulse de 2 sec Puissance 375 W	
VB-02-27	P25 Φ ≈ 25 nm	440 mg	10 M	110 mL	150°C	8h	150 rpm	Oui 30 min canne US par pulse de 2 sec Puissance 375 W	
VB-02-28	P25 Φ ≈ 25 nm	440 mg	10 M	110 mL	180°C	28h	150 rpm	Oui 30 min canne US par pulse de 2 sec Puissance 375 W	
VB-02-29 Précipité éléments plongeants	P25 Φ ≈ 25 nm	440 mg	10 M	110 mL	180°C	20h	150 rpm	Oui 30 min canne US par pulse de 2 sec Puissance 375 W	
VB-02-29 Précipité bol en Téflon	P25 Φ ≈ 25 nm	440 mg	10 M	110 mL	180°C	20h	150 rpm	Oui 30 min canne US par pulse de 2 sec Puissance 375 W	

Nom	Précurseur TiO ₂	Quantité précurseur	[] soude	V soude	T°C	Temps	Agitation	Présonication	Précipité
VB-02-30	P25 Φ ≈ 25 nm	440 mg	10 M	110 mL	180°C Arrêt brutal par système de trempe	20h	150 rpm	Oui 30 min canne US par pulse de 2 sec Puissance 375 W	
VB-02-31 Partie filandreuse	P25 Φ ≈ 25 nm	440 mg	10 M	110 mL	180°C	20h	150 rpm	Oui 30 min canne US par pulse de 2 sec Puissance 375 W	
VB-02-31 Partie granuleuse	P25 Φ ≈ 25 nm	440 mg	10 M	110 mL	180°C	20h	150 rpm	Oui 30 min canne US par pulse de 2 sec Puissance 375 W	
VB-02-32	P25 Φ ≈ 25 nm	440 mg	10 M	110 mL	180°C	36h	150 rpm	Oui 30 min canne US par pulse de 2 sec Puissance 375 W	
VB-02-33 Partie filandreuse	P25 Φ ≈ 25 nm	440 mg	10 M	110 mL	180°C	20h	150 rpm	Oui 30 min canne US par pulse de 2 sec Puissance 375 W	
VB-02-33 Partie granuleuse	P25 Φ ≈ 25 nm	440 mg	10 M	110 mL	180°C	20h	150 rpm	Oui 30 min canne US par pulse de 2 sec Puissance 375 W	

Nom	Précurseur TiO ₂	Quantité précurseur	[] soude	V soude	T°C	Temps	Agitation	Présonication	Précipité
VB-02-34	P25 Φ ≈ 25 nm	440 mg	10 M	110 mL	180°C	20h	150 rpm	Oui 30 min canne US par pulse de 2 sec Puissance 375 W	
VB-02-35	P25 Φ ≈ 25 nm	440 mg	10 M	110 mL	180°C	20h	300 rpm	Oui 30 min canne US par pulse de 2 sec Puissance 375 W	
VB-02-36	P25 Φ ≈ 25 nm	440 mg	5 M	110 mL	180°C	20h	150 rpm	Oui 30 min canne US par pulse de 2 sec Puissance 375 W	
VB -02-37 Partie filandreuse	P25 Φ ≈ 25 nm	440 mg	10 M	110 mL	180°C	20h	150 rpm	Oui 30 min canne US par pulse de 2 sec Puissance 375 W	
VB-02-37 Partie granuleuse	P25 Φ ≈ 25 nm	440 mg	10 M	110 mL	180°C	20h	150 rpm	Oui 30 min canne US par pulse de 2 sec Puissance 375 W	

Annexe 3 : Analyse XPS des nanorubans de titanates

La spectroscopie de photoélectrons X a permis de donner une estimation des différentes espèces présentes dans la composition chimique des nanorubans. La profondeur d'échappement des photoélectrons étant de l'ordre de 3 nm, l'XPS est considérée comme une technique d'analyse de surface et non de composition globale. Les nanorubans de titanates sont composés de 3 éléments chimiques : le titane, l'oxygène et le sodium. Cependant, l'XPS étant une analyse de surface, un quatrième élément chimique est détecté : le carbone qui est le composant majeur des pollutions et des contaminations présentes à la surface des rubans. Le pic caractéristique du carbone, dont l'énergie de liaison est fixée à 284,5 eV, permet de calibrer les autres pics. Pour obtenir une analyse chimique plus fine, les pics caractéristiques C1s et O1s sont désommés à l'aide du logiciel CasaXPS (version 2.2) dans le but de déterminer les différentes contributions des atomes de carbone et d'oxygène. Pour déterminer la proportion atomique en carbone, oxygène et titane, la source aluminium est utilisée. En revanche, pour déterminer la teneur en sodium, il est nécessaire d'utiliser la source magnésium pour éviter les interférences entre le pic Na1s et le pic caractéristique des électrons Auger du titane.

1) Désomation du niveau 1s du carbone

Dans le cas des nanorubans de titanates, le niveau 1s du carbone présente trois contributions (figure 167).

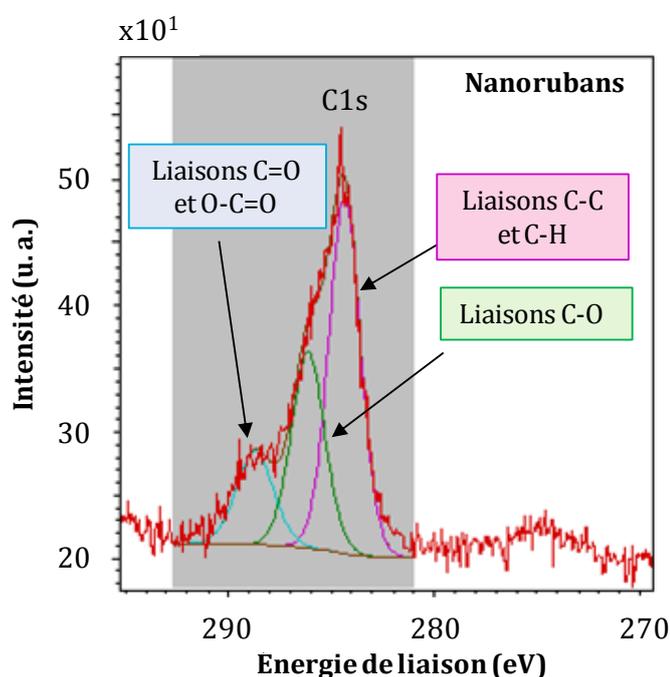


Figure 167 : Désomation du niveau 1s du carbone des nanorubans de titanates en trois contributions.

La première, à 284,5 eV, souvent assimilée à une pollution de surface, peut être attribuée à des liaisons de type C-C et/ou C-H. Les deux autres, à plus hautes énergies de liaison, sont associées à des liaisons carbone/oxygène. En général, l'écart est de l'ordre de 1,5 eV entre une simple liaison C-O et une double liaison C=O. Dans le cas des nanorubans de titanates, les deux

contributions sont observées respectivement à 286 eV (pour une simple liaison C-O) et à 288,3 eV (pour une double liaison C=O). Pour cette dernière, les deux types de fonction C=O provenant de substances organiques et O-C=O provenant vraisemblablement de carbonates (figure 168) peuvent coexister. Il est alors difficile de les différencier.

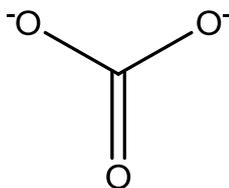


Figure 168 : Structure chimique des carbonates.

Les fonctions C-O et/ou O-C=O, faiblement présentes dans les précurseurs TiO_2 de départ, le sont beaucoup plus lors de la synthèse des nanorubans. Cela s'explique par le fait que les titanates nanométriques sont connus pour fixer énormément les carbonates lors du traitement hydrothermal et lors de leur exposition à l'air libre (Aimable *et al.* 2008). La contribution des carbonates à 288,3 eV est confirmée par l'analyse XPS du carbonate de sodium Na_2CO_3 (figure 169).

Les largeurs à mi-hauteur des différentes contributions du carbone (FWHM) ont été fixées à 1,8 eV pour les liaisons de type C-C et C-H, à 1,9 eV pour les liaisons de type C-O et à 2 eV pour les fonctions C=O et O-C=O.

2) Désommission du niveau 1s de l'oxygène

Dans le cas des nanorubans de titanates, le pic de l'oxygène se compose de quatre contributions différentes (figure 169).

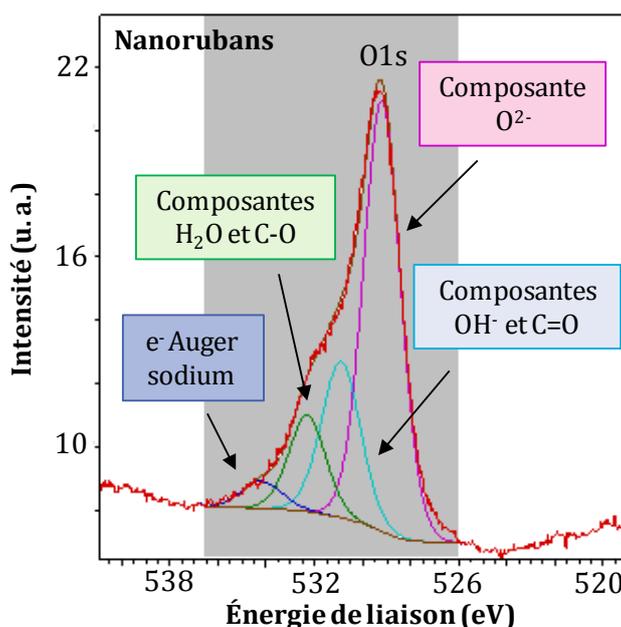


Figure 169 : Désommission du niveau 1s de l'oxygène des nanorubans de titanates en quatre contributions.

Le premier pic, situé à 529,5 eV, est le pic le plus important puisqu'il correspond à l'oxygène de structure O^{2-} . A un écart d'environ 1,5 eV, aux alentours de 531,3 eV, est placé le pic caractéristique de la contribution des atomes d'oxygène aux groupements hydroxyles. Le troisième pic, situé à 532,5 eV, représente quant à lui la part d'eau de structure contenue dans l'échantillon. Les analyses XPS étant réalisées sous un vide poussé, l'eau présente n'est pas physisorbée mais chimisorbée. Elle est donc contenue dans la structure des rubans. Le dernier pic, peu intense, se trouve à 535,5 eV. Ce pic semble représenter les électrons d'Auger du sodium. La participation des atomes d'oxygène aux fonctions C-O et C=O n'apparaît pas explicitement sur la désomation du niveau 1s de l'oxygène car les pics correspondants sont placés exactement au niveau de l'eau de structure et des groupements hydroxyles (H_2O et C-O à 532,5 eV, OH^- et C=O à 531,3 eV). Les largeurs à mi-hauteur de ces pics (FWHM), permettant de remonter à une proportion atomique, ont été fixées à 1,8 eV pour l'oxygène O^{2-} , à 2 eV pour les groupements hydroxyles et C=O et à 2,5 eV pour l'eau de structure et les groupements C-O et pour les électrons Auger du sodium.

- ***Pour en savoir plus sur le sodium et les carbonates...***

Pour confirmer que le pic situé à 535,5 eV correspond bien aux électrons Auger du sodium, un modèle, contenant une forte teneur en sodium a été analysé en XPS : le carbonate de sodium Na_2CO_3 .

La désomation du niveau 1s de l'oxygène avec la source aluminium, indique la présence de deux contributions placées à 530,9 eV et à 535,5 eV. En revanche, la désomation de ce même pic avec la source magnésium, ne conduit qu'à une seule contribution située à 530,9 eV. La présence du pic à 530,9 eV quelle que soit la source utilisée, indique qu'il correspond à l'oxygène contenu dans la structure des carbonates. Le pic placé à 535,5 eV qui n'apparaît qu'avec la source aluminium correspond quant à lui aux électrons Auger du sodium (figure 170) (Miura *et al.* 2001, Ilton *et al.* 2006). Dans le cas de la désomation du niveau 1s de l'oxygène des nanorubans de titanates, le pic situé à 535,5 eV correspond donc bien aux électrons d'Auger du sodium.

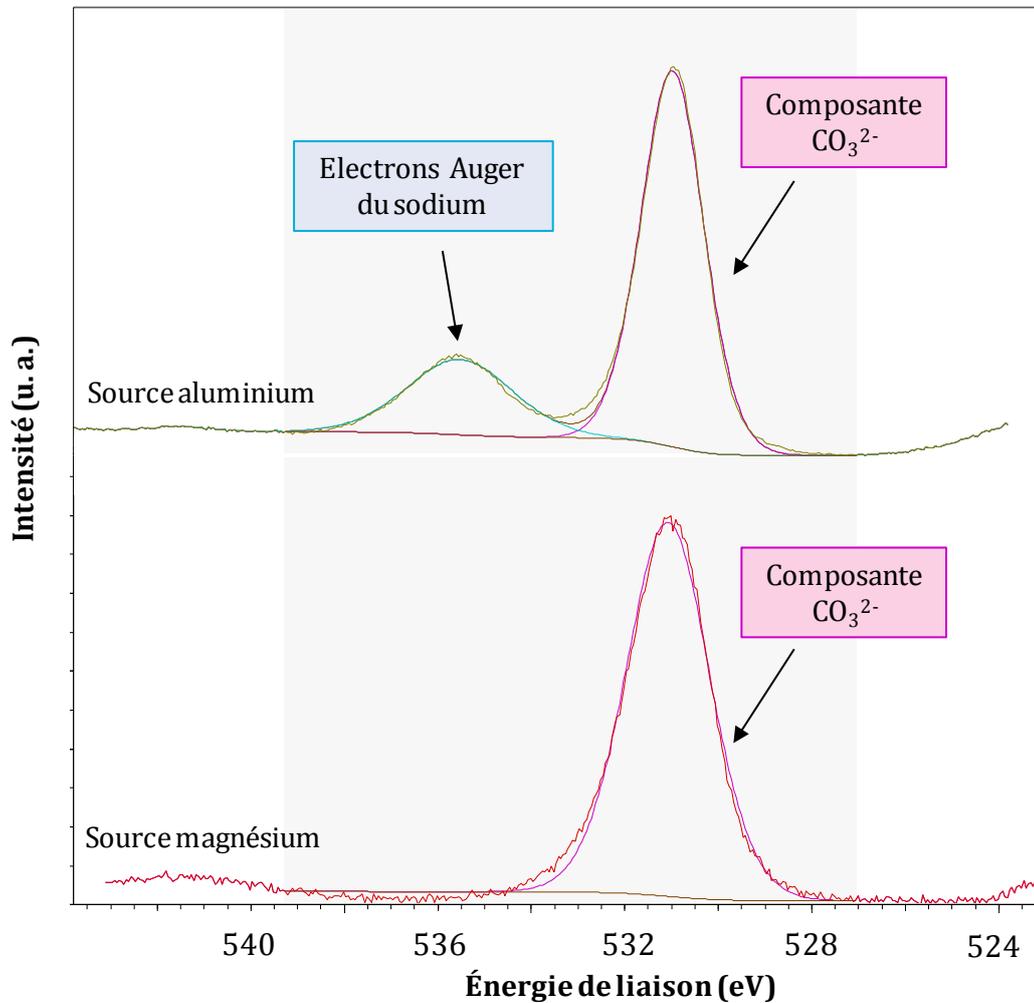


Figure 170 : Désomation du niveau 1s de l'oxygène du carbonate de sodium avec les sources aluminium ou magnésium.

La désomation du niveau 1s du carbone indique, quant à elle, la présence de deux contributions (figure 171). Le pic le plus intense, situé à 284,5 eV correspond aux pollutions de type C-C et/ou C-H. Le second pic placé à 288,9 eV représente les carbonates CO_3^{2-} (figure 168). La position de pic confirme que dans le cas des nanorubans, les carbonates O-C=O coexistent avec les fonctions de type C=O placées à 288,3 eV.

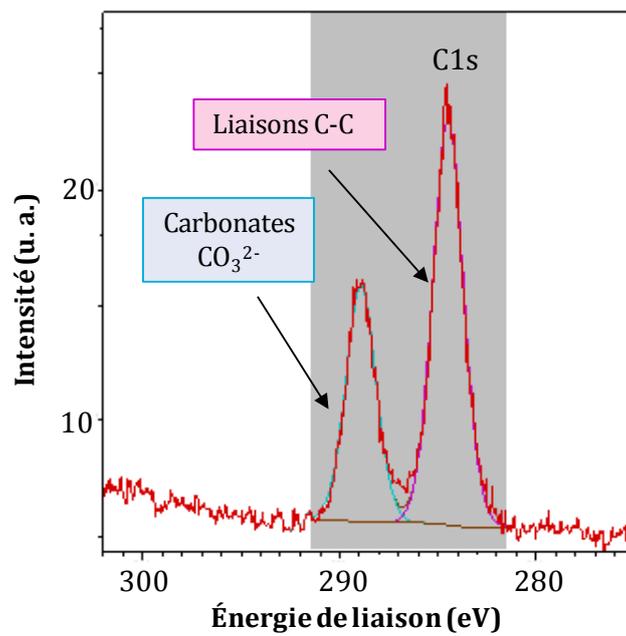


Figure 171 : Désomation du niveau 1s du carbone du carbonate de sodium en deux contributions.

Annexe 4 : Estimation du taux de pollution présent dans les synthèses de nanorubans de titanates

Pour estimer le taux de pollution présent dans une synthèse de nanorubans de titanates, on considère qu'un carré de grille MET contient un échantillon représentatif du produit de synthèse global.

La première étape consiste à délimiter les zones de la grille considérées vides et occupées par les nanoparticules (figure 172).

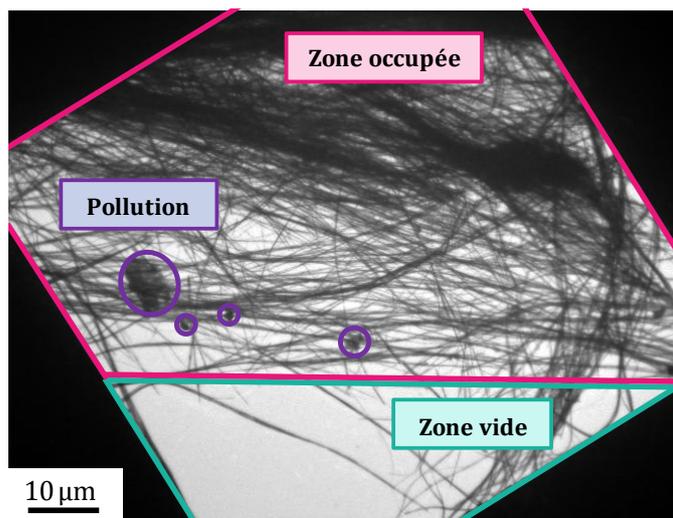


Figure 172 : Délimitation des zones d'un carré de grille MET considérées vides et occupées par les nanoparticules.

Une fois délimitée, la surface de la zone occupée par les nanoparticules est calculée. La surface des pollutions, dont la forme est considérée comme sphérique, est également calculée. La surface occupée uniquement par les rubans vaut alors :

$$S_{\text{rubans}} = S_{\text{zone occupée}} - S_{\text{pollutions}}$$

Une fois les différentes surfaces calculées, le taux de présence des pollutions peut être calculé. Pour être le plus représentatif possible, cette méthode de calcul est appliquée sur 10 carrés de grille MET choisis de manière aléatoire. Les résultats sont ensuite moyennés.

Annexe 5 : Détermination de l'épaisseur par EELS

Principe de la méthode EELS

La spectroscopie des pertes d'énergie est une technique d'analyse dans laquelle le matériau à analyser est exposé à un faisceau incident d'électrons monocinétiques. Lors de la traversée de l'échantillon, certains électrons subissent une interaction inélastique : perte d'énergie et déflexion de la trajectoire. Cette perte d'énergie peut être quantifiée et associée à des interactions particulières :

- L'excitation de phonons (pertes inférieures à 100 meV)
- Les excitations électroniques : les créations de paires électron-trou (de l'ordre de l'eV), les transitions intra-bandes (dixième d'eV) et inter-bandes (de l'ordre de l'eV) ainsi que les excitations collectives des électrons libres (plasmons) (<50 eV)
- Les ionisations des couches électroniques (quelques dizaines jusqu'à près de 100 keV pour les seuils K des éléments les plus lourds)

Un grand nombre d'informations est contenu dans un spectre de pertes d'énergie : nature des éléments, proportion des éléments, décalage chimique, coordination, distance interatomique... Le spectre de perte d'énergie permet aussi une mesure rapide et fiable de l'épaisseur locale de l'échantillon (figure 173). La procédure est la suivante:

- Acquisition d'un spectre de pertes d'énergie
- Calcul des intégrales sous le pic de pertes nulles (ZLP, Zero Loss Peak, I_0) et sous l'ensemble du spectre (intensité totale, I_t)
- L'épaisseur t est alors calculée comme : $t = \lambda \cdot \ln(I_t/I_0)$, où λ est le libre parcours moyen de diffusion inélastique des électrons dans le matériau d'étude

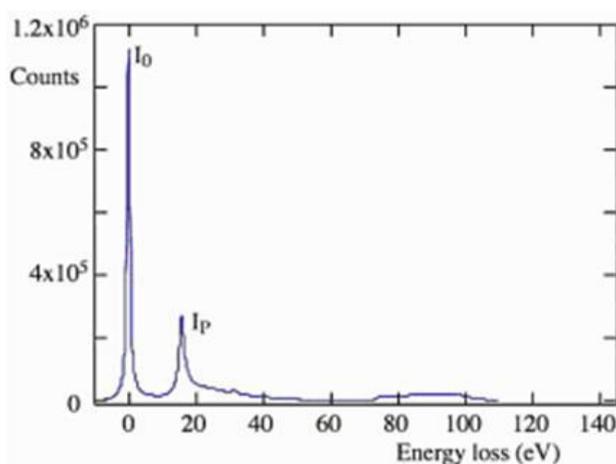


Figure 173 : Spectre de perte d'énergie permettant de remonter à l'épaisseur de l'échantillon (exemple de l'aluminium pur) d'après (Williams et al. 1996).

Calcul de l'épaisseur des nanorubans de titanates

L'épaisseur relative est donnée par la relation :

$$t/\lambda = \ln (I_t/I_0)$$

Où le libre parcours moyen de l'électron dépend de l'angle de collection β des électrons :

$$\lambda = \lambda(\beta) \cong \frac{106 F (E_0/E_m)}{\ln [2\beta (E_0/E_m)]}$$

Avec :

λ en nm

β en mrad

E_0 énergie de l'électron incident en keV

E_m perte d'énergie moyenne en eV

F , facteur relativiste donné par $F = \frac{1+E_0/1022}{(1+E_0/511)^2}$, soit $F = 0,618$ pour $E_0 = 200 \text{ keV}$

La perte d'énergie moyenne est donnée par :

$$E_m \sim 7,6 Z^{0.36}$$

Dans le cas du titanate $\text{Na}_2\text{Ti}_3\text{O}_7$, le numéro atomique Z est remplacé par un numéro atomique effectif donné par :

$$Z_{eff} = \frac{\sum_i f_i Z_i^{1.3}}{\sum_i f_i Z_i^{0.3}}$$

Où f_i est la fraction atomique de l'élément i et Z_i est le numéro atomique de l'élément i , soit respectivement 8, 11, 22 pour l'oxygène, le sodium et le titane. Ainsi $Z_{eff} \approx 12,8$, dans le cas de $\text{Na}_2\text{Ti}_3\text{O}_7$ et la perte d'énergie moyenne vaut $E_m \approx 19,02 \text{ eV}$.

En mode EFTEM (Energy Filtered Transmission Electron Microscopy), l'angle de collection β dépend du diamètre du diaphragme objectif. Les cartographies en épaisseur ont été acquises sans diaphragme et dans ce cas on considère que β vaut 100 mrad . On aboutit ainsi à la valeur de 90 nm pour le libre parcours moyen λ de l'électron et l'on peut donc calculer les épaisseurs absolues des nanorubans (Egerton. 1996).

Annexe 6 : Détermination de l'épaisseur par CBED

L'acquisition courante de cliché de diffraction se réalise en mode faisceau parallèle et les taches de diffraction sont des points. En faisceau convergent (électrons concentrés en un spot de faible diamètre sur l'échantillon), les taches de diffraction deviennent des disques dont le rayon est lié à la convergence du faisceau et l'intensité à l'intérieur de ces disques n'est pas uniforme (lignes et/ou zones sombres ou claires) (figure 174).

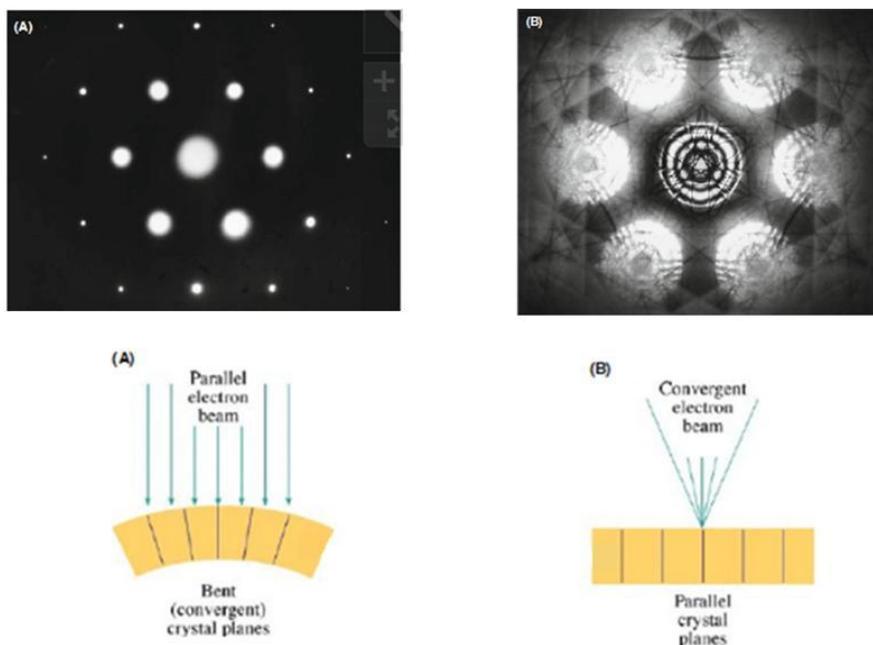


Figure 174 : Schéma de clichés de diffraction obtenus en faisceau parallèle et en faisceau convergent pour un échantillon d'aluminium pur.

Pour la mesure de l'épaisseur, l'acquisition de la diffraction est réalisée en mode « deux ondes », c'est-à-dire que l'échantillon est orienté de façon à ce qu'un seul système de plans cristallins diffracte. On observe alors un faisceau transmis très intense et un faisceau diffracté moins intense.

Pour une diffraction en condition exacte de Bragg ($s=0$, écart de Bragg cinématique nul), on observe des modulations périodiques de l'intensité en fonction de l'épaisseur. Ces modulations d'intensités liées à l'épaisseur, au centre ($s=0$) des faisceaux transmis et diffracté sont complémentaires ($I_t + I_g = 1$) et sont données par :

- disque transmis $I_t(s=0) = \cos^2(\pi t / \xi_g)$
- disque diffracté $I_g(s=0) = \sin^2(\pi t / \xi_g)$

où ξ_g représente la distance d'extinction ($I_t(s=0)=0$ chaque fois que l'épaisseur est telle que $t=(n+1/2) \cdot \xi_g$ et $I_g(s=0)=0$ chaque fois que l'épaisseur est telle que $t=n \cdot \xi_g$).

Les modulations de l'intensité au sein de la tache de diffraction « rocking curve », sont symétriques de part et d'autre de la condition de Bragg ($s=0$) peuvent être représentées par le produit d'une fonction enveloppe par une fonction modulation :

- fonction enveloppe $f(I) = 1/(s' \cdot \xi_g)^2$
- fonction de modulation $g(I) = \sin^2(\xi \cdot t \cdot s')$

où $s' = \sqrt{s^2 + 1/\xi_g^2}$ est l'écart à l'angle de Bragg en condition dynamique.

L'intensité diffractée finale peut alors s'écrire (Hirsch *et al.* 1977) : $\Phi = \sin^2\beta \cdot \sin^2(\pi.\Delta k.z)$

où $\beta = \text{tg}^{-1}(1/s.\xi_g)$ et $\Delta k = \text{sqrt}(1+s^2\xi_g^2)/\xi_g$

L'intensité est minimale pour $\Delta k.z = n_i$ ($n_i=1, 2, 3, 4, \dots$) et maximale pour $\text{tg}(\pi.\Delta k.z) = (\pi.\Delta k.z) = x_k$. ($x_k=1.431, 2.459, 3.471, 4.477, \dots$).

Les expressions suivantes ont alors pu être démontrées (Kelly *et al.* 1975)

- pour les minima $(s_i/n_i)^2 = 1/z^2 - (1/\xi_g)^2(1/n_i)^2$
- pour les maxima $(s_i/x_k)^2 = 1/z^2 - (1/\xi_g)^2(1/x_k)^2$

Ces deux expressions sont des équation de droites $Y=AX+B$ dont la pente est identique $A=(1/\xi_g)^2$ et dont l'axe des ordonnées est coupé en $B=1/z^2$ (figure 175).

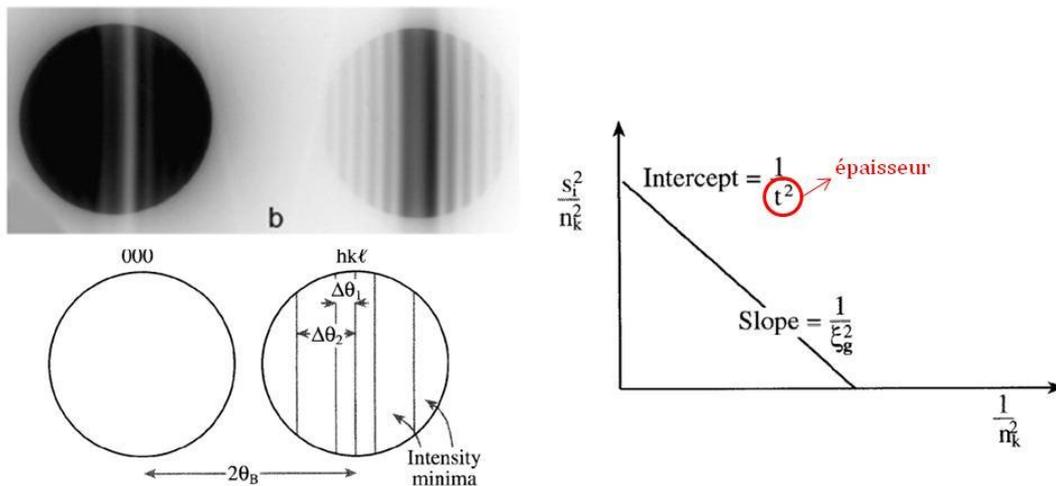


Figure 175 : Photo et schéma des franges de diffraction obtenues par la technique CBED et graphe de la fonction linéaire permettant de remonter à la valeur de l'épaisseur de l'échantillon.

En mesurant les écarts à l'angle de Bragg des minima et des maxima d'intensité (distances entre 2 minima ou maxima par rapport à la frange centrale, $s=0$), on peut reporter sur un graphique en X et Y les points calculés. Puis en effectuant une extrapolation linéaire on peut trouver les coefficients A et B et ainsi obtenir l'épaisseur z.

Enfin, une étude réalisée sur du silicium pur a montré que cette technique est adaptée pour des épaisseurs supérieures à 45 nm (figure 176) (Delille *et al.* 2001).

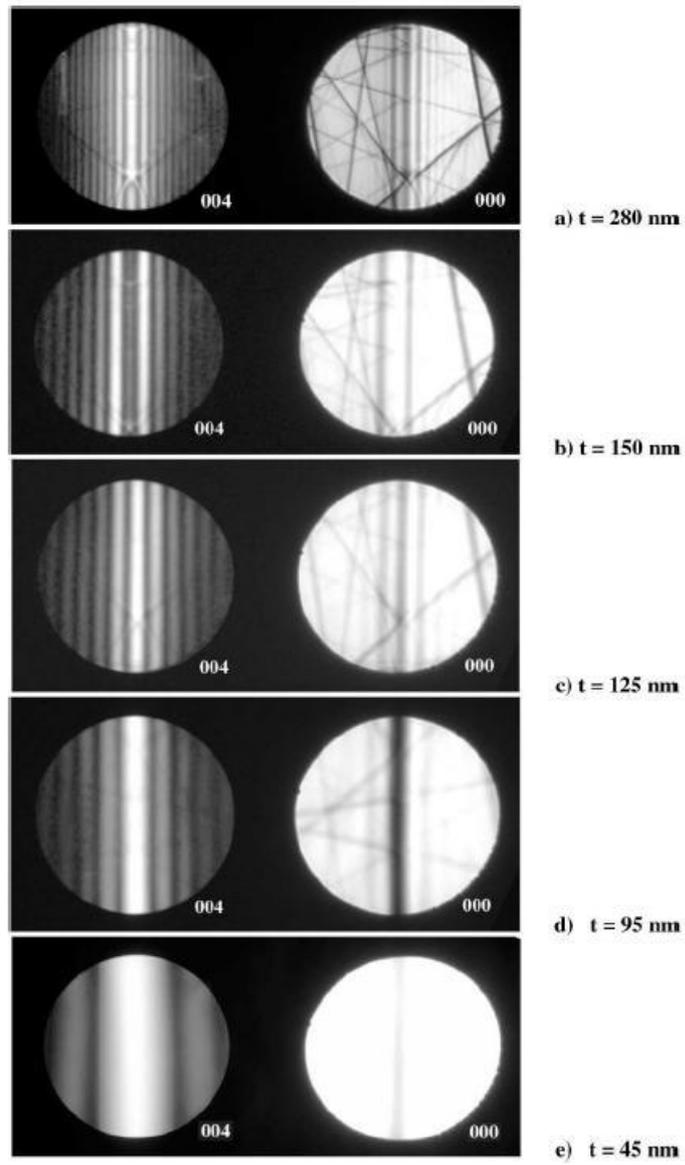


Figure 176 : Clichés de diffraction d'échantillons de silicium pur présentant des épaisseurs variables.

Annexe 7 : Détermination de l'épaisseur par la technique grain de café

Dans cette méthode, la contamination de l'échantillon est induite par la présence du faisceau et elle provient de la présence de molécules hydrocarbures dans la colonne du MET qui diffusent à la surface de l'échantillon. Le faisceau d'électrons est donc condensé de façon à former une très petite sonde à la surface de l'échantillon. Il apparaît alors une tache de contamination au carbone à la surface supérieure et inférieure de l'échantillon au niveau du point d'analyse. L'échantillon est alors fortement incliné d'un angle α de façon à séparer les deux taches de contamination. La distance de séparation projetée, d , entre les deux taches, pour un grandissement donné M est liée à l'épaisseur de l'échantillon par la relation : $t = d/M.\sin\alpha$. Si la contamination initiale est réalisée alors que l'échantillon est déjà incliné d'un angle β , alors l'épaisseur est : $t = d.\cos\beta/M.\sin\alpha$ (figure 177). L'inconvénient de cette méthode est que la contamination réduit la résolution spatiale et que ni le faisceau et ni l'échantillon ne doivent dériver. En général, cette méthode surestime l'épaisseur réelle (Williams et al. 1996).

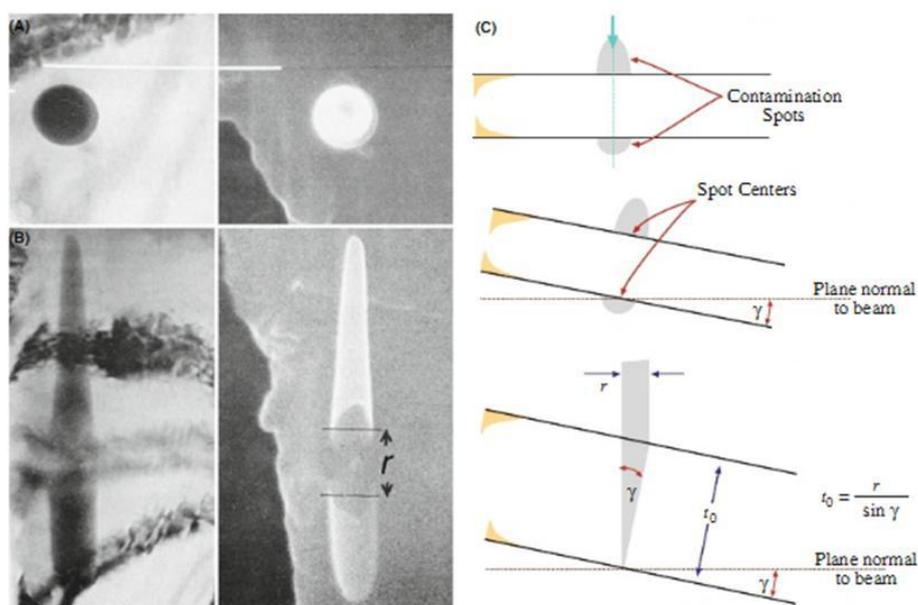


Figure 177 : Clichés MET et schéma expliquant la mesure d'épaisseur d'un échantillon par contamination au carbone.

Annexe 8 : Détermination du taux de greffage de polymère par ATG

L'analyse thermogravimétrique (ATG) est une technique permettant de mesurer la variation de la masse d'un échantillon en fonction de la température. Dans ces travaux, les pertes de masse observées permettent de déterminer la quantité de polymère greffée en surface des nanorubans de titanates. Les mesures ont été effectuées sous flux d'air reconstitué avec une proportion respective de N₂ et de O₂ de 0,12 et 0,04 mL.min⁻¹. La température a varié de 20 à 800°C avec une rampe de montée en température de 2°C .min⁻¹.

Dans le cas de la fonctionnalisation des nanorubans de titanates, la dérivée de la perte de masse en fonction de la température indique deux phénomènes distincts. Entre 20°C et 120°C, la perte de masse correspond au départ de l'eau physisorbée et chimisorbée. Puis, entre 120°C et 450°C, la perte de masse est associée à la dégradation des polymères mPEG-Si et Si-PEG-Mal. Pour obtenir un taux de greffage exprimé en nombre de chaînes de polymère par nm² de rubans, le calcul suivant est réalisé :

$$PEG/nm^2 = \frac{\frac{\Delta m * N_A}{M_{PEG}}}{(1 - \Delta m) * S_{BET} * 10^{18}}$$

Avec Δm = perte de masse de l'échantillon en % (pour les polymères entre 120°C et 450°C)

N_A = nombre d'Avogadro

M_{PEG} = masse moléculaire du PEG en g.mol⁻¹

S_{BET} = surface spécifique des nanorubans de titanates en m².g⁻¹

10¹⁸ = coefficient permettant d'obtenir une surface spécifique en nm².g⁻¹

La surface spécifique des nanorubans de titanates (S_{BET}) utilisée pour ce calcul a été déterminée par adsorption d'azote à basse température (méthode BET). La détermination de la surface spécifique se base sur le traitement analytique de l'isotherme d'adsorption déterminé expérimentalement (figure 178). Il est alors possible de définir la quantité de gaz adsorbée en une monocouche complète, puis de calculer l'aire de cette couche et donc la surface spécifique de la poudre. La surface spécifique des nanorubans de titanates vaut 25 ± 10 m².g⁻¹. Pour obtenir un résultat précis, une étape préliminaire de dégazage de 3h à 300°C sous vide primaire ($\approx 0,1$ mbar) permettant d'éliminer l'eau physisorbée, a été réalisée. Cependant, la méthode BET étant inadaptée pour des particules non sphériques, l'incertitude sur le calcul de la surface spécifique des rubans reste très importante. L'allure de l'isotherme d'adsorption/désorption donne également des informations sur les caractéristiques morphologiques des rubans (figure 179). L'isotherme d'adsorption/désorption est de type II, synonyme d'une adsorption multi-moléculaire, ce qui induit que les nanorubans sont des adsorbants non poreux (Rouquerol *et al.* 2003).

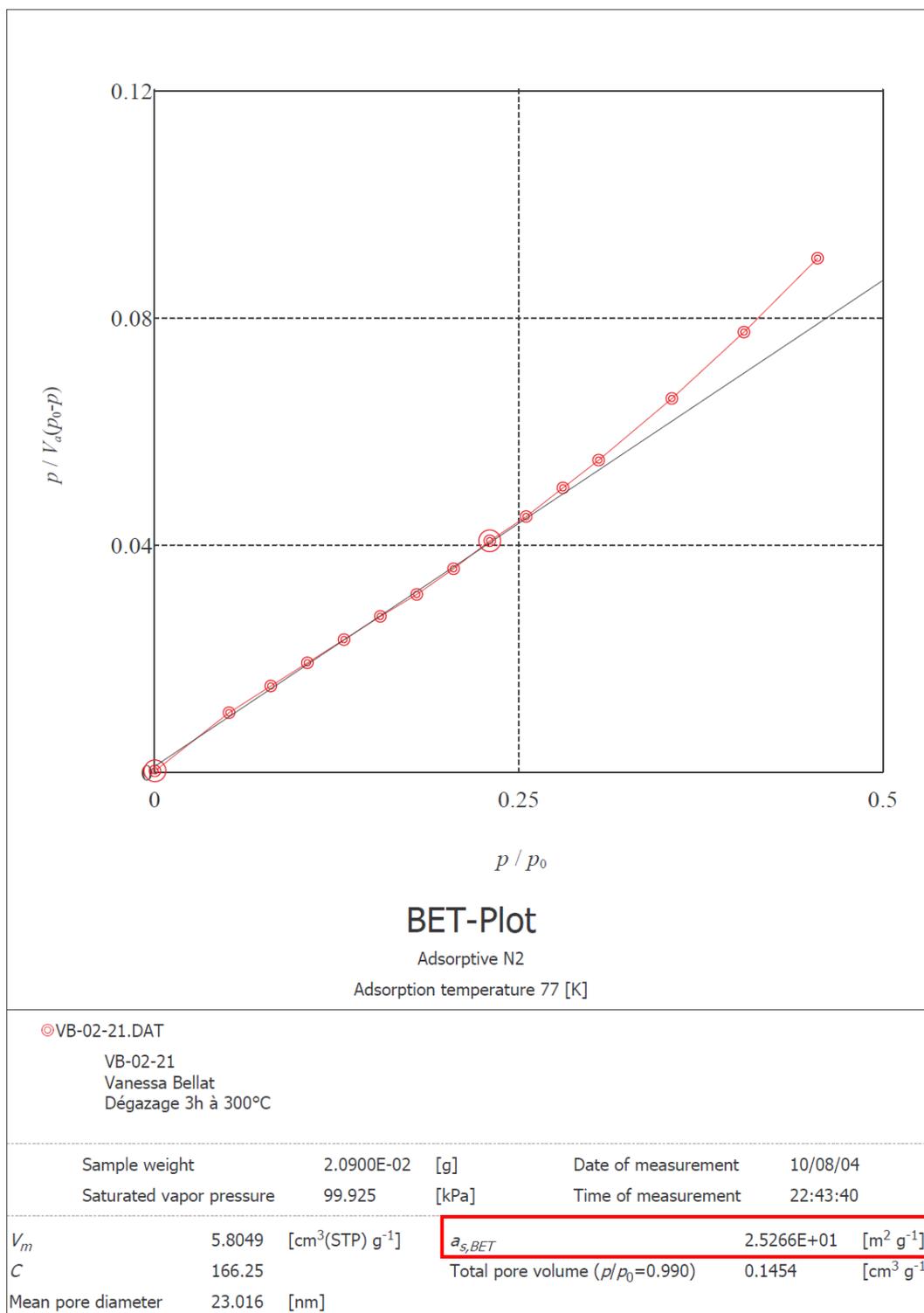


Figure 178 : Isotherme d'adsorption des nanorubans de titanates synthétisés dans des conditions de réaction optimisées (440 mg TiO₂ P25, 110 mL solution de soude 10M, étape de sonication (30 min, 375 W), 180°C, 20h, 7 bar, 150 tours.min⁻¹).

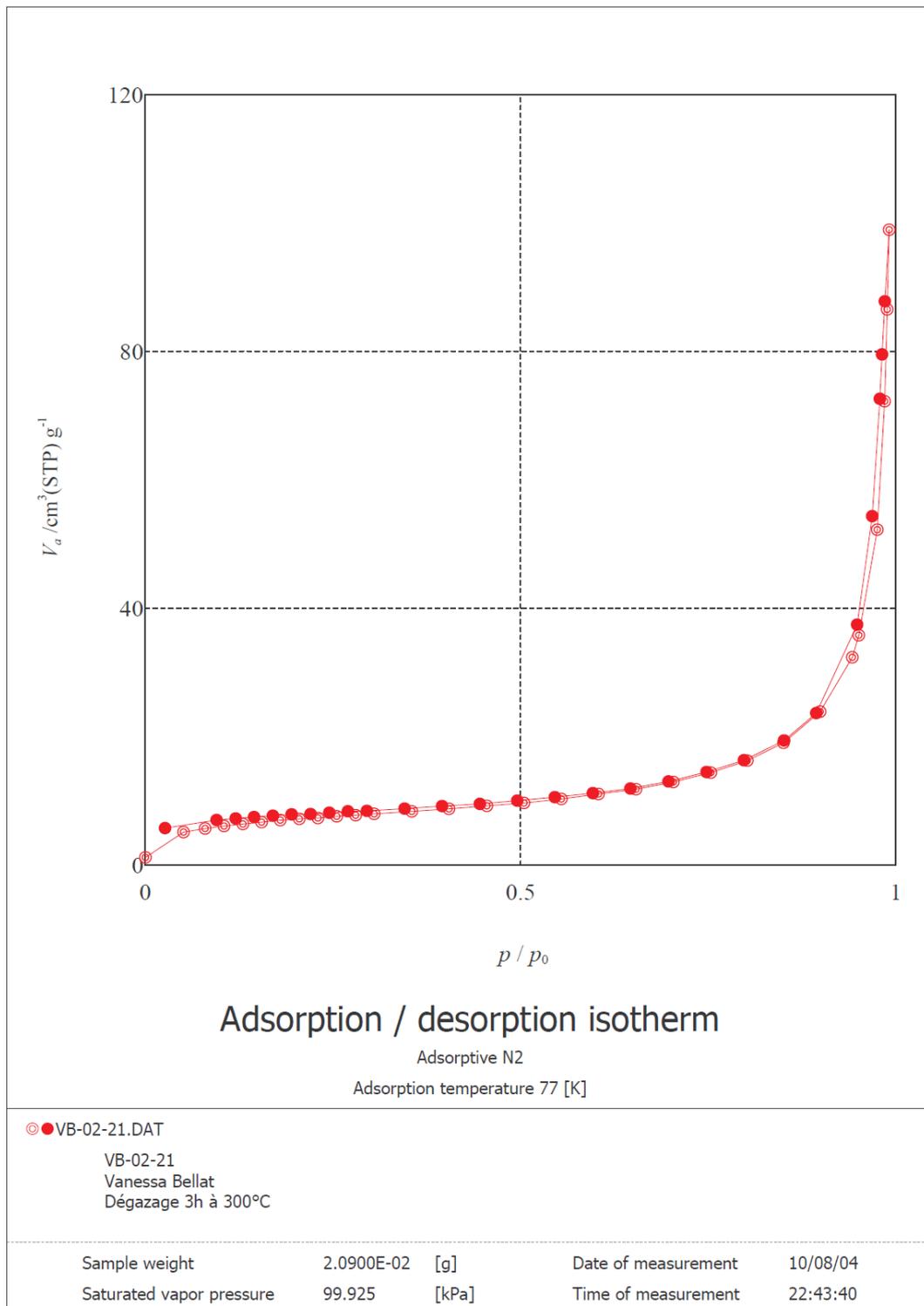


Figure 179 : Isotherme d'adsorption/désorption (type II) des nanorubans de titanates synthétisés dans des conditions de réaction optimisées (440 mg TiO₂ P25, 110 mL solution de soude 10M, étape de sonication (30 min, 375 W), 180°C, 20h, 7 bar, 150 tours.min⁻¹).

Annexe 9 : Protocole d'utilisation du TCEP

INSTRUCTIONS

Thermo
SCIENTIFIC

Immobilized TCEP Disulfide Reducing Gel

77712

1325.2

Number	Description
77712	<p>Immobilized TCEP Disulfide Reducing Gel, 5 ml of gel (10 ml of 50% slurry in ultrapure water). TCEP (Tris[2-carboxyethyl] phosphine hydrochloride) immobilized onto 4% crosslinked beaded agarose.</p> <p>Loading: Gel has an effective (functional) TCEP concentration > 8 mM (i.e., 8 μmol/ml of gel).</p> <p>Storage: Upon receipt store at 4°C. Product is shipped at ambient temperature. Do not freeze.</p>

Introduction

Trialkylphosphines are highly effective agents for reducing disulfide bonds in proteins, peptides and other disulfide bond-containing molecules^{1,2} and are relatively non-reactive toward other functional groups.² The trialkylphosphine TCEP was first described by Levison *et al.*³ as an odorless and efficient reductant of alkyl disulfides over a wide pH range. TCEP is stable in aqueous solutions and does not undergo the rapid oxidation that often occurs with other reducing agents such as dithiothreitol (DTT) and β-mercaptoethanol (BME, 2-ME).⁴ TCEP does not interfere with commonly used sulfhydryl-reactive reagents (e.g., maleimide crosslinkers).⁵ Nevertheless, many protocols require recovery of the reduced sample separate from the reducing agent. The Thermo Scientific Immobilized TCEP Disulfide Reducing Gel eliminates the need to use laborious and troublesome gel filtration methods to separate the reduced sample from the reducing agent.

Immobilized TCEP Disulfide Reducing Gel may be adapted conveniently to a variety of scales and formats. Examples are

given for batch, spin cup column and gravity-flow column procedures. For small-scale reductions, the most complete sample recovery is made using the spin-cup column procedure (see Related Products Section).

Important Product Information

- Disulfide reduction occurs over a wide range of pH (pH 4.0-9.0) and temperature (0-95°C).
- Reduction can be performed in most buffers, as well as in ultrapure water.
- Most proteins will be reduced sufficiently without adding a denaturant such as guanidine•HCl; however, to ensure complete reduction, adding a denaturant will aid in exposing internal disulfides to the Immobilized TCEP.
- Protein type and concentration will ultimately determine the incubation time (Table 1).

Table 1. Suggested incubation times for reducing proteins at room temperature.

Sample Concentration	Incubation Time
< 0.1 mg/ml	15 minutes
0.1-0.5 mg/ml	30 minutes
0.5-0.9 mg/ml	45 minutes
> 1 mg/ml	1 hour

- Optimize incubation time by monitoring time-point aliquots for sulfhydryls using Ellman's Reagent (Product No. 22582).
- Do not allow metals (spatulas, etc.) to contact the Immobilized TCEP as this will decrease its activity.
- Including 5-20 mM EDTA in the sample buffer during reduction will help prevent oxidation of generated sulfhydryl groups. Furthermore, adding EDTA (5-20 mM) to the sample buffer will help maintain activity of the Immobilized TCEP by chelating divalent metals such as Zn²⁺, Cu²⁺ and Mg²⁺, which otherwise will lower its activity.
- The tendency of -SH groups to reform disulfides after reduction is dependent on the concentration of free -SH groups generated and the elapsed time after reduction. Therefore, perform procedures using the reduced sample immediately after TCEP reduction.

Pierce Biotechnology
3747 N. Meridian Road

PO Box 117
Rockford, IL 61105 USA

(815) 988-0747
(815) 988-7318 fax

www.thermo.com/pierce

Procedure for Reduction in Batch Format (for 20-750 μ l samples)

1. Add a volume of TCEP reducing gel slurry equal to one to two times the volume of sample to a microcentrifuge tube. For example, use 25-50 μ l of mixed slurry for a 25 μ l protein/peptide sample.
2. Centrifuge the tube at $\sim 1,000 \times g$ for 1 minute. Remove and discard the supernatant. If desired, the gel may be washed several times with sample buffer before adding sample to the tube. For example, add buffer, vortex briefly to resuspend gel, briefly centrifuge the tube and remove the supernatant.
3. Add protein/peptide solution to the washed gel. Vortex the tube and incubate the solution for the desired time and temperature (Table 1). For longer incubations, it may be helpful to place the tube on a rotating wheel or rocker platform to keep the gel in suspension.
4. Centrifuge the tube for 1 minute. Recover the supernatant containing the reduced protein/peptide.
Note: Some loss of sample within the pelleted gel volume will occur. Although it will be diluted, additional sample can be recovered by washing the gel with buffer.
5. If desired, determine reduction efficiency (quantity of free -SH groups) by either Ellman's Reagent (Product No. 22582) or SDS-PAGE using non-reducing conditions.

Procedure for Reduction in Spin-cup Columns (for 50-750 μ l samples)

1. Add an appropriate amount of mixed TCEP reducing gel slurry to a spin-cup column (Product No. 69700) placed in a microcentrifuge tube (Product No. 69715). Use a volume of TCEP slurry equal to one to two times the volume of sample. For example, add 50-100 μ l of mixed slurry to the spin cup for a 50 μ l protein/peptide sample.
Note: For 300-750 μ l sample volumes, perform the reduction (incubation of sample with the gel) in a microcentrifuge tube as in the batch method described above. After incubation, transfer the gel/sample slurry in 400 μ l portions to a spin-cup column to recover the sample as in step 4 below.
2. Centrifuge at 1,000 rpm in a microcentrifuge ($\sim 50 \times g$) for 30 seconds. Remove and discard the supernatant. If desired, the gel may be washed several times with sample buffer before adding sample to the tube: add buffer, vortex briefly to resuspend gel, centrifuge and discard flow-through.
3. Apply the sample to the top of the gel in the spin cup. Gently vortex or mix the sample and gel, and incubate sample for the appropriate time (see Table 1). For longer incubations, it may be helpful to place the tube on a rotating wheel or rocker platform to keep the gel in suspension.
4. Place the spin cup in a new tube and centrifuge at $\sim 50 \times g$ for 1 minute. The collected flow-through is the reduced sample.
5. If desired, determine reduction efficiency (quantity of free -SH groups) by either Ellman's Reagent (Product No. 22582) or SDS-PAGE using non-reducing conditions.

Procedure for Reduction in Gravity-flow Columns (for > 250 μ l samples)

1. Choose a column size appropriate for a volume of TCEP reducing gel equal to at least two times the volume of sample.
2. With the lower column disc and bottom cap in place, gently pour the appropriate volume of gel slurry into the column. For example, pour 3 ml of mixed slurry to obtain a settled gel of 1.5 ml. Avoid creating air bubbles during filling. Allow gel to settle, add a top column disc if desired, then remove the bottom cap to drain the water.
Note: Do not allow buffer to drain below the top of the gel bed to avoid introducing air bubbles, which will decrease flow rate and reduce capacity.
3. If desired, wash gel with two column volumes of ultrapure water or buffer.
4. Apply peptide or protein sample to the column. Cap the bottom of the column when the entire sample has entered the gel bed. Incubate column for desired time and temperature (Table 1). For peptide reduction, only 15 minutes is required.
5. Recover the sample from the column with buffer. Collect fraction volumes appropriate to the prepared column size. For example, collect 0.5-1 ml fractions from a 2 ml column to which 1 ml of sample was applied. Determine which fractions contain protein by measuring the absorbance at 280 nm relative to a buffer blank.
6. If desired, determine reduction efficiency (quantity of free -SH groups) by either Ellman's Reagent (Product No. 22582) or SDS-PAGE using non-reducing conditions.

Procedure for Testing the Reducing Activity of the TCEP Disulfide Reducing Gel

This simple test can be performed to quantitate the amount of active TCEP on the gel. Additional reagents needed to perform this test are Ellman's Reagent (Product No. 22582) and free TCEP (Product No. 20490).

1. Prepare 10 ml of a solution containing 40 mg (10 mM) Ellman's Reagent in 100 mM Tris Buffer, pH 7.5. Allow 1 hour for the Ellman's Reagent to completely dissolve in the Tris Buffer at room temperature.
2. Prepare five free TCEP (Product No. 20490) standards as follows:
 - Standard 1 (20 mM TCEP): Dissolve 57.5 mg free TCEP in 10 ml of ultrapure water
 - Standard 2 (4 mM TCEP): Dilute standard 1 with ultrapure water (2 ml standard 1 + 8 ml ultrapure water)
 - Standard 3 (2 mM TCEP): Dilute standard 2 with ultrapure water (5 ml standard 2 + 5 ml ultrapure water)
 - Standard 4 (1 mM TCEP): Dilute standard 3 with ultrapure water (5 ml standard 3 + 5 ml ultrapure water)
 - Standard 5 (0.5 mM TCEP): Dilute standard 4 with ultrapure water (5 ml standard 4 + 5 ml ultrapure water)
3. Combine 990 μ l of the Ellman's Reagent solution with 10 μ l of each TCEP standard. Measure the absorbance at 412 nm for each.
4. Combine 990 μ l of the Ellman's Reagent solution with 10 μ l of Immobilized TCEP Disulfide Reducing Gel slurry and measure the absorbance at 412 nm.

Note: Wait for 1 minute after mixing before reading the absorbance to allow gel to settle to the bottom of the cuvette, where it will not interfere with absorbance measurement.
5. Prepare a standard curve for the TCEP standards. Determine the concentration of active TCEP immobilized on the gel by reference to the standard curve.

Note: Because the immobilized TCEP is 50% slurry, the actual concentration of active TCEP is approximately twice the values estimated by reference to the standard curve.

Troubleshooting

Problem	Possible Cause	Solution
Incomplete reduction of sample	Insufficient amount of gel used	Use the recommended amount of gel
	Insufficient incubation time	For proteins, incubate for the recommended time. For peptides, attempt a brief incubation
	Disulfides not accessible in protein	Include a denaturant such as guanidine•HCl (Product No. 24115) in the buffer Note: Do not use urea because it can form cyanates that will readily react with free sulfhydryl groups.
	Excessive incubation time	Do not exceed a 2 hour incubation
Reducing capacity of gel is diminished, as determined by testing with Ellman's Reagent (see below)	Product more than 1 year old	Purchase new product
	Product stored in buffer (e.g., PBS) rather than as provided in ultrapure water	
	Product exposed to metals (in a storage buffer or by contact with metal utensils)	
Loss of overall protein/peptide	Batch method used	Use spin cup column procedure
	Collected incorrect fractions from column	Check other fractions for protein
	Protein binds nonspecifically to the agarose resin support	Modify the buffer used (e.g., increase salt content or alter the pH of buffer, or use 10-30% DMSO)

Related Thermo Scientific Products

69700	Pierce Spin Cups – Paper Filter, 50 columns
69705	Pierce Spin Columns – Screw Cap with Luer-Lok Adapters, 25 columns
29922	Disposable Polypropylene Columns, for 1-5 ml bed volumes, 100 columns
89868	Pierce Centrifuge Columns, 0.8 ml capacity, 50 columns
89896	Pierce Centrifuge Columns, 2 ml capacity, 25 columns
89897	Pierce Centrifuge Columns, 5 ml capacity, 25 columns
89898	Pierce Centrifuge Columns, 10 ml capacity, 25 columns
22582	Ellman's Reagent, 5 g
20490	TCEP•HCl, 1 g
24115	Guanidine•HCl Solution (8 M), 200 ml

References

1. Ruegg, U.T. and Rudinger, J. (1977). Reductive cleavage of cystine disulfides with tributylphosphine. *Methods Enzymol.* 47:111-26.
2. Kirley, T.L. (1989). Reduction and fluorescent labeling of cyst(e)ine-containing proteins for subsequent structural analysis. *Anal. Biochem.* 180:231.
3. Levison, M.E., *et al.* (1969). Reduction of biological substances by water-soluble phosphines: Gamma-globulin. *Experientia* 25:126-7.
4. Han, J.C., *et al.* (1994). A procedure for quantitative determination of Tris(2-carboxyethyl)phosphine, an odorless reducing agent more stable and effective than dithiothreitol. *Anal. Biochem.* 220:5-10.
5. Haugland, R.P. and Blalgat, M.K. (1998). Preparation of Avidin Conjugates. In J.D. Pound (ed.) *Immunological Protocols*, Humana Press Inc., Totowa, NJ, 80:189-90.

This product ("Product") is warranted to operate or perform substantially in conformance with published Product specifications in effect at the time of sale, as set forth in the Product documentation, specifications and/or accompanying package inserts ("Documentation") and to be free from defects in material and workmanship. Unless otherwise expressly authorized in writing, Products are supplied for research use only. No claim of suitability for use in applications regulated by FDA is made. The warranty provided herein is valid only when used by properly trained individuals. Unless otherwise stated in the

Documentation, this warranty is limited to one year from date of shipment when the Product is subjected to normal, proper and intended usage. This warranty does not extend to anyone other than the original purchaser of the Product ("Buyer").

No other warranties, express or implied, are granted, including without limitation, implied warranties of merchantability, fitness for any particular purpose, or non infringement. Buyer's exclusive remedy for non-conforming Products during the warranty period is limited to replacement of or refund for the non-conforming Product(s).

There is no obligation to replace Products as the result of (i) accident, disaster or event of force majeure, (ii) misuse, fault or negligence of or by Buyer, (iii) use of the Products in a manner for which they were not designed, or (iv) improper storage and handling of the Products.

Current versions of product instructions are available at www.thermo.com/pierce. For a faxed copy, call 800-874-3723 or contact your local distributor.

© 2010 Thermo Fisher Scientific Inc. All rights reserved. Unless otherwise indicated, all trademarks are property of Thermo Fisher Scientific Inc. and its subsidiaries. Printed in the USA.

Annexe 10 : Protocole d'utilisation du test d'Ellman

INSTRUCTIONS

Thermo
SCIENTIFIC

Ellman's Reagent

22582

0311.3

Number	Description
22582	Ellman's Reagent, 5,5'-Dithio-bis-(2-nitrobenzoic acid), 5g Molecular Weight: 396.35 CAS #: 69-78-3

Storage: Store product protected from moisture at 4°C. Product is shipped at ambient temperature.

Table of Contents

Introduction	1
Procedure for Quantitating Sulfhydryl Groups Using a Cysteine Standard.....	2
Procedure for Quantitating Sulfhydryl Groups Based on Molar Absorptivity.....	2
Troubleshooting.....	3
Related Thermo Scientific Products	3
Additional Information.....	4
Cited References.....	4

Introduction

In 1959 Ellman¹ introduced 5,5'-dithio-bis-(2-nitrobenzoic acid), also known as DTNB, as a versatile water-soluble compound for quantitating free sulfhydryl groups in solution (Figure 1, see Additional Information section). A solution of this compound produces a measurable yellow-colored product when it reacts with sulfhydryls. Consequently, Thermo Scientific Ellman's Reagent is very useful as a sulfhydryl assay reagent because of its specificity for -SH groups at neutral pH, high molar extinction coefficient and short reaction time.

DTNB reacts with a free sulfhydryl group to yield a mixed disulfide and 2-nitro-5-thiobenzoic acid (TNB; see Figure 2). The target of DTNB in this reaction is the conjugate base (R-S⁻) of a free sulfhydryl group. Therefore, the rate of this reaction is dependent on several factors:² 1) the reaction pH, 2) the pKa' of the sulfhydryl and 3) steric and electrostatic effects. TNB is the "colored" species produced in this reaction and has a high molar extinction coefficient in the visible range. The molar extinction coefficient of TNB was originally reported to be 13,600M⁻¹cm⁻¹ at 412nm and pH 8.0.¹ Consequently, this value has been cited frequently in the literature. Later studies have shown, however, that the molar extinction coefficient is more accurately reflected by a value of 14,150M⁻¹cm⁻¹ at 412nm.^{2,3} The extinction of TNB is not affected by changes in pH between 7.6 and 8.6.³ However, the extinction of TNB is different in other solvents (Table 1).

Sulfhydryl groups may be estimated in a sample by comparison to a standard curve composed of known concentrations of a sulfhydryl-containing compound such as cysteine. Alternatively, sulfhydryl groups may be quantitated by reference to the extinction coefficient of TNB. Both methods are presented in these instructions.

Ellman's Reagent may be used for applications other than the estimation of sulfhydryls in solution. It has been used for the determination of alkylthiols by HPLC using a pre-column derivatization procedure⁴ and to study thiols in the active site of several enzymes including thiolase,⁵ fatty acid synthase⁶ and mevalonate 5-diphosphate decarboxylase.⁷

Pierce Biotechnology
3747 N. Meridian Road

PO Box 117
Rockford, IL 61105 USA

(815) 968-0747
(815) 968-7318 fax

www.thermoscientific.com/pierce

Procedure for Quantitating Sulfhydryl Groups Using a Cysteine Standard

A. Material Preparation

- Reaction Buffer: 0.1M sodium phosphate, pH 8.0, containing 1mM EDTA
- Cysteine Hydrochloride Monohydrate: M.W. = 175.6, Product No. 44889 (see Related Thermo Scientific Products)
- Ellman's Reagent Solution: Dissolve 4mg Ellman's Reagent in 1mL of Reaction Buffer.

B. Procedure

1. Prepare a set of cysteine standards by dissolving Cysteine Hydrochloride Monohydrate at the following concentrations in Reaction Buffer:

Standard	Volume of Reaction Buffer	Amount of Cysteine (M.W. = 175.6)	Final Concentration
A	100mL	26.34mg	1.5mM
B	5mL	25mL of Standard A	1.25mM
C	10mL	20mL of Standard A	1.0mM
D	15mL	15mL of Standard A	0.75mM
E	20mL	10mL of Standard A	0.5mM
F	25mL	5mL of Standard A	0.25mM
G	30mL	0ml	0.0mM (Blank)

2. Prepare a set of test tubes, each containing 50 μ L of Ellman's Reagent Solution and 2.5mL of Reaction Buffer.
3. Add 250 μ L of each standard or unknown to the separate test tubes prepared in step 2.

Note: For the unknown(s), make dilutions so that the 250 μ L sample applied to the assay reaction has a sulfhydryl concentration in the working range of the standard curve (0.1-1.0mM is ideal).

4. Mix and incubate at room temperature for 15 minutes.
5. Measure absorbance at 412nm.
6. Plot the values obtained for the standards to generate a standard curve. Determine the experimental sample concentrations from this curve.

Note: The most accurate results are obtained from the linear portion of the standard curve; i.e. the portion yielding an r^2 value equal to 1.0. One or more of the high standards may exceed the linear range.

Procedure for Quantitating Sulfhydryl Groups Based on Molar Absorptivity

A. Material Preparation

- Reaction Buffer: 0.1M sodium phosphate, pH 8.0, containing 1mM EDTA
- Ellman's Reagent Solution: Dissolve 4mg Ellman's Reagent in 1mL of Reaction Buffer.

B. Measure Absorbance

1. For each unknown sample to be tested, prepare a tube containing 50 μ L of Ellman's Reagent Solution and 2.5mL of Reaction Buffer.
2. Add 250 μ L of each unknown to the separate test tubes prepared in step 1. As a blank, add 250 μ L of Reaction Buffer to a separate test tube prepared in Step 1.

Note: For the unknown(s), make dilutions so that the 250 μ L sample applied to the assay reaction has a sulfhydryl concentration less than 1.0mM. Concentrations exceeding 1mM free sulfhydryl will result in high absorbance values and less accurate estimation of the concentration based on the extinction coefficient.

3. Mix and incubate at room temperature for 15 minutes.
4. With a spectrophotometer set to 412nm, zero the instrument on the blank and then measure absorbance of each sample.
5. Calculate the amount and concentration of sulfhydryls in the sample from the molar extinction coefficient of TNB (14,150M⁻¹cm⁻¹), as exemplified in Section C.

C. Example Calculation of the Free Sulphydryl Concentration

A 250µL aliquot of the unknown mixed with 2.5mL of Reaction Buffer and 50µL of Ellman's Reagent Solution gave an absorbance of 0.879 (after subtracting the blank) using a 1cm spectrophotometric cuvette. Calculate the sulphydryl concentration in µmoles per mL of unknown. The reported molar absorptivity (molar extinction coefficient, which is expressed in units of M⁻¹cm⁻¹) of TNB in this buffer system at 412nm is 14,150.² Molar absorptivity, E, is defined as follows:

$$E = \frac{A}{bc} \text{ where } A = \text{absorbance, } b = \text{path length in centimeters, } c = \text{concentration in moles/liter (=M)}$$

Solving for concentration gives the following formula: $c = \frac{A}{bE}$

In the present example, $A = 0.879$, $b = 1\text{cm}$ and $E = 14,150\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Therefore, $c = \frac{0.879}{1(14,150)} = 6.21 \times 10^{-5}\text{M}$

This value represents the concentration of the solution in the spectrophotometric cuvette. To calculate the concentration of the unknown sample, it is necessary to account for dilution factors as follows:

The total volume of the solution being measured is

2.50mL of Reaction Buffer
+ 0.25mL of Unknown Sample
+ 0.05mL of Ellman's Reagent Solution
2.80mL of solution

If the concentration of the assay solution is $6.21 \times 10^{-5}\text{M}$, then 2.80mL of that solution contains

$$2.80\text{mL} \times \frac{1\text{L}}{1000\text{mL}} \times (6.21 \times 10^{-5} \text{ moles/L}) = 1.74 \times 10^{-7} \text{ moles}$$

These 1.74×10^{-7} moles of sulphydryl in the assay solution were contributed by the original 0.25mL sample. Therefore, the concentration of free sulphydryl in the original unknown sample is

$$\frac{1.74 \times 10^{-7} \text{ moles}}{0.25\text{mL}} \times \frac{1000\text{mL}}{\text{L}} = 6.96 \times 10^{-4} \text{ M}$$

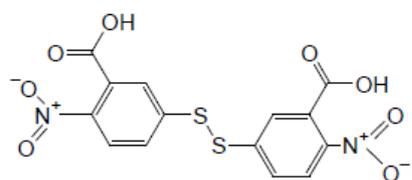
Troubleshooting

Problem	Possible Cause	Solution
Sulphydryl content is lower than expected	Sulphydryls in sample are not in reduced (free) state; i.e., have become oxidized	Minimize time delay between assay of sample and its use in applications that depend on its free sulphydryl content
		Maintain 1-5mM EDTA in sample to chelate divalent metal ions, which can oxidize sulphydryls
		Ensure reduction of sulphydryls using a reducing agent (see Related Thermo Scientific Products)

Related Thermo Scientific Products

- 44889 Cysteine•HCl•H₂O, 5g, M.W. 175.6
77712 Immobilized TCEP Disulfide Reducing Gel, 5mL
44999 SulfoLink[®] Immobilization Kit for Peptides, 2mL

Additional Information



Ellman's Reagent;
5,5'-Dithio-bis-(2-nitrobenzoic acid)
C₁₄H₈N₂O₈S₂
Mol. Wt.: 396.35

Figure 1. Structure of Ellman's Reagent

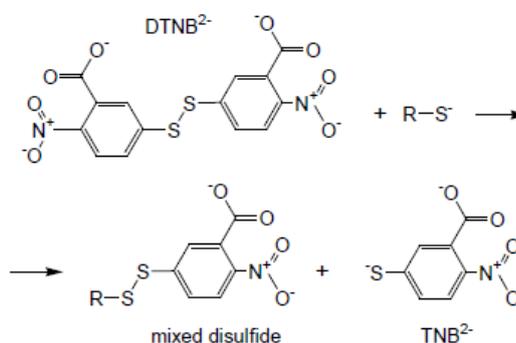


Figure 2. Reduction of Ellman's Reagent

Table 1. Molar extinction coefficients of Ellman's Reagent in various solvents

Solvent	E at 412nm
2% SDS	12,500
0.1M phosphate, pH 8.0, 1mM EDTA	14,150
Buffered 6M guanidine hydrochloride	13,700
6M guanidine hydrochloride	13,880
8M urea	14,290

Cited References

1. Ellman, G.L. (1959) Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem Biophys* 82:70-7.
2. Riddles, P.W., et al. (1983) Reassessment of Ellman's reagent. *Meth Enzymol* 91:49-60.
3. Riddles, P.W., et al. (1979) Ellman's reagent: 5, 5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid) - a reexamination. *Anal Biochem* 94:75-81.
4. Kuwata, K., et al. (1982) Liquid chromatographic determination of alkylthiols via derivatization with 5, 5'- dithiobis(2-nitrobenzoic acid). *Anal Chem* 54:1082-7.
5. Masamune, S., et al. (1989) Bio-Claisen condensation catalyzed by thiolase from *Zoogloea ramigera*. Active site cysteine residues. *Chemtracts-Organic Chem* 2:247-51.
6. Tsukamoto, Y. and Wakil, S.J. (1988) Isolation and mapping of the β-hydroxyacyl dehydratase activity of chicken liver fatty acid synthase. *J Biol Chem* 263:16225-9.
7. Alvear, M., et al. (1989) Fractionation of chicken liver mevalonate 5-diphosphate decarboxylase by sulfhydryl-directed reagents: evidence of a functional dithiol. *Biochem Biophys Acta* 994:7-11.

This product ("Product") is warranted to operate or perform substantially in conformance with published Product specifications in effect at the time of sale, as set forth in the Product documentation, specifications and/or accompanying package inserts ("Documentation") and to be free from defects in material and workmanship. Unless otherwise expressly authorized in writing, Products are supplied for research use only. No claim of suitability for use in applications regulated by FDA is made. The warranty provided herein is valid only when used by properly trained individuals. Unless otherwise stated in the Documentation, this warranty is limited to one year from date of shipment when the Product is subjected to normal, proper and intended usage. This warranty does not extend to anyone other than the original purchaser of the Product ("Buyer").

No other warranties, express or implied, are granted, including without limitation, implied warranties of merchantability, fitness for any particular purpose, or non infringement. Buyer's exclusive remedy for non-conforming Products during the warranty period is limited to replacement of or refund for the non-conforming Product(s).

There is no obligation to replace Products as the result of (i) accident, disaster or event of force majeure, (ii) misuse, fault or negligence of or by Buyer, (iii) use of the Products in a manner for which they were not designed, or (iv) improper storage and handling of the Products.

Current product instructions are available at www.thermoscientific.com/pierce. For a faxed copy, call 800-874-3723 or contact your local distributor.

© 2011 Thermo Fisher Scientific Inc. All rights reserved. Unless otherwise indicated, all trademarks are property of Thermo Fisher Scientific Inc. and its subsidiaries. Printed in the USA.

Annexe 11 : Les différents collagènes formant la matrice extracellulaire

Group	Distribution/Function	Genetic Disease(s)	Other disease(s)
Collagens			
Fibrillar collagens			
I	Structural component of all tissues except cartilage; e.g. bone, dermis (Gelse et al., 2003), vessel wall (Katsuda et al., 1992; Rautenberg et al., 1993), and heart (Marijanowski et al., 1994)	Osteogenesis imperfecta (Bomadio and Byers, 1985); classic type Ehlers-Danlos syndrome (Nyttinck et al., 2000)	Atherosclerosis (Katsuda et al., 1992; Rautenberg et al., 1993); hypertensive heart disease (López et al., 2001; Diez et al., 2005); fibrotic diseases including chronic kidney diseases (Alexakis et al., 2006)
II	Predominant component of cartilage (Bruckner and van der Rest, 1994); mediates interactions with proteoglycans (Mayne, 1989)	Stickler syndrome type I (Maumenee, 1979; Ahmad et al., 1991); spondyloepiphyseal dysplasia (Tiller et al., 1995); achondrogenesis (Eyre et al., 1986); Kniest dysplasia (Winterpacht et al., 1993)	Osteoarthritis (Nelson et al., 1998)
III	Dominant collagen type of granulation tissue, and also, e.g., muscles and artery wall (Katsuda et al., 1992; Linehan et al., 2001); produced by young fibroblasts before type I collagen (Voermans et al., 2008)	Vascular Ehlers-Danlos syndrome (Pope et al., 1975; Pepin et al., 2000)	Atherosclerosis (Katsuda et al., 1992); hypertensive heart disease (Diez et al., 2005); fibrotic diseases, e.g. chronic kidney diseases (Alexakis et al., 2006)
V	Structural component of basement membrane (Graham et al., 2008); interacts with type I collagen (Birk, 2001); inhibits endothelial cell adhesion, proliferation (Fukuda et al., 1988), and adhesion (Hashimoto et al., 1991)	Classic type Ehlers-Danlos syndrome (Nicholls et al., 1996; Richards et al., 1998)	Atherosclerosis (Katsuda et al., 1992); collagenofibrotic glomerulopathy (Morita et al., 2003); bronchiolitis obliterans syndrome (Burlingham et al., 2007)
XI	Structural component of articular cartilage (Mayne, 1989) and ear (Nerlich, 1995); modulates cartilage matrix homeostasis (Eyre, 2004)	Stickler syndrome type II (Richards et al., 1996) and type III (Brunner et al., 1994); Marshall syndrome (Majava et al., 2007b); otospondyloomegacriophyseal dysplasia (Melkoniemi et al., 2000)	Disc herniation (Mio et al., 2007)
Nonfibrillar collagens			
IV	Structural component of basement membrane (LeBleu et al., 2007); e.g., in kidney (Smith et al., 1989); associated with angiogenesis (Xu et al., 2001)	Alport syndrome (Barker et al., 1990); hereditary angiopathy (Breedveld et al., 2006)	Diabetic nephropathy (Cohen et al., 2001); organ or tumor fibrosis (Kalluri, 2003); cancer progression (Tanjore and Kalluri, 2006)
VIII	Structural component of extracellular matrices, e.g. in sclera (Shuttleworth, 1997) and vasculature (Plenz et al., 2003); involved in stabilization of membranes, angiogenesis and interacts with ECM molecules (Suttmoller et al., 1997; Plenz et al., 2003)	Corneal endothelial dystrophy, e.g., Fuchs' endothelial dystrophy (Biswas et al., 2001)	Atherosclerosis (Plenz et al., 2003); tumor progression (Koon et al., 2004)
X	Structural component of hypertrophic cartilage (Gelse et al., 2003); regulates matrix mineralization and compartmentalization of ECM components (Shen, 2005)	Schmid-type metaphyseal chondroplasia (Warman et al., 1993)	Osteochondritis dissecans (Aurich et al., 2006)
Association collagens			
VI	Dominant structural component of connective tissue; e.g., in vessels, liver (von der Mark et al., 1984), and muscle (Engvall et al., 1986)	Muscle disorders, e.g., myosclerosis myopathy (Merlini et al., 2008b)	Atherosclerosis (Katsuda et al., 1992)
VII	Structural component of basement membrane (Sakai et al., 1986); interacts with other ECM components (Keene et al., 1987)	Dystrophic epidermolysis bullosa (Hovnanian et al., 1992)	Epidermolysis bullosa acquisita (Chen et al., 2007)

Group	Distribution/Function	Genetic Disease(s)	Other disease(s)
IX	Structural component of cartilage (Olsen, 1997); interacts with collagen type II (Eyre, 2004)	Stickler syndrome (Van Camp et al., 2006); multiple epiphyseal dysplasia (Bönnemann et al., 2000); Scheuermann disease (Karppinen et al., 2003)	
XII	Structural component of connective tissue, e.g., in skin (Wälchli et al., 1994); interacts with other matrix components (Voermans et al., 2008)		Diabetic retinopathy (Ljubimov et al., 1996); keratoconus (Cheng et al., 2001)
XIV	Structural component of connective tissue, e.g., in blood vessels (Castagnola et al., 1992); interacts with other ECM components (Ehnis et al., 1997)		Diabetic retinopathy (Ljubimov et al., 1996)
XIX	Structural component of basement membrane (Myers et al., 1997); associated with muscle cells (Myers et al., 1999)		Rhabdomyosarcomas (Myers et al., 1999); breast cancer (Amenta et al., 2003)
Transmembrane collagens			
XIII	Structural component of, e.g., skin (Peltonen et al., 1999); interacts with other ECM components, e.g., proteoglycans (Michelacci, 2003)		Tumor development (Väisänen et al., 2005); thyroid-associated ophthalmopathy (Yamada et al., 2000)
XVII	Structural component of cutaneous basement membrane (Uitto and Pulkkinen, 1996); involved in cell-matrix adhesion (Van den Bergh and Giudice, 2003)	Non-Herlitz junctional epidermolysis bullosa (Bauer and Lanschuetzer, 2003)	
Multiplexins			
XV	Structural component of basement membrane (Myers et al., 1996); acts as structural organizer of ECM (Amenta et al., 2005)		Tumorigenesis (Amenta et al., 2003, Fukushima et al., 2005)
XVIII	Structural component of basement membrane (Saarela et al., 1998); inhibition angiogenesis and tumor growth (Myllyharju and Kivirikko, 2001)	Knobloch syndrome (Suzuki et al., 2002)	Fibrotic diseases, e.g., liver fibrosis (Musso et al., 1998)

Tableau 39 : Tableau récapitulatif des différentes espèces de collagène présentes dans la matrice extracellulaire d'après (Jarvelainen *et al.* 2009).

Annexe 12 : Préparation du PRP utilisé pour les tests d'agrégation plaquettaire

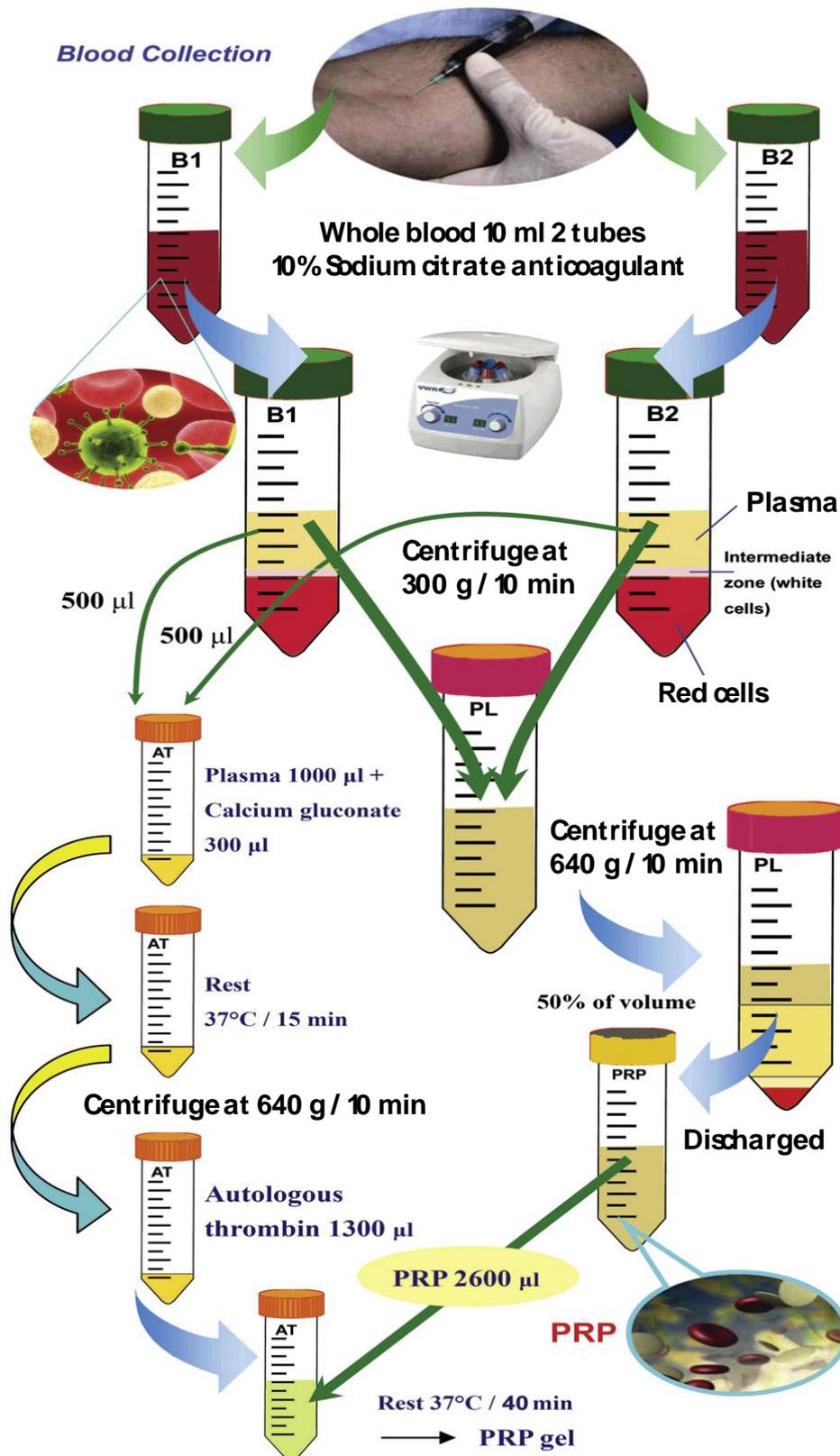


Figure 180 : Schéma illustrant la préparation du plasma riche en plaquette (PRP) d'après (Chen *et al.* 2010).

Annexe 13 : Protocole expérimental des modèles *in vivo* de cicatrisation

Echantillons testés :

- Souris SWISS mâles de 30-40g (10 pour le 1^{er} modèle et 20 pour le second modèle).
- Crème dépilatoire (*carrefour pour peau sensible*).
- Superglue (*colle liquide super rapide cyanoacrylate, carrefour*).
- Attèle en silicone de 13 mm de diamètre et 0.5 mm d'épaisseur (*Interchim ; lot: M0110M3 ; ref: FP-E07540*).
- PBS (*lonza ; ref: BE17-516F et lot: 1MB118*).
- Alginate de sodium à 7% (w/v) dans de l'eau stérile.
- Collagène III commercial à 3,52 µg/µL (*Biosciences ; réf: 354255; lot: 64547*).
- Gel commercial (*DuoDERM Hydrogel, Convatec, lot: OA01629*).
- Pansement Tégaderm (*matériel médical ; ref: 1309587000*).
- Fils de suture nylon 6-0 (*matériel médical ; ref: 1306201060*).
- Paracétamol (Doliprane 1000 mg).
- Collettertes commerciales (*Harvard Apparatus ; ref: PY2 72-0056*).

Déroulement de l'expérience :

- Rasage et épilation des souris (3j avant la manipe)
 - Les souris sont endormies à l'isoflurane dans la chambre à induction puis transférées vers le masque d'anesthésie (*Minerve ; ref: 5116230*).
 - Le dos des souris est largement rasé à l'aide de la tondeuse pour petit animal.
 - Le reste des poils est retiré à l'aide d'une crème dépilatoire commerciale : laisser agir le produit pendant 5 minutes, retirer la crème à l'aide de la spatule, puis rincer abondamment à l'eau tiède (passer le dos de la souris directement sous l'eau tiède du robinet. Attention à ne pas faire couler d'eau dans les oreilles des souris). Sécher les souris à l'aide de papier absorbant.
 - Remettre les souris dans leur cage, sous lampe chauffante.
- Analgésie des souris (préparation 3j avant et début de l'administration le matin à J0)
 - Pour éviter la souffrance post-chirurgie due à la réalisation des plaies dorsales, du paracétamol est ajouté dans l'eau de boisson, à raison de 100 mg/kg, soit 3,5 mg/j/souris de 35 g, soit au final 70 µL par biberon de la solution à 50mg/mL (un comprimé de 1000 mg dilué dans 20 mL d'eau et ajouté à 50 mL d'eau de boisson). Le tout est administré pendant 5 jours.
Remarque: Les biberons sont entourés de papier d'aluminium pour éviter la dégradation du paracétamol contenant un principe actif sensible à la lumière.
- Réalisation des plaies dorsale (journée J0)
 - Les souris sont anesthésiées à l'aide d'un mélange kétamine/xylazine injecté en intrapéritonéal:
 - 800 µL kétamine
 - 200 µL xylazine
 - 4 mL d'eau >>> 400 µL/souris de 30g

- Le dos des souris est désinfecté à l'aide de bétadine diluée au 1/10^{ème} dans du sérum physiologique.
- 2 plaies dorsales sont réalisées de part et d'autre de la colonne vertébrale à l'aide de punch de 6 mm de diamètre. **Faire les trous le plus haut possible sur le dos pour éviter que les souris se grattent avec les pattes arrières au risque d'enlever l'attèle.**

ATTENTION : *il faut juste enlever le derme et l'épiderme et ne pas trouser l'hypoderme (couche graisseuse) pour éviter que les solutions ne s'échappent par la plaie dans le corps de la souris !!!*

➤ **Mise en place de l'attèle et du pansement (journée J0) + prise de photos**

- Oter les angles des attèles en silicone pour pouvoir en mettre une par plaie.
- Appliquer en petite quantité la superglue sur l'attèle et centrer cette dernière sur la plaie.
- Coudre rapidement l'attèle à l'aide du fil de suture 6-0 (faire 4 points par attèle).
- S'assurer qu'il n'y a pas de fuite de l'attèle en ajoutant du sérum physiologique ou de l'eau sur les plaies.

NB : *hydrater régulièrement les plaies à l'aide de sérum physiologique pour qu'elles ne sèchent pas !!*

- Faire 2 groupes de 5 souris (1^{er} modèle de cicatrisation):
 - Groupe A :
 - Souris 1, 2 et 3 : rien sur la plaie de droite et gel commercial sur la plaie de gauche.
 - Souris 4 et 5 : rien sur la plaie de gauche et gel commercial sur la plaie de droite.
 - Groupe B :
 - Souris 6 et 7 : PBS sur la plaie de droite et alginate sur la plaie de gauche.
 - Souris 8, 9 et 10 : PBS sur la plaie de gauche et alginate sur la plaie de droite.
- Faire 2 groupes de 7 souris (2^{ème} modèle de cicatrisation) :
 - Groupe A :
 - Souris 1 à 7 : PBS sur la plaie de droite et PBS + 0,05% de coll3 sur la plaie de gauche.
 - Groupe B :
 - Souris 8 à 14 : alginate sur la plaie de droite et alginate + 0,05% de coll3 sur la plaie de gauche.

Remarque 1 : *Une souris est réalisée en plus dans chacun des 2 groupes au cas où certaines souris réussiraient tout de même à ronger leurs attèles malgré la collerette ou présenteraient un problème quelconque. C'est pour être sûr d'avoir n=2 pour chacun des 3 temps de prélèvement J3, J10 et J17. Donc si tout va bien, nous aurons n=3 pour le dernier temps de prélèvement à J17.*

Remarque 2 : Une souris supplémentaire (n°15) est prévue pour faire un « contrôle négatif » pour les marquages immunohistologiques. Cette souris est euthanasiée à J0 juste avant la réalisation des biopsies dorsales et les plaies sont prélevées et fixées en formol.

- Prendre une photo **plane** (réglage Av 800 en Macro ; hauteur de l'appareil sur 16 cm du côté droit de l'échelle) de chacune des 2 plaies pour chaque souris en prenant soin de les identifier (papier d'identification avant prise de chaque photo) pour avoir la surface de référence à J0.
- Appliquer ensuite les différents produits sur les plaies concernées :
 - o Pour le PBS, ajouter 20 μ L sur chaque plaie,
 - o Pour le gel commercial et l'alginate, déposer un peu de gel à l'aide d'un cône jaune pour recouvrir entièrement la plaie (environ 20 μ L).
- Une fois les produits appliqués sur les plaies, coller un morceau de Tégaderm sur l'attèle de chaque plaie pour que les produits restent en place et que les plaies restent propres.
- Remettre les souris dans des cages séparées pour éviter qu'elles ne se rongent leurs attèles entre elles.
- Afin d'éviter que les souris se coincent dans leur cage ou perdent leur collerette, les cages sont organisées de manière à ce que les souris aient de l'espace, plus particulièrement en hauteur, en retournant la grille présente sur le dessus de la cage, comme le montre la photo ci-dessous :



➤ Changement des pansements et prises de photos

- Observer les souris pour voir si le paracétamol fait bien effet (elles sont prostrées dans un coin de la cage si elles souffrent et mangent guère).
- Contrôler les attèles, les pansements, les collerettes, les yeux, les glandes salivaires et les plaies des souris.
- Arrêter le paracétamol au bout de 5j.
- Les souris sont endormies à l'isoflurane à chaque changement de pansement et prise de photo.
- Les pansements (PBS, alginate et gel commercial + Tégaderm) sont remplacés 2 fois par semaine (lundi et jeudi) jusqu'à cicatrisation complète (environ 15 jours). Pour ce faire :
 - o Les souris sont endormies sous isoflurane.
 - o Le pansement est lentement décollé de l'attèle à l'aide d'une pince (*faire très attention car le pansement colle également à la plaie*).

- Les plaies sont nettoyées à l'aide d'eau stérile et de cotons tiges, les yeux également si besoin.
- Sécher doucement les plaies à l'aide d'un coton tige et noter l'état de la plaie :
 - Plaie rouge = bourgeon, tissu de granulation,
 - Plaie jaune = tissu fibrineux,
 - Plaie noire = tissu nécrotique,
- Vérifier également qu'il n'y a pas de réaction inflammatoire au niveau de la peau à cause de la glue notamment (rougeurs sur la peau, boursoufflures),
- Les plaies sont prises en photo en les identifiant bien (*Av800/Macro, 16cm de haut*).
- Les produits sont ajoutés sur les plaies (*selon le n° de la souris : PBS/alginate avec HCl 0,01M ou PBS/alginate avec 0,05% de collagène de type III*).
- Des points de suture sont refaits et/ou de la colle est ré-appliquée au besoin.
- Les attèles et les plaies sont ensuite recouvertes de tégaderm une fois que les produits appliqués ont légèrement séché.
- Les souris sont ensuite remises individuellement dans leur cage.

➤ Prélèvement des tissus

- Les souris sont préalablement endormies rapidement à l'isoflurane avant injection en IP de 400 µL de pentobarbital sodique de manière à ne pas abimer les plaies en tenant les souris par la peau du cou pour réaliser l'injection. Cette méthode permet d'éviter de pratiquer une dislocation cérébrale qui risquerait d'abimer fortement les plaies et donc le prélèvement tissulaire.
- Euthanasier les souris par dislocation cervicale.
- Une fois le décès de la souris constaté, les plaies sont nettoyées et les poils du pourtour des plaies sont découpés au ciseau si besoin. Les fils de suture des attèles sont également coupés au ciseau et les attèles sont doucement décollées de la peau (*nettoyage des attèles pour récupération*).
- Les prélèvements de peau sont effectués en découpant un carré autour de la plaie (*cicatrice + tissu sain autour*), en prenant l'épiderme, le derme et l'hypoderme.
- Les prélèvements sont transférés sur une mousse dans une cassette histologique spécifique de ce type de prélèvements. Le tout est placé dans un flacon stérile contenant du PBS 1X. Les échantillons sont apportés en histologie où ils seront fixés 48h dans du formol 4%.

NB : pour éviter de respirer trop de vapeurs nuisibles (acétone, isoflurane, formol), on peut aussi découper largement la peau du dos des souris en prenant les deux plaies + attèles (attention de bien identifier la droite de la gauche !!!), les mettre dans du sérum physiologique ou PBS en attendant de les manipuler au laboratoire sous une hotte chimique.

NB : ne pas le faire avant de prélever les plaies au risque de dégrader les cicatrices et le tissu sous-jacent lorsque l'on tire sur la queue.

Annexe 14 : Analyse statistique de l'évolution de la cicatrisation en fonction du produit utilisé pour le traitement des plaies

Afin de vérifier la significativité des résultats, un test statistique a été effectué sous StatGraphics. En effet, pour démontrer que la taille des plaies diminue bien d'une façon globale au fil des jours et voir s'il y a une différence statistiquement significative entre les 4 produits testés (*diminution ou augmentation de la vitesse de cicatrisation*), un test de Friedman (*suivi d'un « test post-hoc de Wilcoxon avec correction de Bonferroni »*) a été réalisé. Pour cela, les données (*moyenne de la surface des plaies droites ET gauches traitées de la même manière*) des 4 populations à comparer (*rien, PBS, alginate, gel commercial*), ont été entrées dans le tableur du fichier de données en utilisant une colonne séparée pour chaque échantillon et où chaque ligne représente un bloc, c'est-à-dire le niveau d'une quelconque autre variable, à savoir dans ce cas d'étude, les différents temps d'observation (*J0, J3, J7, J10, J14 et J17*), comme illustré ci-dessous (tableau 40) :

	Rien	PBS	Alginate	Gel com.
J0	100	100	100	100
J3	83,13	89,62	72,83	72,59
J7	43,48	46,06	40,34	38,31
J10	25,93	13,73	18,84	19,92
J14	7,37	8,69	11,45	10,69
J17	12,18	12,74	11,34	12,91

Tableau 40 : Tableau répertoriant la taille des plaies (exprimée en % d'aire par rapport à la plaie J0 considérée comme témoin et fixée à 100%) traitées par différents produits (rien, PBS, hydrogel d'alginate et gel commercial) et à différents temps d'observation (J0, J3, J7, J10, J14 et J17).

Ce test statistique permet de s'affranchir de comparer les temps 2 à 2 pour chacune des 4 conditions testées (*c'est-à-dire comparer par exemple pour la condition « alginate » le temps J3 à J0, puis le temps J7 à J3... et ainsi générer une multitude de p ensuite difficile à interpréter*). C'est un test non paramétrique pour échantillons appariés qui utilise donc, comme alternative à la comparaison des moyennes et analyse des variances, la comparaison des médianes des échantillons.

Le résultat du test de Friedman révèle une valeur de probabilité très largement supérieure à 0,05 (tableau 41). L'hypothèse d'égalité des médianes est donc retenue :

Test de Friedman	Taille de l'échantillon	Rang moyen
Rien	6	2,58333
PBS	6	2,75
alginate	6	2,25
gel commercial	6	2,41667
p = 0,90		

Tableau 41 : Tableau récapitulatif des valeurs de probabilité déterminées par le test de Friedman pour les 4 conditions de traitement des plaies (rien, PBS, hydrogel d'alginate et gel commercial).

En d'autres termes, il n'y a donc pas de différence statistiquement significative de cicatrisation entre les 4 conditions testées. Cette affirmation est par ailleurs doublement confirmée par la représentation graphique dite des « boîtes à moustaches » qui peut être assimilée au test post-hoc de Wilcoxon avec correction de Bonferroni puisque cette représentation permet de préciser quelles populations diffèrent si des différences sont observées (figure 181).

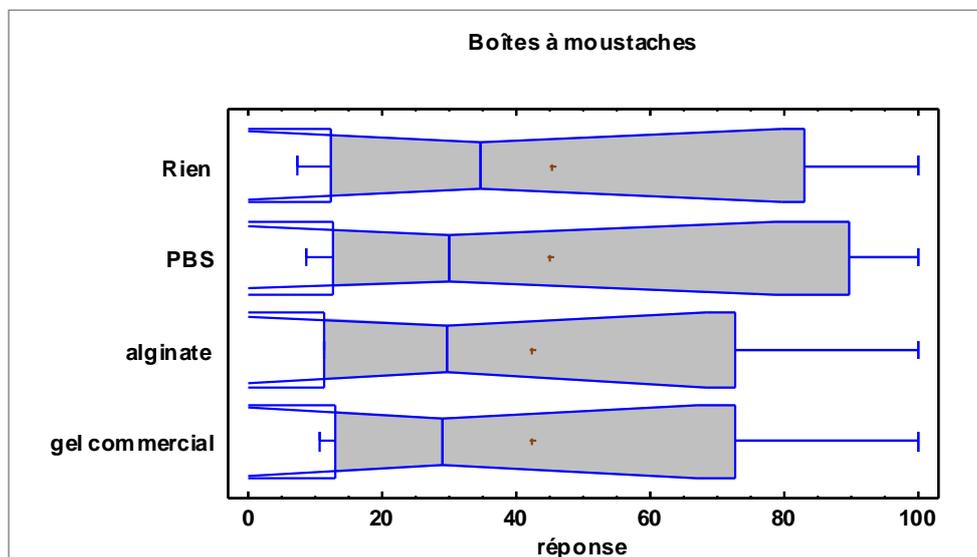


Figure 181 : Représentation en « boîtes à moustaches » de l'évolution la taille des plaies traitées par différents produits (rien, PBS, hydrogel d'alginate et gel commercial).

Ce graphique en boîte à moustaches a été construit en :

- traçant une boîte s'étendant du premier au troisième quartile. Les 50% centraux des données sont ainsi contenus dans cette boîte.
- traçant une ligne verticale à la position de la médiane de l'échantillon, qui divise les données en deux. Si les données suivent une loi symétrique, cette ligne doit être proche du centre de la boîte.
- affichant un signe « + » à la position de la moyenne de l'échantillon. Tout écart substantiel entre la médiane et la moyenne indique habituellement soit la présence d'un point extrême (*une valeur des données qui ne provient pas de la même population que le reste des données*) soit une loi asymétrique. Dans le cas d'une loi asymétrique, la moyenne est décalée en direction de la plus longue queue de la distribution. Ce qui est d'ailleurs bien notre cas.
- affichant des moustaches qui s'étendent des quartiles aux plus petites et plus grandes valeurs des données de l'échantillon (*à moins que des valeurs soient suffisamment éloignées de la boîte pour être classées non usuelles. Dans ce cas, les moustaches s'étendent jusqu'aux points les plus distants non classés éloignés*).

Une encoche sur chacune des 4 médianes du graphique a également été ajoutée. Cela correspond approximativement à un intervalle de confiance sur la médiane de la population au niveau de 95%. Elle montre la marge d'erreur dans l'estimation de la médiane de chaque population. Dans notre cas, la marge d'erreur est petite puisque l'échantillon est assez large. Ce qui est important ici, c'est le fait que les encoches ont été élaborées de telle façon que si les encoches de deux échantillons ne se chevauchent pas, il est alors possible de déclarer que les médianes de ces deux échantillons sont significativement différentes au niveau de signification de 5%. Au niveau du graphique ci-dessus, les encoches pour les 4 échantillons testés se chevauchent, **confirmant donc qu'il n'y a pas de différence statistiquement significative de cicatrisation entre les 4 conditions testées.**

Remarque : le repliement des encoches survient lorsque l'un d'elles s'étend au-delà du bord de la boîte.

Annexe 15 : Analyse statistique de l'évolution de la cicatrisation en fonction de la présence de collagène de type III dans les matrices utilisées pour le traitement des plaies

Afin de vérifier la significativité des résultats, un test statistique a été effectué sous StatGraphics. En effet, pour démontrer que la taille des plaies diminue bien d'une façon globale au fil des jours et voir s'il y a une différence statistiquement significative entre les 4 conditions testées (*diminution ou augmentation de la vitesse de cicatrisation*), un test de Friedman (suivi d'un « *test post-hoc de Wilcoxon avec correction de Bonferroni* ») a été réalisé. Pour cela, les données des 4 populations à comparer (*moyenne de la surface des plaies traitées soit avec du PBS, du PBS + 0,05% de coll III, de l'alginate ou de l'alginate + 0,05% de coll III*), ont été entrées dans le tableur du fichier de données (tableau 42).

	PBS	PBS + 0,05% coll3	Alginate	alginate + 0,05% coll3
J0	100	100	100	100
J3	78,61	84,46	91,70	76,07
J7	56,73	59,62	70,49	60,06
J10	30,88	32,39	37,75	38,08
J14	21,10	13,13	20,68	27,95
J17	9,72	8,23	11,33	13,53

Tableau 42 : Tableau répertoriant la taille des plaies (exprimée en % d'aire par rapport à la plaie J0 considérée comme témoin et fixée à 100%) traitées par différents produits (PBS, PBS + coll, hydrogel d'alginate et hydrogel d'alginate + coll) et à différents temps d'observation (J0, J3, J7, J10, J14 et J17).

Ce test statistique permet de s'affranchir de comparer les temps 2 à 2 pour chacune des 4 conditions testées (*c'est-à-dire comparer par exemple pour la condition « alginate » le temps J3 à J0, puis le temps J7 à J3... et ainsi générer une multitude de p ensuite difficile à interpréter*). C'est un test non paramétrique pour échantillons appariés qui utilise donc comme alternative à la comparaison des moyennes et analyse des variances, la comparaison des médianes des échantillons.

Le résultat du test de Friedman révèle une valeur de probabilité supérieure à 0,05 (tableau 43), l'hypothèse d'égalité des médianes est donc retenue.

Test de Friedman	Taille de l'échantillon	Rang moyen
PBS	6	1,91667
PBS + coll3	6	1,91667
alginate	6	3,08333
alginate + coll3	6	3,08333
$p = 0,12$		

Tableau 43 : Tableau récapitulatif des valeurs de probabilité déterminées par le test de Friedman pour les 4 conditions de traitement des plaies (PBS, PBS + coll, hydrogel d'alginate et hydrogel d'alginate + coll).

En d'autres termes, il n'y a donc pas de différence statistiquement significative de cicatrisation entre les 4 conditions testées. Cette affirmation est par ailleurs doublement confirmée par la représentation graphique dite des « boîtes à moustaches » (figure 182).

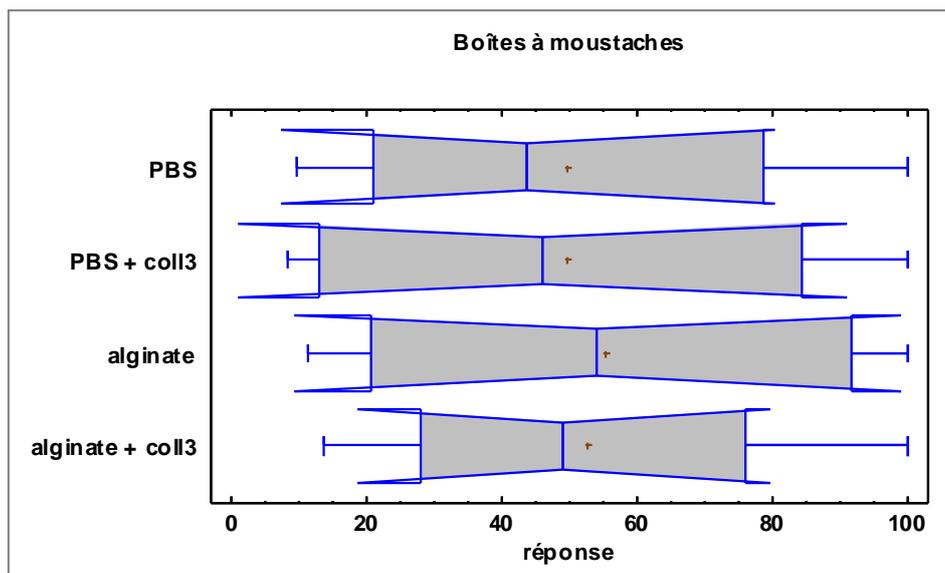


Figure 182 : Représentation en « boîtes à moustaches » de l'évolution la taille des plaies traitées par différents produits (PBS, PBS + coll, hydrogel d'alginate et hydrogel d'alginate + coll).

Ce graphique en boîte à moustaches est construit sur le même modèle que celui de l'annexe 14. Dans ce cas d'étude, les encoches pour les 4 échantillons testés se chevauchent, confirmant donc qu'il n'y a pas de différence statistiquement significative de cicatrisation entre les 4 conditions testées. Il n'y a donc pas d'effet visible du collagène de type III sur le processus de cicatrisation.

Annexe 16 : Valorisation des travaux de thèse

Publications

- *Dispersion of titanate nanotubes: comparison of PEI and PEG nanohybrids*,
J. Boudon, A. L. Papa, V. Bellat, R. Chassagnon, H. Bisht and N. Millot
En rédaction
- *Titanate nanoribbons: a promising new nanostructure for biomedical applications*,
V. Bellat, R. Chassagnon, O. Heintz, L. Saviot, D. Vandroux and N. Millot
En rédaction
- *Structural and morphological features of titanate nanoribbons revealed by electron energy loss spectroscopy and transmission electron microscopy tomography*,
V. Bellat, R. Chassagnon and N. Millot
En rédaction

Brevet

- Dépôt d'un brevet intitulé : « Nanostructures à base de titanates pour la régénération et l'ingénierie tissulaire » (référence 246880D31613) le 20/11/2012.

Congrès nationaux

- **Présentations Orales**

- ✓ *Synthèse, caractérisation et fonctionnalisation de nanorubans de titanates destinés à des applications biomédicales*,
V. Bellat, R. Chassagnon, O. Heintz, L. Saviot, N. Millot,
Nanohybrides VIII, juin 2011, Corse, France
- ✓ *Les nanorubans de titanates : une nouvelle nanostructure prometteuse pour des applications biomédicales*,
V. Bellat, M. Moreau, R. Chassagnon, O. Heintz, L. Saviot, F. Denat, D. Vandroux, N. Millot,
XII^{ème} Journée des Ecoles Doctorales, juin 2012, Besançon, France

- **Présentations par Poster**

- ✓ *Dispersion des nanotubes d'oxydes de titane par des polymères (PEG et PEI)*,
V. Bellat, A-L. Papa, H. Bisht, N. Millot,
Nanohybrides VII, mai 2010, Porquerolles, France

- ✓ *Synthèse et caractérisation de nanorubans de titanates destinés à des applications biomédicales,*
V. Bellat, R. Chassagnon, O. Heintz, L. Saviot, N. Millot,
XII^{ème} Journée des Ecoles Doctorales, mai 2011, Dijon, France
Prix SCF 2011 Bourgogne-Franche Comté (ODIL)

Congrès internationaux

- **Présentations par Poster**

- ✓ *Titanate nanoribbons: a promising new nanostructure for biomedical applications in the nanomedicine field,*
V. Bellat, M. Moreau, R. Chassagnon, O. Heintz, L. Saviot, F. Denat, D. Vandroux, N. Millot,
Colloids and Nanomedicine, juillet 2012, Amsterdam, Netherlands
- ✓ *Protein grafting on nanometer-sized metallic oxides for biomedical applications in the field of cardiovascular diseases,*
J. Boudon, J. Paris, V. Bellat, A-L. Papa, D. Vandroux, N. Millot,
Hybrid Materials, 2011, Strasbourg, France

Références bibliographiques

[A]

(Abraham *et al.* 2008) L. C. Abraham, E. Zuena, B. Perez-Ramirez, D. L. Kaplan, *Review: Guide to collagen characterization for biomaterial studies*, J. Biomed. Mater. Res. B (2008) 264-285

(Aguiar *et al.* 2011) E. C. Aguiar, J. B. P. Da Silva, M. N. Ramos, *A theoretical study of the vibrational spectrum of maléimide*, J. Mol. Struct. 993 (2011) 431-434

(Aimable *et al.* 2008) A. Aimable, B. Xin, N. Millot, A. Aymes, *Continuous hydrothermal synthesis of nanometric BaZrO₃ in supercritical water*, J. Solid State Chem. 181 (2008) 183-189

(Alexis *et al.* 2008) F. Alexis, E. Pridgen, L. K. Molnar, O. C. Farokhzad, *Factors affecting the clearance and biodistribution of polymeric nanoparticles*, Mol. Pharma. , vol. 5, no. 4 (2008) 505-515

(Amoozgar *et al.* 2012) Z. Amoozgar, Y. Yeo, *Recent advances in stealth coating of nanoparticle drug delivery systems*, WIREs Nanomed. Nanobiotechnol. (2012) doi: 10.1002/wnan.1157

(Armstrong *et al.* 2004) A.R. Armstrong, G. Armstrong, J. Canales, P.G. Bruce. *TiO₂-B Nanowires*, Angew. Chem.-Int. Edit (2004) 43, 2286-2288

(Ayala *et al.* 2011) R. Ayala, C. Zhang, D. Yang, Y. Hwang, A. Aung, S. S. Shroff, F. T. Arce, R. Lal, G. Arya, S. Varghese, *Engineering the cell material interface for controlling stem cell adhesion, migration, and differentiation*, Biomaterials 32 (2011) 3700-3711

[B]

(Badylak *et al.* 2009) S. F. Badylak, D. O. Freytes, T. W. Gilbert, *Extracellular matrix as a biological scaffold material: structure and function*, Acta Biomater. 5 (2009) 1-13

(Barczyk *et al.* 2009) M. Barczyk, S. Carracedo, D. Gullberg, *Integrins*, Cell Tissue Res. (2009)

(Barrera *et al.* 2009) C. Barrera, A. P. Herrera, C. Rinaldi, *Colloidal dispersions of monodisperse magnetite nanoparticles modified with poly(ethylene glycol)*, J. Colloid Interface Sci. 329 (2009) 107-113

(Bavykin *et al.* 2004) D.V. Bavykin, V.N. Parmon, A. A. Lapkin, F.C. Walsh, *The effect of hydrothermal conditions on the mesoporous structure of TiO₂ nanotubes*, J. Mater. Chem. 14 (2004) 3370-3377

(Bavykin *et al.* 2005) D.V. Bavykin, A. A. Lapkin, P. K. Plucinski, J. M. Friedrich, F.C. Walsh, *Reversible storage of molecular hydrogen by sorption into multilayered TiO₂ nanotubes*, J. Phys. Chem. B 109 (2005) 19422-19427

[Bavykin *et al.* 2006] D.V. Bavykin, J.M. Friedrich, F.C. Walsh, *Protonated titanates and TiO₂ nanostructured materials: synthesis, properties and applications*, Adv. Mater. 18 (2006) 2807-2824

[Bavykin *et al.* 2009] D.V. Bavykin, F.C. Walsh, *Elongated titanate nanostructures and their applications*, Eur. J. Inorg. Chem. (2009) 977–997

[Berger *et al.* 2004] J. Berger, M. Reist, J. M. Mayer, O. Felt, R. Gurny, *Structure and interactions in chitosan hydrogels formed by complexation or aggregation for biomedical applications*, Eur. J. Pharma. Biopharma. 57 (2004) 35-52

[Bertram *et al.* 2009] J. P. Bertram, C. A. Williams, R. Robinson, S. S. Segal, N. T. Flynn, E. B. Lavik, *Intravenous hemostat : nanotechnology to halt bleeding*, Sci. Trans. Med., vol. 1, issue 11 (2009)

[Beuvier *et al.* 2010] T. Beuvier, M. Richard-Plouet, M. Mancini-Le Granvalet, T. Brousse, O. Crosnier, L. Brohan, *TiO₂ nanoribbons as negative electrode material for lithium ion batteries with high rate performance*, Inorg. Chem. 49 (2010) 8457–8464

[Bhattarai *et al.* 2010] N. Bhattarai, J. Gunn, M. Zhang, *Chitosan-based hydrogels for controlled localized drug delivery*, Adv. Drug Deliver. Rev. 62 (2010) 83-99

[Bozzini *et al.* 2010] S. Bozzini, P. Petrini, M. C. Tanzi, S. Zurcher, S. Tosatti, *Poly(ethylene glycol) and hydroxy functionalized alkane phosphate mixed self-assembled monolayers to control nonspecific adsorption of proteins on titanium oxide surfaces*, Langmuir 26 (9) (2010) 6529-6534

[Brammer *et al.* 2009] K. S. Brammer, S. Oh, C. J. Cobb, L. M. Bjursten, H. Van Der Heyde S. Jin, *Improved bone-forming functionality on diameter-controlled TiO₂ nanotube surface*, Acta Biomater. (2009) 3215-3223

[Brown *et al.* 2010] B. N. Brown, C. A. Barnes, R. T. Kasick, R. Michel, T. W. Gilbert, D. Beer-Stolz, D. G. Castner, B. D. Ratner, S. F. Badylack, *Surface characterization of extracellular matrix scaffolds*, Biomaterials 31 (2010) 428-437

[Brownlie *et al.* 2004] A. Brownlie, I. F. Uchegbu, A. G. Schatzlein, *PEI-based vesicle-polymer hybrid gene delivery system with improved biocompatibility*, Int. J. Pharm. 274 (2004) 41-52

[Byun *et al.* 2011] E. Byun, J. Kin, S. M. Kang, H. Lee, D. Bang, H. Lee, D. Bang, H. Lee, *Surface PEGylation via native chemical ligation*, Bioconjugate Chem. 22 (2011) 4-8

[C]

[Carayon *et al.* 2012] I. Carayon, J. F. Cuny, P. Degremont, P. Guirlinger, M. Kemp, V. Matz, I. Mercier-Courtois, M. Simon, A. Thouvenin, N. Vuillemin, *Référentiel Inter régionaux en soin oncologiques de support, Escarre: prévention et prise en charge* (2012)

[Carter *et al.* 2011] M. J. Carter, C. P. Fylling, L. K. S. Parnell, *Use of platelet rich plasma gel on wound healing: a systematic review and meta-analysis*, J. Plastic Surg. , vol. 11 (2011) 382-410

(Cejas *et al.* 2007) M. A. Cejas, C. Chen, W. A. Kinney, B. E. Maryanoff, *Nanoparticles that display short collagen-related peptides, potent stimulation of human platelet aggregation by triple helical motifs*, *Bioconjugate Chem.* 18 (2007) 1025-1027

(Censi *et al.* 2012) R. Censi, P. D. Martino, T. Vermonden, W. E. Hennink, *Hydrogels for protein delivery in tissue engineering*, *J. Controlled Release.* 61 (2012) 680-692

(Chen *et al.* 2002) Q. Chen, W.Z. Zhou, G.H. Du, L.M. Peng, *Trititanate nanotubes made via a single alkali treatment*, *Adv. Mater.* (2002) 14, 1208-1211

(Chen *et al.* 2010) F. M. Chen, M. Zhang, Z. F. Wu, *Toward delivery of multiple growth factors in tissue engineering*, *Biomaterials* 31 (2010) 6279-6308

(Cheng *et al.* 2012) K. Cheng, K. Malliaras, D. Shen, E. Tseliou, V. Ionta, J. Smith, G. Galang B. Sun, C. Houde, E. Marban, *Intramyocardial injection of platelet gel promotes endogenous repair and augments cardiac function in rats with myocardial infarction*, *J. Am. College Cardio.* , vol. 59, no. 3 (2012) 256-264

(Cheng *et al.* 2012) K. Chen, D. Shen, J. Smith, G. Galang, B. Sun, J. Zhang, E. Marbán, *Transplantation of platelet gel spiked with cardiosphere-derived cells boosts structural and functional benefits relative to gel transplantation alone in rats with myocardial infarction*, *Biomaterials* 33 (2012) 2872-2879

(Chevin *et al.* 1988) J. C. Chevin, J. A. Martin, *Amorphous titanium dioxide in pharmacy: preparation, purification and properties*, *S.T.P Pharma.* , vol. 4, no. 4 (1988) 288-294

(Chung *et al.* 2002) T. W. Chung, J. Yang, K. Y. Cho, J. W. Nah, S. I. Kim, C. S. Cho, *Preparation of alginate/galactosylated chitosan scaffold for hepatocyte attachment*, *Biomaterials*, 23 (2002) 2827-2834

(Collis *et al.* 1992) J. J. Collis, G. Embery, *Adsorption of glycosaminoglycans to commercially pure titanium*, *Biomaterials* 13 (1992) 548-542

(Corsaro *et al.* 2004) C. Corsaro, S. F. Parker, *Vibrational spectroscopy of maleimide*, *Physica B* 350 (2004) e591-e593

(Cortes-Jacome *et al.* 2007) M.A. Cortes-Jacome, G. Ferrat-Torres, L.F. Flores Ortiz, C. Angeles-Chavez, E. Lopez-Salinas, J. Escobar, M.L. Mosqueira, J.A. Toledo-Antonio, *In situ thermo-Raman study of titanium oxide nanotubes*, *Catal. Today* 126 (2007) 248-255

(Couarraze *et al.* 1983) G. Couarraze, J. L. Grossiord, *Initiation à la rhéologie, Technique et Documentation*, Lavoisier Paris (1983)

(Coviello *et al.* 2007) T. Coviello, P. Matricardi, C. Marianecchi, F. Alhaique, *Polysaccharide hydrogels for modified release formulations*, *J. Controlled Release* 119 (2007) 5-24

[D]

(Dawson *et al.* 1994) P. E. Dawson, T. W. Muir, I. Clark-Lewis, S. B. H. Kent, *Synthesis of proteins by native chemical ligation*, Science, vol. 266 (1994)

(Delille *et al.* 2001) D. Delille, R. Pantel, E. Van Cappellen, *Crystal thickness and extinction distance determination using energy filtered CBED pattern intensity measurement and dynamical diffraction theory fitting*, Ultramicroscopy 87 (2001) 5-18

(Demeneix *et al.* 2005) B. Demeneix, J. P. Behr, *Polyethylenimine (PEI)*, Advances in Genetics, Nonviral Vectors for Gene Therapy, vol. 53, Wagner & Huang editors, Elsevier (2005) 217-230

(De Monredon. 2004) Thèse de doctorat en Physique et Chimie des Matériaux de Sophie De Monredon: *Interactions organosilanes/silice de précipitation du milieu hydro-alcoolique au milieu aqueux*. Soutenue le 7 décembre 2004 à l'Université Pierre et Marie Curie Paris VI

(De Palma *et al.* 2007) R. De Palma, S. Peeters, M. J. Van Bael, H. Van den Rul, K. Bonroy, W. Laureyn, J. Mullens, G. Borghs, G. Maes, *Silane ligand exchange to make hydrophobic superparamagnetic nanoparticles water dispersible*, Chem. Mater. 19 (2007) 1821-1831

(Deplazes *et al.* 2007) Deplazes, Gloor, Möll, Panizzon, *Cours magistral sur les hydrogels: définition, préparation, galénique* (2007)

(De Revel *et al.* 2004) T. de Revel, K. Doghmi, *Physiologie de l'hémostase*, EMC-Dentisterie 1 (2004) 71-81

(Deshmukh *et al.* 2010) M. Deshmukh, Y. Singh, S. Gunaseelan, D. Gao, S. Stein, P. J. Sinko, *Biodegradable poly(ethylene glycol) hydrogels based on a self-elimination degradation mechanism*, Biomaterials 31 (2010) 6675-6684

(Dhakate *et al.* 2011) S.R. Dhakate, N. Chauhan, S. Sharma, R.B. Mathur, *The production of multi-layer grapheme nanoribbons from thermally reduced unzipped multi-walled carbon nanotubes*, Carbon 49 (2011) 4170-4178

(Dhennin. 2002) C. Dhennin, *Traitement local des brûlures*, Pathol. Biol. 50 (2002) 109-117

(Diegelmann. 2004) R.F. Diegelmann, *Les fondamentaux de la cicatrisation des plaies : escarres, fibrose et obstacles à la cicatrisation*, JPC 44, tome. IX (2004) 51-56

(Dion *et al.* 2000) P. Dion, V. Lognoné, *La Production d'hydrocolloïdes à partir d'algues marines*, Centre d'études et de valorisation des algues (CEVA) Pour Polymerix 2000 - 7 et 8 juin 2000 à Rennes

(Dowling *et al.* 2011) M. B. Dowling, R. Kumar, M. A. Keibler, J. R. Hess, G. V. Bochicchio, S. R. Raghavan, *A self-assembling hydrophobically modified chitosan capable of reversible hemostatic action*, Biomaterials 32 (2011) 3351-3357

(Draget *et al.* 1997) K. I. Draget, G. Skjak-Braek, O. Smidsrod, *Alginate based new materials*, Int. J. Biol. Macromol. 21 (1997) 47-55

(Draget. 2000) K. I. Draget, *Alginates*, Handbook of hydrocolloids, G. O. Phillips, P. A. Williams, CRC Press (2000)

(Draget *et al.* 2005) K. I. Draget, O. Smidsrod, G. Skjak-Braek, *Polysaccharides and polyamides in the food industry. Properties, production, and patents*, chapter 1: Alginates from algae, Edited by A. Steinbuchel, S. K. Rhee (2005)

[E]

(Eaton. 2011) M.A.W. Eaton, *How do we develop nanopharmaceuticals under open innovation?*, Nanomed.: Nanotechnol. Bio. Med. 7 (2011) 371-375

(Egerton. 1996) R.F. Egerton, *Electron energy loss spectroscopy in the electron microscope*, 2nd Edition, Plenum Press (1996) 302-307

(Ehteshami *et al.* 1997) G. R. Ehteshami, S. D. Sharma, J. Porath, R. Z. Guzman, *Synthesis of monoprotected derivatives of homo-bifunctional molecules*, React. Funct. Polym. 35 (1997) 135-143

(Elias *et al.* 2007) X. Elias, R. Pleixats, M. W. C. Man, J. J. E. Moreau, *Hybrid Organic-Inorganic materials derived from a monosilylated hoveyda-type ligand as recyclable diene and enyne metathesis catalysts*, Adv. Synth. Catal. 349 (2007) 1701-1713

(Ellis-Behnke *et al.* 2006) R. G. Ellis-Behnke, Y. X. Liang, D. K. C. Tay, P. W. F. Kau, G. E. Schneider, S. Zhang, W. Wu, K. F. So, *Nano hemostat solution: immediate hemostasis at the nanoscale*, Nanomed.: Nanotechnol. Bio. Med. 2 (2006) 207-215

(Ellis-Behnke. 2011) R. Ellis-Behnke, *At the nanoscale: nanohemostat, a new class of hemostatic agent*, Nanomed. Nanobiotechnol. 3 (2011) 70-78

(Elsaesser *et al.* 2012) A. Elsaesser, C. V. Howard, *Toxicology of nanoparticles*, Adv. Drug Deliver. Rev., vol. 54, no. 2 (2012) 129-137

(Elsanousi *et al.* 2007) A. Elsanousi, E. M. Elssfah, J. Zhang, J. Lin, H. S. Song, C. Tang, *Hydrothermal treatment duration effect on the transformation of titanate nanotubes into nanoribbons*, J. Phys. Chem. C. 111 (2007) 14353-14357

(Engelhardt *et al.* 2011) E. M. Engelhardt, L. A. Micol, S. Houis, F. M. Wurm, J. Hilborn, J. A. Hubbell, P. Frey, *A collagen-poly(lactic-co-ε-caprolactone) hybrid scaffold for bladder tissue regeneration*, Biomaterials 32 (2011) 1-8

(Erli *et al.* 2006) H. J. Erli, M. Rugera, C. Rago, W. Jahn-Dechent, D. A. Hollandera, O. Paara, M. von Walter, *The effect of surface modification of a porous TiO₂/perlite composite on the ingrowth of bone tissue in vivo*, Biomaterials 27 (2006) 1270-1276

[F]

(Feng *et al.* 2010) M. Feng, H. Zhan, L. Miao, *Facile solubilization of titanate nanobelts for nonlinear optical investigations*, *Nanotechnology* 21 (2010) 185707 (6pp)

(Ferin *et al.* 1992) J. Ferin, G. Oberdorster, D. P. Penney, *Pulmonary retention of ultrafine and fine particles in rats*, *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 6 (1992) 535-542

(Frisman *et al.* 2012) I. Frisman, D. Seliktar, H. Bianco-Peled, *Nanostructuring biosynthetic hydrogels for tissue engineering: a cellular and structural analysis*, *Acta Biomater.* 8 (2012) 51-60

(Fujita *et al.* 1999) S. Fujita, P. J. Redei, T. Toru, *Preparation of maleamic acids and maleimides*, Aisin Seiki Co., Ltd., Japan (1999) 9pp

[G]

(Ghicov *et al.* 2005) A. Ghicov, H. Tsuchiya, J. M. Macak, P. Schmuki, *Titanium oxide nanotubes prepared in phosphate electrolytes*, *Electrochem. Com.* 7 (2005) 505-509

(Giuggioli *et al.* 2011) D. Giuggioli, M. Colaci, A. Manfredi, M. Mariano, C. Ferri, *Platelet gel in the treatment of severe scleroderma skin ulcers*, *Rheumatol Int* (2011)

(Gomez *et al.* 1997) L. A. Gomez, A. E. Alekseev, L. A. Aleksandrova, P. A. Brady, A. Terzic, *Use of the MTT Assay in Adult Ventricular Cardiomyocytes to Assess Viability: Effects of Adenosine and Potassium on Cellular Survival*, *J. Mol. Cell. Cardio.* 29 (1997) 1255-1266

(Goujon. 2004) Thèse de doctorat en Pharmacie Isabelle Goujon : *Les alginates : excipients d'origine marine utilisés dans l'industrie pharmaceutique – Application à la synthèse d'un gel chimique*. Soutenue le 21 juin 2004, Université Henri Poincaré-Nancy 1

(Gurtner *et al.* 2008) G. C. Gurtner, S. Werner, Y. Barrandon, M. T. Longaker, *Wound repair and regeneration*, *Nature* 453 (2008) 314-321

(Gratton *et al.* 2008) S.E. Gratton, P.A. Ropp, P.D. Pohlhaus, J.C. Luft, V.J. Madden, M.E. Napier, J.M. DeSimone, *The effect of particle design on cellular internalization pathways*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105 (2008) 11613-11618

[H]

(Hafez. 2009) H.S. Hafez, *Synthesis of highly active single crystalline TiO₂ nanorods and its application in environmental photocatalysis*, *Mater. Letters* 63 (2009) 1471-1474

(Hamidi *et al.* 2008) M. Hamidi, A. Azadi, P. Rafiei, *Hydrogel nanoparticles in drug delivery*, *Adv. Drug Delivery Rev.* 60 (2008) 1638-1649

(Hansson *et al.* 2005) K. M. Hansson, S. Tosatti, J. Isaksson, J. Wettero, M. Textor, T. L. Lindahl, P. Tengvall, *Whole blood coagulation on protein adsorption-resistant PEG and peptide functionalised PEG-coated titanium surfaces*, *Biomaterials* 26 (2005) 861-872

(Harris. 1992) J. M. Harris, *Introduction to biotechnical applications of poly(ethylene glycol)*, *Poly(ethylene glycol) chemistry*, Harris editor New York: Plenum Press (1992) 1-14

(Hartwell *et al.* 2011) R. Hartwell, V. Leung, C. Chavez-Munoz, L. Nabai, H. Yang, F. Ko, A. Ghahary, *A novel hydrogel-collagen composite improves functionality an injectable extracellular matrix*, *Acta Biomater.* 7 (2011) 3060-3069

(Hatefi *et al.* 2002) A. Hatefi, B. Amsden, *Biodegradable injectable in situ forming drug delivery system*, *J. Control. Release* 80 (2002) 9-28

(Hase *et al.* 1979) Y. Hase, I. V. P. Yoshida, *The raman active vibrational modes and isotopic effects of four isotopically substituted lithium hydroxides*, *Chem. Phys. Letters*, vol. 5 (1979) 46-49

(Hern *et al.* 1998) D. L. Hern, J. A. Hubbell, *Incorporation of adhesion peptides into nanoadhesive hydrogels useful for tissue resurfacing*, *J. Biomed. Mater. Res.* 39 (1998) 266-276

(Hersel *et al.* 2003) U. Hersel, C. Dahmen, H. Kessler, *RGD modified polymers: biomaterials for stimulated cell adhesion and beyond*, *Biomaterials* 24 (2003) 4385-4415

(Hirakura *et al.* 2010) S. Hirakura, T. Kobayashi, S. Ono, Y. Oaki, H. Imai, *Fibrous nanocrystals of hydroxyapatite loaded with TiO₂ nanoparticles for the capture and photocatalytic decomposition of specific proteins*, *Colloids Surf. B* 79 (2010) 131-135

(Hirsch *et al.* 1977) P.B. Hirsch, A. Howie, R.B. Nicholson, D.W. Pashley, M.J. Whelan, *Electron microscopy of thin crystals*, Krieger Publishing, 2nd Ed. (1977) 85-107

(Hoffman. 2002) A. S. Hoffman, *Hydrogels for biomedical applications*, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 43 (2002) 3-12

(Hong *et al.* 2003) J. Hong, J. Cao, J. Sun, H. Li, H. Chen, M. Wang, *Electronic structure of titanium oxide nanotubules*, *Chem. Phys. Letters* 380 (2003) 366-371

(Hong *et al.* 2011) Y. Hong, A. Huber, K. Takanari, N. J. Amoroso, R. Hashizume, S. F. Badylak, W. R. Wagner, *Mechanical properties and in vivo behavior of a biodegradable synthetic polymer microfiber-extracellular matrix hydrogel biohybrid scaffold*, *Biomaterials* 32 (2011) 3387-3394

(Horvath *et al.* 2006) E. Horvath, A.A.K Kukovecz, Z. Konya, I. Kiricsi, *Hydrothermal Conversion of Self-Assembled Titanate Nanotubes into Nanowires in a Revolving Autoclave*, *Chem. Mater.* 19 (2007) 927-931

(Houseman *et al.* 2003) B. T. Houseman, E. S. Gawalt, M. Mrksich, *Maleimide-functionalized self-assembled monolayers for the preparation of peptide and carbohydrate bioships*, *Langmuir* 19 (2003) 1522-1531

(Hoven *et al.* 2007) V.P. Hoven, M. Srinanthakul, Y. Iwasaki, R. Iwata, S. Kiatkamjornwong, *Polymer brushes in nanopores surrounded by silicon-supported tris(trimethylsiloxy)silyl monolayers*, J. Colloid Inter. Sci. 314 (2007) 446-459

(Hu *et al.* 2008) L. Hu, D. Hach, D. Chaumont, C. H. Brachais, J. P. Couvercelle, *One step grafting of monomethoxy poly(ethylene glycol) during synthesis of maghemite nanoparticles in aqueous medium*, Colloids Surf. A : Physicochem. Eng. Asp. 330 (2008) 1-7

(Huang *et al.* 1993) J. Huang, Y. Hu, *The synthesis of polyethylen glycol (PEG) with different functional groups at each end*, J. Appl. Polym. Sci. , vol. 47 (1993) 1503-1511

(Hulmann. 2010) I. Hulmann, *L'alginatede calcium, bon pour la cicatrisation*, Article de presse, Journal Vitaexpress 29 (2010)

(Hussain *et al.* 2005) S. M. Hussain, K. L. Hess, J. M. Gearhart, K. T. Geiss, J. J. Schlager, *In vitro toxicity of nanoparticles in BRL 3A rat liver cells*, Toxicol. In Vitro 19 (2005) 975-983

(Huynh *et al.* 2011) C. T. Huynh, M. K. Nguyen, D. S. Lee, *Injectable block copolymer hydrogels: achievements and future challenges for biomedical applications*, Macromolecules 44 (2011) 6629-6636

[I]

(Iijima. 1991) S. Iijima, *Helical microtubules of graphitic carbon*, Nature 354 (1991) 56-58

(Iijima *et al.* 2002) M. Iijima, T. Hatakeyama, K. Nakamura, H. Hatakeyama, *Thermomechanical analysis of calcium alginate hydrogels in water*, J. Therm. Anal. Calorim. , vol. 70 (2002) 807-814

(Ilton *et al.* 2006) E. S. Ilton, C. Liu, W. Yantasee, Z. Wang, D. A. Moore, A. R. Felmy, J. M. Zachara, *The dissolution of synthetic Na-boltwoodite in sodium carbonate solutions*, Geochim. Cosmochim. Acta 70 (2006) 4836-4849

[J]

(Jabbari. 2011) E. Jabbari, *Bioconjugation of hydrogels for tissue engineering*, Curr. Opin. Biotechnol. 22 (2011) 1-6

(Jarvelainen *et al.* 2009) H. Jarvelainen, A. Sainio, M. Koulu, T. N. Wight, R. Penttinen, *Extracellular Matrix Molecules: Potential Targets in Pharmacotherapy*, Pharmacol. Rev. , vol. 61, no. 2 (2009) 198-223

(Jawad *et al.* 2011) H. Jawad, A. R. Boccaccini, N. N. Ali, S. E. Harding, *Assessment of cellular toxicity of TiO₂ nanoparticles for cardiac tissue engineering applications*, Nanotoxicology 5(3) (2011) 372-380

(Jayakumar *et al.* 2011) R. Jayakumar, M. Prabakaran, P. T. S. Kumar, S. V. Nair, H. Tamura, *Biomaterials based on chitin and chitosan in wound dressing applications*, *Biotechnol. Adv.* 29 (2011) 322-337

(Jayakumar *et al.* 2011) R. Jayakumar, R. Ramachandran, V.V. Divyaranian, K. P. Chennazhia, H. Tamura, S. V. Nair, *Fabrication of chitin–chitosan/nano TiO₂-composite scaffolds for tissue engineering applications*, *Inter. J. Bio. Macromol.* 48 (2011) 336–344

(Jiang *et al.* 2003) X. Jiang, Y. Wang, T. Herricksb, Y. Xia, *Ethylene glycol-mediated synthesis of metal oxide nanowires*, *Mater. Chem.* (2004) 14, 695-703

(Jiao *et al.* 2011) L. Jiao, X. Wang, G. Diankov, H. Wang, H. Dai, *Facile Synthesis of High Quality Graphene Nanoribbons*, Department of Chemistry and Laboratory for Advanced Materials, Stanford University, Stanford, California 94305, USA (2011)

(Jitputti *et al.* 2008) J. Jitputti, Y. Suzuki, S. Yoshikawa, *Synthesis of TiO₂ nanowires and their photocatalytic activity for hydrogen evolution*, *Catal. Com.* 9 (2008) 1265–1271

(Jo *et al.* 2000) S. Jo, K. Park, *Surface modification using silanated poly(ethylene glycol)s*, *Biomaterials* 21 (6), (2000) 605-616

(Jouanneau. 2007) D. Jouanneau, *Cours phycocolloïdes*, Université Sciences et Technologies Lille 1 (2007)

[K]

(Kane *et al.* 1994) K. R. Kane, D. H. Deheer, S. R. Owens, J. D. Beebe, A. B. Swanson, *Adsorption of collagenase to particulate titanium: a possible mechanism for collagenase localization in periprosthetic tissue*, *J. Appl. Biomaterials* 5 (1994) 353-360

(Kaneco *et al.* 2006) S. Kaneco, Y. Chen, P. Westerhoff, J. C. Crittenden, *Fabrication of uniform size titanium oxide nanotubes: impact of current density and solution conditions*, *Scri. Mater.* 56 (2007) 373-376

(Kashyap *et al.* 2005) N. Kashyap, N. Kumar, M. Kumar, *Hydrogels for pharmaceutical and biomedical applications*, *Crit. Rev. Ther. Drug Carr. Syst.* 22 (2005) 107-149

(Kasuga *et al.* 1998) K. Tomoko, H. Masayoshi, H. Akihiko, S. Toru, N. Koichi, *Formation of titanium oxide nanotube*, *Langmuir* 14(12) (1998) 3160-3163

(Keast *et al.* 2008) D. Keast, H. Orsted, *Best practice recommendations for the prevention and treatment of skin tears*, *Clin. Practice*, vol. 6, no. 1 (2008)

(Kelly *et al.* 1975) P. M. Kelly, A. Jostsons, R. G. Blake, J. G. Napier, *The determination of foil thickness by scanning transmission electron microscopy*, *Phys. Stat. Sol. A* 31 (1975) 771–780

- (Khan *et al.* 2006) M.A. Khan, H.T Jung, O.B. Yang, *Synthesis and characterization of ultrahigh crystalline TiO₂ nanotubes*, J. Phys. Chem. B 110 (2006) 6626-6630
- (Kim *et al.* 2012) Y. S. Kim, L. T. Linh, E. S. Park, S. Chin, G. N0 Bae, J. Jurng, *Antibacterial performance of TiO₂ ultrafine nanopowder synthesized by a chemical vapor condensation method: Effect of synthesis temperature and precursor vapor concentration*, Powd. Technol. 215-216 (2012) 195-199
- (Klinger *et al.* 1997) D. Klinger, D. Steinberg, D. Kohavi, M. N. Sela, *Mechanism of adsorption of human albumin to titanium in vitro*, J. Biomed. Mater. Res. 36 (1997) 387-392
- (Knop *et al.* 2010) K. Knop, R. Hoogenboom, D. Fischer, U. S. Schubert, *Poly(ethylene glycol) in Drug Delivery: Pros and Cons as Well as Potential Alternatives*, Angew. Chem. Int. Ed. 49 (2010) 6288 - 6308
- (Kobayashi *et al.* 2012) Y. Kobayashi, O. J. Hernandez, T. Sakaguchi, T. Yajima, T. Roisnel, Y. Tsujimoto, M. Morita, Y. Noda, Y. Mogami, A. Kitada, M. Ohkura, S. Hosokawa, Z. Li, K. Hayashi, Y. Kusano, J. Kim, N. Tsuji, A. Fujiwara, Y. Matsushita, K. Yoshimura, K. Takegoshi, M. Inoue, M. Takano, H. Kageyama, *An oxyhydride of BaTiO₃ exhibiting hydride exchange and electronic conductivity*, Nat. Mater. 11 (2012) 507-511
- (Kodama *et al.* 2009) A. Kodama, S. Bauer, A. Komatsu, H. Asoh, S. Ono, P. Schmuiki, *Bioactivation of titanium surfaces using coatings of TiO₂ nanotubes rapidly pre-loaded with synthetic hydroxyapatite*, Acta Biomater. 5 (2009) 2322-2330
- (Kohler *et al.* 2004) N. Kohler, G. E. Fryxell, M. Zhang, *A bifunctional poly(ethylene glycol) silane immobilized on metallic oxide-based nanoparticles for conjugation with cell targeting agents*, J. Am. Chem. Soc. 126 (2004) 7206-7211
- (Kolen'ko *et al.* 2006) Y.V. Kolen'ko, K.A. Kovnir, A.I. Gavrilov, A.V. Garshev, J. Frantti, O.I. Lebedev, B.R. Churagulov, O.G Van Tendeloo, M. Yoshimura, *Hydrothermal synthesis and characterization of nanorods of various titanates and titanium dioxide*, J. Phys. Chem. B(110) (2006) 4030-4038
- (Kopesky *et al.* 2009) P. W. Kopesky, E. J. Vanderploeg, J. S. Sandy, B. Kurz, A. J. Grodzinsky, *Self-assembling peptide hydrogels modulable in vitro chondrogenesis of bovine bone marrow stromal cells*, Tissue Eng. Part A 16 (2009) 465-477
- (Krug *et al.* 2011) H. F. Krug P. Wick, *Nanotoxicology: an interdisciplinary challenge*, Angew. Chem. Int. Ed. 50 (2011) 1260-1278
- (Krumeich *et al.* 2000) F. Krumeich, H.J. Muhr, M. Niederberger, F. Bieri, R. Nesper, *The Cross-Sectional Structure of Vanadium Oxide Nanotubes Studied by Transmission Electron Microscopy and Electron Spectroscopic Imaging*, Anorg. Allg. Chem. (2000), 626, 2208-2216
- (Kukovecz *et al.* 2005) A. Kukovecz, M. Hodos, E. Horvath, G. Radnoczi, Z. Konya, I. Kiricsi, *Oriented crystal growth model explains the formation of titania nanotubes*, J. Phys. Chem. B(109) (2005) 38

[L]

(La Ferla. 2009) B. La Ferla, *Easy silica gel supported desymmetrization of PEG*, Synlett, no. 14 (2009) 2325-2327

(Lallemant et al. 2007) N. Lallemant, L. Bargues, *Les pansements pour brulures : memento des produits et dispositifs locaux*, Brûlures vol. 8, Ed Carr. Méd. (2007)

(Lan et al. 2005) Y. Lan, X. Gao, H. Zhu, Z. Zheng, T. Yan, F. Wu, S. P. Ringer, D. Song, *Titanate nanotubes and nanorods prepared from rutile powder*, Adv. Funct. Mater. 15 (2005) 1310-1318

(Landa et al. 2008) N. Landa, L. Miller, M. S. Feinberg, R. Holbova, M. Shachar, I. Freeman, S. Cohen, J. Leor, *Effect of injectable alginate implant on cardiac remodeling and function after recent and old infarcts in rat*, Circulation, J. Am. Heart Asso. 117 (2008) 1388-1396

(Leor et al. 2009) J. Leor, S. Tuvia, V. Guetta, F. Manczur, D. Castel, U. Willenz, O. Petnehazy, N. Landa, M. S. Feinberg, E. Konen, O. Goitein, O. Tsur-Gang, M. Shaul, L. Klapper, S. Cohen, *Intracoronary injection of in situ forming alginate hydrogel reverses left ventricular remodeling after myocardial infarction in swine*, J. Am. College Cardio. , vol. 54, no. 11 (2009) 1014-1023

(Li et al. 2006) Q. Li, C. G. Williams, D. D. N. Sun, J. Wang, K. Leong, J. H. Elisseeff, *Photocrosslinkable polysaccharides based on chondroitin, sulfate*, J. Biomed. Mater. Res. Part A 68 (2004) 28-33

(Li et al. 2007) W. Li, T. Fu, F. Xie, Shaofeng, S. He, *The multi-staged formation process of titanium oxide nanotubes and its thermal stability*, Mater. Letters 61 (2007) 730-735

(Li et al. 2009) D. Li, H. Chen, W. G. McClung, J. L. Brash, *Lysine-PEG-modified polyurethane as a fibrinolytic surface: Effect of PEG chain length on protein interactions, platelet interactions and clot lysis*, Acta Biomater. 5 (2009) 1864-1871

(Li et al. 2009) X. Li, Q. Shen, Y. Su, F. Tian, Y. Zhao, D. Wang, *Structure-function relationship of calcium alginate hydrogels: a novel crystal-forming engineering*, Crystal Growth & Design, vol. 9, no. 8 (2009) 3470-3476

(Lin et al. 2009) T. W. Lin, C. G. Salzman, L. D. Shao, C. H. Yu, M. L. H. Green, S. C. Tsang, *Polyethylene glycol grafting and attachment of encapsulated magnetic iron oxide silica nanoparticles onto chlorosilanized single-wall carbon nanotubes*, Carbon 47 (2009) 1415-1420

(Liu et al. 2004) X. Liu, P. K. Chu, C. Ding, *Surface modification of titanium, titanium alloys, and related materials for biomedical applications*, Mater. Sci. Eng. R(47) (2004) 49-121

(Liu et al. 2006) A. Liu, M. Wei, I. Honma, H. Zhou, *Biosensing properties of titanate nanotube films: selective detection of dopamine in the presence of ascorbate and uric acid*, Adv. Funct. Mater. 16 (2006) 371-376

(Liu. 2008) A. Liu, *Towards development of chemosensors and biosensors with metal-oxide-based nanowires or nanotubes*, Biosens. Bioelec. 24 (2008) 167-177

(Liu *et al.* 2010) G. Liu, M. Swierczewska, S. Lee, X. Chen, *Functional nanoparticles for molecular imaging guided gene delivery*, Nano Tod. 5 (2010) 524–539

(Liu *et al.* 2010) H. Liu, D. Yang, E.R. Waclawik, X. Ke, Z. Zheng, H. Zhu, R.L. Frost, *A Raman spectroscopic study on the active site of sodium cations in the structure of Na₂Ti₃O₇ during the adsorption of Sr²⁺ and Ba²⁺ cations*, J. Raman Spectrosc. 41 (2010) 1792–1796

(Liu *et al.* 2011) P. Liu, H. Zhang, H. Liu, Y. Wang, X. Yao, G. Zhu, S. Zhang, H. Zhao, *A facile vapor phase hydrothermal method for direct growth of titanate nanotubes on titanium substrate via a distinctive nanosheet rolled-up mechanism*, J. American Chem Soc. (2011)

[M]

(Mailander *et al.* 2009) V. Mailander, K. Landfester, *Interaction of Nanoparticles with Cells*, Biomacromolecules 10 (2009) 2379–2400

(Malafaya *et al.* 2007) P. B. Malafaya, G. A. Silva, R. L. Reis, *Natural-origin polymers as carriers and scaffolds for biomolecules and cell delivery in tissue engineering applications*, Adv. Drug Delivery Rev. 59 (2007) 207–233

(Malis *et al.* 1988) T. Malis, S. C. Cheng, R. F. Egerton, *EELS log-ratio technique for specimen-thickness measurement in the TEM*, J. Electron Microsc. Technol. 8 (1998) 193–200

(Marinkovic *et al.* 2007) B.A. Marinkovic, P.M. Jardim, E. Morgado Jr, M.A.S. de Abreu, G.T. Moure, F. Rizzo, *Hydrothermal synthesis, crystal structure and thermal stability of Ba-titanate nanotubes with layered crystal structure*, Mater. Res. Bulletin 43 (2008) 1562–1572

(Marrotte. 2010) E. J. Marrotte, *Manganese superoxide dismutase expression in endothelial progenitor cells accelerates wound healing in diabetic mice*, J Clin Invest 120 (2010) 4207–4219

(Matsui *et al.* 2009) K. Matsui, M. Segawa, T. Tanaka, A. Kondo, C. Ogino, *Antibody-immobilized TiO₂ nanoparticles for cancer therapy*, J. Biosci. Bioeng. 108 (2009) S29–S40

(Matsui *et al.* 2012) M. Matsui, Y. Tabata, *Enhanced angiogenesis by multiple release of platelet-rich plasma contents and basic fibroblast growth factor from gelatin hydrogels*, Acta Biomater. 8(5) (2012) 1792–1801

(Maurizi. 2010) Thèse de doctorat en Chimie-Physique Lionel Maurizi: *Elaboration de nanoparticules nanostructurées fonctionnelles : application comme agent de contraste en IRM*. Soutenue le 3 décembre 2010 à l'Université de Bourgogne

(Mazens *et al.* 2005) Thèse de doctorat en Génie des Procédés Mazens Delphine : *Etude du transfert diffusif de solutés macromoléculaires dans les hydrogels d'alginate de calcium*. Soutenue le 15 décembre 2005 à l'Institut National Polytechnique de Lorraine

(Meaume. 2004) S. Meaume, *Prévention et traitement des escarres chez la personne âgée*, présentation Hôpital Charles Foix – Service Dermatologique - Gériatrique AP-HP Paris (2004)

(Meena *et al.* 2008) R. Meena, M. Chhatbar, K. Prasad, A. K. Siddhanta, *Development of a robust hydrogel system based on agar and sodium alginate blend*, Polym. Int. 57 (2008) 329-336

(Mendoume-Nze *et al.* 2008) Thèse de doctorat en Pharmacie Mendoume-Nze Jeanne Stella : *Les hydrogels et les nanogels : des formes galéniques innovantes pour une libération ciblée des principes actifs*. Soutenue en 2008 à l'Université de Nantes

(Mero *et al.* 2011) A. Mero, C. Clementi, F. M. Veronese, G. Pasut, *Covalent conjugation of poly(ethylene glycol) to proteins and peptides : strategies and methods*, Bioconjugation protocols : strategies and methods, methods in molecular biology, vol. 751, Sony S. Mark editor (2011)

(Millot *et al.* 2005) N. Millot, B. Xin, C. Pighini, D. Aymes, *Hydrothermal synthesis of nanostructured inorganic powders by a continuous process under supercritical conditions*, J. Eur. Ceram. Soc. 25 (2005) 2013-2016

(Millot. 2005) N. Millot, *Rôle des interfaces sur les propriétés des nanomatériaux*, Habilitation à diriger des recherches, Université de Bourgogne (2005)

(Mirjolet *et al.* 2011) C. Mirjolet, A.L Papa, G. Crehanges, O. Raguin, G. Truc, P. Maingon, N.Millot, *The radiosensitization effect of titanate nanotubes as a promising tool in radiation therapy for glioblastoma: a proof-of-concept*, Radioth. Oncol. submitted September 2011

(Miura *et al.* 2001) Y. Miura, H. Kusano, T. Nanba, S. Matsumoto, *X-ray photoelectron spectroscopy of sodium borosilicate glasses*, J. Non-Cryst. Solids 290 (2001) 1-14

(Morales-Sanfrutos *et al.* 2010) J. Morales-Sanfrutos, J. Lopez-Jaramillo, M. Ortega-Munoz, A. Megia-Fernandez, F. Perez-Balderas, F. Hernandez-Mateo, F. Santoyo-Gonzalez, *Vinyl sulfone : a versatile function for simple bioconjugation and immobilization*, Org. Biomol. Chem. 8 (2010) 667-675

(Mornet *et al.* 2005) S. Mornet, J. Portier, E. Duguet, *A method for synthesis and functionalization of ultrasmall superparamagnetic covalent carriers based on maghemite and dextran*, J. Magn. Mater. 293 (1) (2005) 127-134

(Morra *et al.* 2003) M. Morra, C. Cassinelli, G. Cascardo, P. Cahalan, M. Fini, R. Giardino, *Surface engineering of titanium by collagen immobilization. Surface characterization and in vitro and in vivo studies*, Biomaterials 24 (2003) 4639-4654

(Moustafa. 2007) Thèse de doctorat en Pharmacie Clinique Tarek Mohamed Mohamed Moustafa : *Microencapsulation de cellules chromaffines bovines dans le traitement des douleurs chroniques rebelles : étude de faisabilité in vitro et in vivo*. Soutenue le 23 octobre 2007 à l'Université de Toulouse III-Paul Sabatier

[N]

(Nakagawa *et al.* 2011) K. Nakagawa, K. Yamaguchi, K. Yamada, K.I. Sotowa, S. Sugiyama, M. Adachi, *Synthesis and Characterization of Surface-Functionalized Layered Titanate Nanosheets Using Lamellar Self-Assembly as a Template*, Eur. J. Inorg. Chem. DOI: 10.1002/ejic.201101136

(Nakahira *et al.* 2010) A. Nakahira, T. Kubo, C. Numako, *TiO₂-derived titanate nanotubes by hydrothermal process with acid treatments and their microstructural evaluation*, ACS Applied Mater. Inter. ,vol. 2, no. 9 (2010) 2611-2616

(Napolitano *et al.* 2012) M. Napolitano, S. Matera, M. Bossi, A. Crescibene, E. Costabile, J. Almolla, H. Almolla, F. Togo, C. Giannuzzi, G. Guido, *Autologous platelet gel for tissue regeneration in degenerative disorders of the knee*, Blood Transfus 10 (2012) 72-77

(Natarajan *et al.* 1997) C. Natarajan, K. Setoguchi and G. Nogami, *Preparation of a nanocrystalline titanium dioxide negative electrode for the rechargeable lithium ion battery*, Electrochem. Acta, vol. 43 (1998) 3371-3374

(Neiser *et al.* 1999) S. Neiser, K. I. Draget, O. Smidsrod, *Interactions in bovine serum albumin-calcium alginate gel systems*, Food Hydrocolloids 13 (1999) 445-458

(Nemmar *et al.* 2007) A. Nemmar, K. Melghit, B. H. Ali, *The acute proinflammatory and prothrombic effects of pulmonary exposure to rutile TiO₂ nanorods in rats*, Proc. Soc. Exp. Bio. Med. (2007)

(Nguyen *et al.* 2010) M. K. Nguyen, D. S. Lee, *Injectable biodegradable hydrogels*, Macromol. Biosci. 10 (2010) 563-579

(Niu *et al.* 2008) L. Niu, M. Shao, S. Wang, L. Lu, H. Gao, J. Wang, *Titanates nanotubes: preparation, characterization, and application in the detection of dopamine*, J. Mater. Sci. 43 (2008) 1510-1514

(Nunamaker *et al.* 2007) E. A. Nunamaker, E. K. Purcell, D. R. Kipke, *In vivo stability and biocompatibility of implanted calcium alginate disks*, J. Biomed. Mater. Res. 83A (2007) 1128-1137

[O]

(Oberdorster. 2001) G. Oberdorster, *Pulmonary effects of inhaled ultrafine particles*, Int. Arch. Occup. Environ. Health 74 (2001) 1-8

(Oh *et al.* 2006) S. Oh, S. Jin, *Titanium oxide nanotubes with controlled morphology for enhanced bone growth*, Mater. Sci. Eng. C 26 (2006) 1301-1306

(Ohsaka *et al.* 1978) T. Ohsaka, F. Izumi, Y. Fujiki, *Raman spectrum of anatase TiO₂*, J. Raman Spec. 7(6) (1978) 321

[P]

[Packhaeuser *et al.* 2004] C. B. Packhaeuser, J. Schnieders, C.G. Oster, T. Kissel, *In situ forming parenteral drug delivery system: an overview*, Eur. J. Pharm. Biopharm 58 (2004) 445-455

[Palluault 2010] Thèse de doctorat en Polymère Vincent Palluault : *Nouveaux traitements de surface respectueux de l'environnement par des gels polymères réticulables : application à la préparation des surfaces d'usage dans le secteur aéronautique*. Soutenue le 20 décembre 2010 à l'Université de Bordeaux I

[Pan *et al.* 2007] K. Pan, Q. Zhang, Q. Wang, Z. Liu, D. Wang, J. Li, Y. Bai, *The photoelectrochemical properties of dye sensitized solar cell made with TiO₂ nanoribbons and nanorod*, Thin Solid Films 515 (2007) 4085-4091

[Pan *et al.* 2009] Z. Pan, W. Lee, L. Slutsky, R. A. F. Clark, N. Pernodet, M. H. Rafailovich, *Adverse effects of titanium dioxide nanoparticles on human dermal fibroblasts and how to protect cells*, Small 5, no. 4 (2009) 511-520

[Papa 2009] Thèse de doctorat en Chimie-Physique Anne-Laure Papa : *Synthèse et caractérisation de nanotubes d'oxydes de titane. Fonctionnalisations en vue de leur application comme nouveaux nanovecteurs biologiques : cas de la transfection d'ADN dans les cardiomyocytes*. Soutenue le 9 décembre 2009 à l'Université de Bourgogne

[Papa *et al.* 2009] A.-L. Papa, N. Millot, L. Saviot, R. Chassagnon & O. Heintz, *Effect of reaction parameters on composition and morphology of titanate nanomaterials*, J. Phys. Chem. C 113 (2009) 12682

[Papa *et al.* 2011] A.L. Papa, L. Maurizi, D. Vandroux, P. Walker, N. Millot, *Synthesis of titanate nanotubes directly decorated with USPIO in hydrothermal conditions: a new detectable nanocarrier*, J. Phys. Chem. C, DOI jp-2011-056893.R1

[Papa *et al.* 2012] A. L. Papa, L. Dumont, D. Vandroux, N. Millot, *Titanate nanotubes: towards a novel and safer nanovector for cardiomyocytes*, Nanotoxicology (2012) DOI 10.3109/17435390.2012.710661

[Park *et al.* 2006] H. Park, K. Park, D. Kim, *Preparation and swelling behavior of chitosan-based superporous hydrogels for gastric retention application*, J. Biomed. Mater. Res. 76A (2006) 144-150

[Patnaik *et al.* 2010] S. Patnaik, M. Arif, A. Pathak, R. Kurupati, Y. Singh, K. C. Gupta, *Cross-linked polyethylenimine-hexametaphosphate nanoparticles to deliver nucleic acids therapeutics*, Nanomed. : Nanotechnol. , Bio. Med. 6(2) (2010) 344-354

[Pavasupree *et al.* 2005] S. Pavasupree, Y. Suzukia, S. Yoshikawaa, R. Kawahata, *Synthesis of titanate, TiO₂ (B), and anatase TiO₂ nanofibers from natural rutile sand*, J. Solid State Chem. 178 (2005) 3110-3116

(Pei *et al.* 2011) J. Pei, H. Hall, N. D. Spencer, *The role of plasma proteins in cell adhesion to PEG surface-density-gradient-modified titanium oxide*, *Biomaterials* 32 (2011) 8968-8978

(Peppas *et al.* 1987) N. A. Peppas, *Hydrogels in medicine and pharmacy*, Synthetic polymers, vol. I-III, CRC Press, Boca Raton (1987)

(Peppas *et al.* 2000) N. A. Peppas, P. Bures, W. Leobandung, H. Ichikawa, *Hydrogels in pharmaceutical formulations*, *Eur. J. Pharm. Biopharm* 50 (2000) 27-46

(Perriat. 1997) P. Perriat, Solides granulaires à l'échelle nanométrique, Habilitation à diriger des recherches, Université de Bourgogne (1997)

(Pharm. Eur. 2002) Extrait de la Pharmacopée Européenne : *Alginiq(u)e (acide) Acidum alginicum* : 0591 01/2002

(Pighini. 2006) Thèse de doctorat en Chimie-Physique Catherine Pighini : *Synthèse de nanocristaux de TiO₂ anatase à distribution de taille contrôlée. Influence de la taille des cristallites sur le spectre Raman et étude des propriétés de surface*. Soutenue le 30 novembre 2006 à l'Université de Bourgogne

(Pighini *et al.* 2007) C. Pighini, D. Aymes, N. Millot, L. Saviot, *Low-frequency Raman characterization of size-controlled anatase TiO₂ nanopowders prepared by continuous hydrothermal syntheses*, *J. Nanopart. Res.* 9 (2007) 309

(Ponosov *et al.* 1999) Y. S. Ponosov, G. A. Bolotin, Evidences of superstructure in rhenium from raman spectra, *Phys. Stat. Sol. B* 215 (1999) 137-141

[Q]

(Qin. 2007) Y. Qin, *The preparation and characterization of fiber reinforced alginate hydrogel*, *J. A pp. Polymer Sci.* (2007) 2756-2761

[R]

(Ramshaw *et al.* 2009) J. A. M. Ramshaw, Y. Y. Peng, V. Glattauer, J. A. Werkmeister, *Collagens as biomaterials*, *J. Mater. Sci.: Mater. Med* 20 (2009) S3-S8

(Ranade *et al.* 2002) M. R. Ranade, A. Navrotsky, H. Z. Zhang, J. F. Banfield, S. H. Elder, A. Zaban, P. H. Borse, S. K. Kulkarni, G. S. Doran, H. J. Whitfield, *Energetics of nanocrystalline TiO₂*, *Colloquium PNAS*, vol. 99, suppl. 2 (2002) 6476-6481

(Rastello. 2002) Thèse de doctorat en Pharmacie Marie Rastello : *Microparticules d'alginate associatives ; élaboration, caractérisation et encapsulation de molécules actives*. Soutenue en 2002 à l'Université de Nancy

(Rastello *et al.* 2004) M. Rastello, M. Léonard, P. Hubert, P. Marchal, A. Stequert, C. Castel, E. Favre, E. Dellacherie, *Physical alginate hydrogels based on hydrophobic or dual hydrophobic/ionic interactions : beads formation, structure, and stability*, J. Colloid and Interface Sci. 273 (2004) 131-139

(Richardson *et al.* 2001) T. P. Richardson, M. C. Peters, A. B. Ennett, D. J. Mooney, *Polymeric system for dual growth factor delivery*, Nat. Biotechnol. 19 (2001) 1029-1034

(Rico *et al.* 2002) R. B. Rico, R. Ripamonti, A. I. Burns, R. L. Gamelli, L. DiPietro, *The effect of sepsis on wound healing*, J. Surg. Res. 102 (2002) 193-197

(Robin *et al.* 2008) J. J. Robin, C. Boyer, B. Boutevin, C. Loubat, *Synthesis and properties of polyolefin graft copolymers by a grafting « onto » reactive process*, Polymer 49 (2008) 4519-4528

(Romano *et al.* 2011) N. H. Romano, D. Sengupta, C. Chung, S. C. Heilshorn, *Protein-engineered biomaterials: nanoscale mimics of the extracellular matrix*, Biochim. Biophys. Acta 1810 (2011) 339-349

(Romberg *et al.* 2008) B. Romberg, W. E. Hennink, G. Storm, *Sheddable coatings for long-circulating nanoparticles*, Pharm. Res., vol. 25, no. 1 (2008) 55-71

(Rouquerol *et al.* 2003) F. Rouquerol, L. Luciani, P. Llewellyn, R. Denoyel, J. Rouquerol, *Texture des matériaux pulvérulents ou poreux*, Techniques de l'Ingénieur, traité Analyse et Caractérisation, vol. P2, no. P1050 (2003) 1050.1-1050.24

(Ruszczak *et al.* 2003) Z. Ruszczak, *Effect of collagen matrices on dermal wound healing*, Adv. Drug Deliv. Rev. 55 (2003) 1595-1611

[S]

(Sapir *et al.* 2011) Y. Sapir, O. Kryukov, S. Cohen, *Integration of multiple cell-matrix interactions into alginate scaffolds for promoting cardiac tissue regeneration*, Biomaterials 32 (2011) 1838-1847

(Sargeant *et al.* 2011) T. D. Sargeant, A. P. Desai, S. Banerjee, A. Agawu, J. B. Stopek, *An in situ forming collagen-PEG hydrogel for tissue regeneration*, Acta Biomater. 8(1) (2011) 124-132

(Seely *et al.* 1974) G. R. Seely, R. L. Hart, *The binding of alkaline earth metal ions to alginate*, Macromolecules 7(5) (1974) 706-710

(Seongbong *et al.* 2000) J. Seongbong, P. Kinam, *Surface modification using silanated poly(ethylene glycol)s*, Biomaterials 21 (2000) 605-616

(Serro *et al.* 1997) A. P. Serro, A. C. Fernandes, B. Saramago, J. Lima, M. A. Barbosa, *Apatite deposition on titanium surfaces : the role of albumin adsorption*, Biomaterials 18(14) (1997) 936-968

- (Shachar *et al.* 2011) M. Shachar, O. Tsur-Gang, T. Dvir, J. Leor, S. Cohen, *The effect of immobilized RGD peptide in alginate scaffolds on cardiac tissue engineering*, *Acta Biomater.* 7 (2011) 154-162
- (Shakespeare. 2001) P. Shakespeare, *Burn wound healing and skin substitutes*, *Burns* 27 (2001) 517-522
- (Shea *et al.* 1999) LL. D. Shea, E. Smiley, J. Bonadio, D. J. Mooney, *DNA delivery from polymer matrices for tissue engineering*, *Nat. Biotechnol.* 17 (1999) 551-554
- (Sheikh *et al.* 2010) C. Sheikn, S. Takagi, T. Yoshimura, H. Morita, *Mechanistic studies of DCC/HOBT-mediated reaction of 3-phenylpropionic acid with benzyl alcohol and studies on the reactivities of active ester and the related derivatives with nucleophiles*, *Tetrahedron* 66 (2010) 7272-7278
- (Shen *et al.* 2008) R. Shen, P. H. C. Camargo, Y. Xia, H. Yang, *Silane-based poly(ethylene glycol) as a primer for surface modification of nonhydrolytically synthesized nanoparticles using the Stober method*, *Langmuir* 24(19) (2008) 11189-11195
- (Sheng *et al.* 2011) J. Sheng, L. Hu, L. Mo, W.X. Li, H.J. Tian, S.Y. Dai, *A multistep attachment process: Transformation of titanate nanotubes into nanoribbons*, *Sci. China Chem.*, no.3, vol.55 (2011)
- (Shi *et al.* 2011) C. Shi, Q. Li, Y. Zhao, W. Chen, B. Chen, Z. Xiao, H. Lin, L. Nie, D. Wang, J. Dai, *Stem-cell-capturing collagen scaffold promotes cardiac tissue regeneration*, *Biomaterials* 32(10) (2011) 1-8
- (Shin *et al.* 2012) S. H. Shin, J. J. Yoo, H. N. Kim, J. Nam, H. J. Kim, *Enhanced cellular responses of human bone marrow stromal cells cultured on pretreated surface with allogenic platelet-rich plasma*, *Connective Tissue Res.* (2012) 1-11
- (Smith *et al.* 2009) I.O. Smith, X.H. Liu, L.A. Smith, P.X. Ma, *Nano-structured polymer scaffolds for tissue engineering and regenerative medicine*, *Nanomed. Nanobiotechnol.* 1(2) (2009) 226-236
- (Song *et al.* 2009) H. Y. Song, M. H. Ngai, Z. Y. Song, P. A. MacAry, J. Hopley, M. J. Lear, *Practical synthesis of maleimides and coumarin-linked probes for protein and antibody labelling via reduction of native disulfides*, *Org. Biomol. Chem.* (7) (2009) 3400-3406
- (Spotnitz *et al.* 2008) William D. Spotnitz, Sandra Burks, *Hemostats, sealants, and adhesives: components of the surgical toolbox*, *Transfusion*, vol. 48 (2008) 1502-1516
- (Sun *et al.* 1993) A. M. Sun, *Encapsulation of living cells: potential medical applications*, 9th International Symposium on Microencapsulation EDS Edition (1993)
- (Sun *et al.* 2003) X. Sun, Y. Li, *Synthesis and characterization of ion-exchangeable titanate nanotubes*, *Chem. Eur. J.* 9 (2003) 2229-2238

(Sundgren *et al.* 1986) J. E. Sundgren, P. Bodo, B. Ivarson, I. Lundstrom, Adsorption of fibrinogen on titanium and gold surfaces studied by ESCA and ellipsometry, *J. Colloids Interface Sci.* 113(2) (1986) 530-543

(Suzuki *et al.* 2004) Y. Suzuki, S. Yoshikawa, *Synthesis and thermal analyses of TiO₂-derived nanotubes prepared by the hydrothermal method*, *J. Mater. Res.* 19 (2004) 982-985

[T]

(Takemoto *et al.* 2003) S. Takemoto, T. Yamamoto, K. Tsuru, S. Hayakawa, A. Osaka, S. Takashima, *Platelet adhesion on titanium oxide gels: effect of surface oxidation*, *Biomaterials* 25 (2004) 3485-3492

(Takezawa *et al.* 2006) Y. Takezawa, H. Imai, *Bottom-Up Synthesis of Titanate Nanosheets with Hierarchical Structures and a High Specific Surface Area*, *Small* 2, no. 3 (2006) 390 – 393

(Tamura *et al.* 1997) R. N. Tamura, D. Oda, V. Quaranta, G. Plopper, R. Lambert, S. Glaser, J. C. R. Jones, *Coating of titanium alloy with soluble laminin-5 promotes cell attachment and hemidesmosome assembly in gingival epithelial cells: potential application to dental implants*, *J. Periodontal. Res.* 32(3) (1997) 287-294

(Tang *et al.* 2007) Y. Tang, Q. L. Zhao, K. Zeng, P. K. Miao, K. Zhou, W. R. Tang, H. F. Zhou, T. Liu, Y. P. Wang, G. Yang, *Synthesis of a benzoxazine monomer containing maleimide and allyloxy groups*, *Chin. Chem. Lett.* 18 (2007) 973-976

(Thevenot *et al.* 2008) P. Thevenot, J. Cho, D. Wavhal, R. B. Timmons, L. Tang, *Surface chemistry influences cancer killing effect of TiO₂ nanoparticles*, *Nanomed.: Nanotechnol. Bio. Med.* 4 (2008) 226–236

(Tiainen *et al.* 2012) H. Tiainen, J. C. Wohlfahrt, A. Verket, S. P. Lyngstadaas, H. J. Haugen, *Bone formation in TiO₂ bone scaffolds in extraction sockets of minipigs*, *Acta Biomater.* 8 (2012) 2384–2391

(Tian *et al.* 2012) H. Tian, Z. Tang, X. Zhuang, X. Chen, X. Jing, *Biodegradable synthetic polymers: preparation, functionalization and biomedical application*, *Prog. Polym. Sci.* 37 (2012) 237-280

(Tonnesen *et al.* 2002) H. H. Tonnesen, J. Karlsen, *Alginate in drug delivery system*, *Drug Dev. Ind. Pharm.* 28 (2002) 621-630

(Torrente-Murciano *et al.* 2009) L. Torrente-Murciano, A.A. Lapkin, D. Chadwick, *Synthesis of high aspect ratio titanate nanotubes in a rotating autoclave*, *Chem. Mater.* (2009) 6484-6489

(Torres *et al.* 2007) F.G. Torres, S.N. Nazhat, S.H. Sheikh, V. Maquet, A.R. Boccaccini, *Mechanical properties and bioactivity of porous PLGA/TiO₂ nanoparticle-filled composites for tissue engineering scaffolds*, *Compo. Sci. Technol.* 67 (2007) 1139–1147

(Tosatti *et al.* 2003) S. Tosatti, S. M. De Paul, A. Askendal, S. VandeVondele, J. A. Hubbell, P. Tengvall, M. Textor, *Peptide functionalized poly(L-lysine)-g-poly(ethylene glycol) on titanium : resistance to protein adsorption in full heparinized human blood plasma*, *Biomaterials* 24 (2003) 4949-4958

(Tsai *et al.* 2005) C.C. Tsai, H. Teng, *Structural features of nanotubes synthesized from NaOH treatment on TiO₂ with different post-treatments*, *Chem. Mater.* 18 (2005) 367–373

(Tsuboi *et al.* 1990) R. Tsuboi, D. B. Rifkin, *Recombinant basic fibroblast growth factor stimulates wound healing in healing-impaired db/db mice*, *J. Exp. Med.* 172 (1990) 245-251

(Tsuchiya *et al.* 2006) H. Tsuchiya, J. M. Macak, L. Muller, J. Kunze, F. Muller, P. Greil, S. Virtanen, P. Schmuki, *Hydroxyapatite growth on anodic TiO₂ nanotubes*, *J. Biomed. Mater. Res. A* 77 (2006) 534-541

[U]

(Usha *et al.* 2012) R. Usha, K.J. Sreeram, A. Rajaram, *Stabilization of collagen with EDC/NHS in the presence of l-lysine: A comprehensive study*, *Colloids Surf. B* 90 (2012) 83– 90

(Ustinov *et al.* 2004) A.I. Ustinov, L. O. Olikhovska, N. M. Budarina, F. Bernard, *Powder line profiles fitting in the case of fcc crystals with stacking faults*, *Diffraction Analysis of the microstructure in materials*, E. J. Mittemeijer, P. Scardi, Editors, Springer Series in Materials Science (2004)

[V]

(Vallée. 2007) Thèse de Doctorat en Génie des Procédés et des Produits Frédéric Vallée : *Synthèse et caractérisation d'un hydrogel d'alginamide pour la régénération des voies nerveuses lésées au sein du système nerveux central chez le rat*. Soutenue le 20 décembre 2007 à l'Université de Nancy

(Van Tomme *et al.* 2008) S. R. Van Tomme, G. Storm, W.E. Hennink, *In situ gelling hydrogels for pharmaceutical and biomedical applications*, *Int. J. Pharma.* 355 (2008) 1-18

(Van Wachem *et al.* 1987) P.B. Van Wachem, C. M. Vreriks, T. Beugeling, J. Feijen, A. Bantjes, J. P. Detmers, W. G. Van Aken, *Influence of protein adsorption on interactions of cultured human endothelial cells with polymers*, *J. Biomed. Mater. Res.* 21 (1987) 701-718

(Velings *et al.* 1995) N. M. Velings, M. M. Mestdagh, *Physico-chemical properties of alginate gel beads*, *Polym. gels Networks* 3 (1995) 311-330

(Vidal *et al.* 2006) *Le dictionnaire*, Editions Vidal (2006) 2750 p

(Vaudaux *et al.* 1990) P. Vaudaux, X. Clivaz, R. Emch, P. Descouts, D. Lew, *Clinical implant*, *Materials*, vol. 9, Elsevier, Amsterdam (1990) 31-36

(Viriya-empikul *et al.* 2008) N. Viriya-empikul, N. Sano, T. Charinpanitkul, T. Kikuchi, W. Tanthapanichakoon, *A step towards length control of titanate nanotubes using hydrothermal reaction with sonication pretreatment*, *Nanotechnol.* 19 (2008)

[W]

(Wang *et al.* 2003) B.L. Wang, Q. Chen, R.H. Wang, L.-M. Peng, *Synthesis and characterization of $K_2Ti_6O_{13}$ nanowires*, *Chem. Phys. Letters* 376 (2003) 726–731

(Wang *et al.* 2009) B. Wang, Y. Shi, D. Xue, *Large aspect ratio titanate nanowire prepared by monodispersed titania submicron sphere via simple wet-chemical reactions*, *J. Solid State Chem.* 180 (2007) 1028–1037

(Wang *et al.* 2009) G. Wang, X. Shen, J. Horvat, B. Wang, H. Liu, D. Wexler, J. Yao, *Hydrothermal Synthesis and Optical, Magnetic, and Supercapacitance Properties of Nanoporous Cobalt Oxide Nanorods*, *J. Phys. Chem. C* 113 (2009) 4357–4361

(Wang *et al.* 2009) N. Wang, H. Li, W. Lü, J. Li, J. Wang, Z. Zhang, Y. Liu, *Effects of TiO_2 nanotubes with different diameters on gene expression and osseointegration of implants in minipigs*, *Biomaterials* 32 (2011) 6900–6911

(Wang *et al.* 2009) S. Wang, Y. Zhou, W. Sun, *Preparation and characterization of antifouling thermosensitive magnetic nanoparticles for applications in biomedicine*, *Mater. Sci. Eng. C* 29 (2009) 1196–1200

(Wang *et al.* 2012) X. Wang, R. A. Gittens, R. Song, R. Tannenbaum, R. Olivares-Navarrete, Z. Schwartz, H. Chen, B. D. Boyan, *Effects of structural properties of electrosynthesized TiO_2 nanofiber meshes on their osteogenic potential*, *Acta Biomater.* 8 (2012) 878–885

(Warheit *et al.* 2008) D. B. Warheit, C. M. Sayes, K. L. Reed, K. A. Swain, *Health effects related to nanoparticle exposures: environmental, health and safety considerations for assessing hazards and risks*, *Pharmacol. Ther.* 120 (2008) 35–42

(Wei *et al.* 2004) M. Wei, Y. Konishi, H. Zhou, H. Sugihara, H. Arakawa, *A simple method to synthesize nanowires titanium dioxide from layered titanate particles*, *Chem. Phys. Letters* 400 (2004) 231–234

(Wei *et al.* 2008) M. Wei, Z-M Qi, M. Ichihara, H. Zhou, *Synthesis of single-crystal niobium pentoxide nanobelts*, *Acta Mater.* 56 (2008) 2488–2494

(Wen *et al.* 2009) Y. Wen, S. Pan, X. Luo, X. Zhang, M. Feng, *A biodegradable low molecular weight polyethylenimine derivative as low toxicity and efficient gene vector*, *Bioconjugate Chem.* (20), (2009) 322–332

(Werkmeister *et al.* 2012) J. A. Werkmeister, J. A. M. Ramshaw, *Recombinant protein scaffolds for tissue engineering*, *Biomed. Mater.* 7 (2012) 012002 (29pp)

(Wichterle *et al.* 1960) O. Wichterle, D. Lim, *Hydrophilic gels for biological use*, Nature 185 (1960) 117-118

(Williams *et al.* 1996) D.B. Williams, C.B. Carter, *Transmission Electron Microscopy, Spectroscopy*, vol. 4, Ed. Plenum Press, New York (1996)

(Williams *et al.* 2001) D. F. Williams, D. M. Brunette, P. Tengvall, P. Thomsen, *Titanium in medicine*, Springer, Berlin (2001) 13-24

(Wolf *et al.* 2012) M. T. Wolf, K. A. Daly, J. E. Reing, S. F. Badylak, *Biologic scaffold composed of skeletal muscle extracellular matrix*, Biomaterials 33 (2012) 2916-2925

(Wu *et al.* 2005) D. Wu, J. Liu, X. Zhao, A. Li, Y. Chen, N. Ming, *Sequence of events for the formation of titanate nanotubes, nanofibers, nanowires, and nanobelts*, Chem. Mater. 18 (2005) 547-553

(Wu *et al.* 2006) D. Wu, J. Liu, X. Zhao, A. Li, Y. Chen, N. Ming, *Sequence of events for the formation of titanate nanotubes, nanofibers, nanowires and nanobelts*, Chem. Mater 18 (2006) 547-553

(Wu *et al.* 2006) J. Wu, Z. G. Su, G. H. Ma, *A thermo- and pH-sensitive hydrogel composed of quaternized chitosan/glycerophosphate*, Int. J. Pharm. 315 (2006) 1-11

[X]

(Xing *et al.* 2012) Y. Xinga, X. Li, L. Zhang, Q. Xua, Z. Chea, W. Li, Y. Baia, K. Li, *Effect of TiO₂ nanoparticles on the antibacterial and physical properties of polyethylene-based film*, Progress Organic Coat. 73 (2012) 219- 224

[Y]

(Yamaoka *et al.* 1994) T. Yamaoka, Y. Tabata, Y. Ikada, *Distribution and tissue uptake, of poly(ethylene glycol) with different molecular weights after intravenous administration to mice*, J. Pharm. Sci. 601, vol. 83, no. 4 (1994)

(Yao *et al.* 2012) R. Yao, R. Zhang, J. Luan, F. Lin, *Alginate and alginate/gelatin microspheres for human adipose-derived stem cell encapsulation and differentiation*, Biofabrication, vol. 4 (2012)

(Yildirimer *et al.* 2012) L. Yildirimer, N. T. K. Tahn, A. M. Seifalian, *Skin regeneration scaffolds: a multimodal bottom-up approach*, Trends in Biotechnol. (2012) 1-11

(Yu *et al.* 2006) H. Yu, J. Yu, B. Cheng, M. Zhou, *Effects of hydrothermal post-treatment on microstructures and morphology of titanate nanoribbons*, J. Solid State Chem. 179 (2006) 349-354

(Yu *et al.* 2009) Q. Yu, M. Wang, H. Chen, *Fabrication of ordered TiO₂ nanoribbon arrays by electrospinning*, Mat. Letters 64 (2010) 428-430

(Yuan *et al.* 2002) Z.Y. Yuan, J.F. Colomer, B.L. Su, *Titanium oxide nanoribbons*, Chem. Phys. Letters 363 (2002) 362–366

(Yuan *et al.* 2004) Z.Y. Yuan, B.L. Su, *Titanium oxide nanotubes, nanofibers and nanowires*, Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects 241 (2004) 173–183

(Yuan *et al.* 2004) Z.Y. Yuan, X.B. Zhang, B.L. Su, *Moderate hydrothermal synthesis of potassium titanate nanowires*, Appl. Phys. A 78 (2004) 1063–1066

[Z]

(Zalipsky. 1995) S. Zalipsky, *Chemistry of polyethylene glycol conjugates with biologically active molecules*, Adv. Drug Deliv. Rev. 16 (1995) 157–182

(Zhang *et al.* 2002) Y. Zhang, N. Kohler, M. Q. Zhang, *Surface modification of superparamagnetic magnetite nanoparticles and their intracellular uptake*, Biomaterials 23 (7), (2002) 1553–1561

(Zhang *et al.* 2006) Y. Zhang, X. Hu, R. Tian, W. Wei, W. Hu, X. Chen, W. Han, H. Chen, Y. Gong, *Angiopoietin-related growth factor (AGF) supports adhesion, spreading, and migration of keratinocytes, fibroblasts, and endothelial cells through interaction with RGD-binding integrins*, Biochem. Biophys. Res. Commun. 347 (2006) 100–108

(Zhang *et al.* 2008) Y. Zhang, S. Thorn, J. N. DaSilva, M. Lamoureux, R. A. deKemp, R. S. Beanlands, M. Ruel, E. J. Suuronen, *Collagen-based matrices improve the delivery of transplanted circulating progenitor cells*, Circ. Cardiovasc. Imaging 1 (2008) 197–204

(Zhang *et al.* 2009) L. Zhang, T. J. Webster, *Nanotechnology and nanomaterials: promises for improved tissue regeneration*, Nano Today 4 (2009) 66–80

(Zhang *et al.* 2010) X. Zhang, G. Sun, M. Hovestadt, V. Syritski, N. Esser, R. Volkmer, S. Janietz, J. Rappich, K. Hinrichs, *A new strategy for the preparation of maleimide-functionalised gold surfaces*, Electrochem. Commun. 12 (2010) 1403–1406

(Zhang *et al.* 2011) Z. Zhanga, C. Hua, M. Hashima, P. Chenb, Y. Xiongb, C. Zhanga, *Synthesis and magnetic property of FeMoO₄ nanorods*, Mater. Sci. Eng. B 176 (2011) 756–761

(Zhang *et al.* 2012) Z. Zhang, J. Hu, P. X. Ma, *Nanofiber-based delivery of bioactive agents and stem cells to bone sites*, Adv. Drug Deliv. Rev. 64(12) (2012) 1129–1141

(Zhao *et al.* 2009) J. Zhao, G. Piao, X. Wang, D. Shi, J. L. Z. Wang, L. Chen, X. Wang, X. Lu, H. Hu, Y. Tao, *Improved dispersion of PEG-functionalized carbon nanofibers in toluene*, Mater. Sci. Eng. C (2009)

(Zhu *et al.* 2001) Y. Zhu, H. Li, Y. Koltypin, Y.R. Hacohen, A. Gedanken, *Sonochemical synthesis of titania whiskers and nanotubes*, Chem. Com. (2001) 2616–2617

(Zhu *et al.* 2007) K.R. Zhu, Y. Yuan, M.S Zhang, J.M Hong, Y. Deng, Z. Yin, *Structural transformation from NaHTi₃O₇ nanotubes to Na₂Ti₆O₁₃ nanorod*, Solid State Com. 144 (2007) 450-453

(Zimmermann *et al.* 2010) J. Zimmermann, T. Nicolaus, G. Neuert, K. Blank, *Thiol-based, site-specific and covalent immobilization of biomolecules for single-molecule experiments*, Nat. Protoc. , vol. 5, no. 6 (2010) 975-985