

Synthèse et caractérisation de nanoparticules superparamagnétiques

Dr S. LAURENT
Dr A. ROCH
Dr R. N. MULLER
UMH - Mons
Lic. M. CORNANT
Ing. C. NICOTRA
ISICht - Mons

L'Imagerie par Résonance Magnétique (I.R.M.) est devenue une méthode d'investigation in vivo particulièrement appréciée. Cependant, l'usage d'agents de contraste s'avère souvent nécessaire pour une meilleure interprétation des résultats. Ce travail s'inscrit dans le cadre de leur synthèse et de leur caractérisation.

Mots- clefs : imagerie médicale, nanoparticules de ferrites, agents de contraste

The Magnetic Resonance Imaging (MRI) has become a particularly appreciated in vivo investigation method. However, the use of the contrast agents often proves necessary for a better interpretation of the results. This work comes within the framework of their synthesis and of their characterization.

Keywords : medical imaging, nanoparticle of ferrite, contrast agents

1. Introduction

L'Imagerie par Résonance Magnétique (I.R.M.) est la méthode la plus puissante et la moins invasive de diagnostic *in vivo*. Son inventeur Paul Lauterbur^[1] fut couronné par le prix Nobel de médecine en 2003. En plus de son utilisation routinière pour la détection des tumeurs, l'IRM s'est récemment distinguée dans le domaine de l'angiographie (étude du système vasculaire) et celui de l'imagerie fonctionnelle. Cette dernière consiste à déterminer les parties du cerveau impliquées dans une activité motrice ou intellectuelle particulière. Afin de permettre le diagnostic, l'utilisation d'agents de contraste est très souvent nécessaire. Ces produits sont des relaxophores c'est-à-dire des composés qui modifient le temps de relaxation magnétique nucléaire du proton. Grâce à cette propriété, ils affectent l'intensité de certaines parties de l'image et améliorent donc le contraste.

Le Service de Chimie Organique et Biomédicale de l'Université de Mons-Hainaut (UMH) a acquis une expertise internationalement reconnue dans le domaine de la synthèse et la caractérisation des contrastophores à usage médical. Ces composés se classent en deux grandes familles selon leur magnétisme moléculaire ou leur magnétisme cristallin. Il s'agit d'une part des complexes paramagnétiques de gadolinium et d'autre part des particules superparamagnétiques constituées de nano-cristaux de substances ferro ou ferri-magnétiques.

L'émergence de l'imagerie moléculaire, ouvrant la voie à la production d'agents de contraste dits « intelligents » qui peuvent cibler une pathologie ou une fonction physiologique particulière, est à l'origine d'un regain d'intérêt pour les agents de contraste de type superparamagnétiques. Ce type d'application est basé sur le greffage sur la particule d'une sonde moléculaire spécifique d'un récepteur cellulaire sur-exprimé lors de la pathologie. La sonde moléculaire peut être un anticorps ou une entité dont la structure tridimensionnelle épouse parfaitement celle du récepteur et assure la haute spécificité de la liaison par un mécanisme de type "clef - serrure". Pour ce type d'applications, les cristaux superparamagnétiques possèdent l'avantage de fixer plusieurs dizaines de milliers d'atomes actifs par récepteur au lieu d'un seul, comme dans le cas des complexes paramagnétiques.

Ce travail vise plus particulièrement à obtenir des protocoles reproductibles de production de ces nouveaux contrastophores superparamagnétiques pour l'IRM. Notre recherche a porté plus particulièrement sur la synthèse de suspensions colloïdales de cristaux superparamagnétiques de magnétite ou de maghémite enrobés par du dextran. Le dextran est constitué de longues chaînes polysaccharidiques et joue le rôle de barrière stérique assurant la stabilité de la suspension.

L'objectif du travail était triple :

- vérifier la parfaite reproductibilité du protocole de synthèse établi
- étudier le rôle de la masse moléculaire du dextran sur les propriétés des particules synthétisées
- étudier l'effet du greffage d'une molécule particulière : l'épichlorhydrine qui servira à l'ancrage de la sonde moléculaire

1.1 Le magnétisme nucléaire à la base de l'IRM

Les protons de l'eau ont un spin $\frac{1}{2}$ et constituent des dipôles magnétiques qui se comportent comme des micro-aimants. Le magnétisme nucléaire du proton, malgré sa très faible valeur, va permettre une investigation *in vivo* d'une remarquable richesse. En effet, le petit aimant constituant le noyau d'hydrogène possède une énergie plus faible lorsqu'il est orienté dans la direction parallèle à M_0 , champ magnétique externe. Cette faible différence d'énergie entre états parallèle et anti-parallèle à M_0 conduit à l'apparition d'une aimantation macroscopique. Remarquons que seul un excès de quelques millièmes de pourcents de spins contribue à cette aimantation macroscopique. Celle-ci se comporte comme une toupie et tourne autour de la direction du champ magnétique. On parle de mouvement de précession magnétique nucléaire. La fréquence de ce mouvement de précession est proportionnelle à la valeur du champ magnétique et est appelée fréquence de Larmor du noyau. Cette relation linéaire entre la fréquence de précession et le champ magnétique est à la base toutes les applications de la RMN.

Pour connaître la position des protons dans l'espace, un champ magnétique d'intensité linéairement croissante suivant une direction de l'espace est appliqué. Ceci entraîne une variation de la fréquence de précession des protons suivant leur position. Ce gradient de champ magnétique est créé par un ensemble de bobines orthogonales parcourues par des courants de sens contraires.

Dans un premier temps, le vecteur d'aimantation macroscopique est basculé par rapport à sa position d'équilibre parallèle au champ extérieur, par l'application d'une onde radio fréquence. Après cette phase d'excitation, le vecteur tournera autour de la direction du champ magnétique extérieure à la fréquence de Larmor du noyau. Cette fréquence dépend de la coordonnée suivant laquelle a été orienté le gradient de champ magnétique. Une simple transformée de Fourier permet de déconvoluer les signaux suivant l'ordonnée correspondant au gradient.

Si on applique l'onde d'excitation en présence d'un gradient de champ orienté suivant une deuxième direction de l'espace, cette dernière ne sera accordée sur la fréquence de Larmor que dans une tranche bien déterminée. Seule l'aimantation de cette tranche sera donc excitée. Afin de permettre la localisation dans les trois directions de l'espace, il est indispensable de disposer de trois bobines de gradient dont les axes sont perpendiculaires. Cela permet de repérer la position de chaque volume élémentaire de l'image.

1.2 Temps de relaxation

Les temps de relaxation magnétique nucléaire sont les paramètres primordiaux fixant le contraste de l'image. Si seule la densité de proton intervenait pour la détermination de l'image, tout objet biologique donnerait une image pratiquement iso-intense (de même intensité et donc sans contraste) et serait donc inexploitable. Cependant, comme les signaux sont acquis hors des conditions d'équilibre, les paramètres caractérisant le retour de l'aimantation à son état de stabilité maximale fixeront l'intensité de l'image et son contraste.

Après avoir subi une excitation, le vecteur aimantation tourne à une fréquence de Larmor et induit un signal dans une bobine de réception. Ce signal s'amortit à cause du retour à l'équilibre du vecteur aimantation. Le signal disparaît donc progressivement du plan XOY orthogonal au champ magnétique M_0 (figure 1).

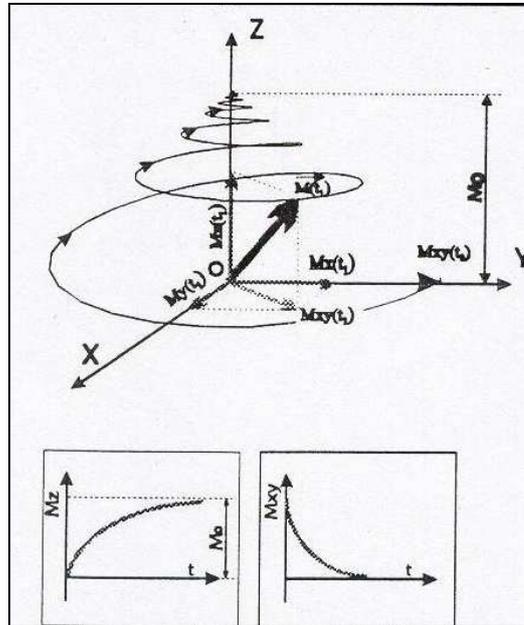


Figure 1 : Evolution temporelle du vecteur aimantation macroscopique et de ses projections sur les axes OZ et le plan transverse XOY

La cinétique de ce processus est caractérisée par deux constantes de temps :

- Temps de relaxation longitudinal T_1 : il caractérise le retour à l'équilibre de la composante parallèle à M_0 du vecteur aimantation. Ce phénomène s'accomplit avec dissipation dans leur environnement de l'énergie acquise par les spins
- Temps de relaxation transversal T_2 : il caractérise la vitesse de disparition des composantes du vecteur aimantation dans un plan perpendiculaire à M_0

Les lois d'évolution temporelle du vecteur aimantation M_0 seront des fonctions exponentielles dont les constantes de temps sont T_1 et T_2 . On définit également les vitesses de relaxation longitudinale et transversale comme :

$$R_{1,(2)} = \frac{1}{T_{1,(2)}}$$

La valeur de R_1 nous sera utile lors de l'élaboration des profils NMRD, (ce terme est défini au paragraphe 2).

La valeur de R_2 nous sera utile afin de déterminer l'état d'agglomération des particules.

Les agents de contraste sont des relaxophores, c'est-à-dire qu'ils se comportent comme des "catalyseurs" augmentant la vitesse de relaxation magnétique nucléaire. Les paramètres qui déterminent leur efficacité sont les "relaxivités" longitudinale et transversale. Ces dernières sont définies respectivement comme les incréments de vitesses de relaxation longitudinale et transversale par millimole de substance active.

1.3 Les ferrites

Les ferrites, qui sont des particules d'oxydes métalliques, forment une famille de composés magnétiques très largement utilisée. La plus connue d'entre elles est sans aucun doute la magnétite. La formule des ferrites est : $XO.Y_2O_3$ où X est un cation divalent (Co, Mn, Zn, Fe) et Y un cation trivalent (Fe, Al).

La formule de la magnétite, qui nous intéresse, est : $FeO.Fe_2O_3$.

L'enrobage de particules d'oxyde de fer

Les ferrofluides sont des suspensions colloïdales de grains magnétiques. La protection stérique est sans aucun doute la meilleure alternative pour former un fluide magnétique à usage médical. En effet, la matrice entourant l'oxyde de fer peut être fonctionnalisée et permet, par exemple, l'accrochage d'un anti-corps^[2].

Pour les applications *in-vivo*, le dextran se classe parmi les meilleurs agents de recouvrement car :

- il est stable thermiquement et chimiquement
- il a des fonctions hydroxyles fonctionnalisables
- il est biodégradable et biocompatible

1.4 Propriétés superparamagnétiques des nano-cristaux de ferrites

Un cristal superparamagnétique est un cristal de matériau ferrimagnétique ou ferromagnétique dont la taille est identique ou inférieure à celle d'un monodomaine magnétique. Pour rappel, les échantillons ferromagnétiques macroscopiques sont caractérisés par une juxtaposition de monodomaines magnétiques au sein desquels les spins électroniques sont orientés parallèlement les uns par rapport aux autres (figure 2).

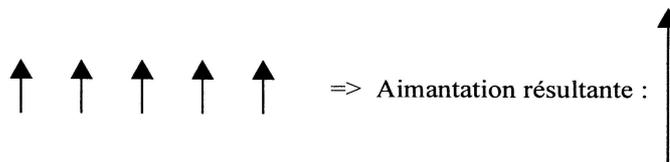


Figure 2 : Ferromagnétisme

Le ferrimagnétisme

L'ordre ferrimagnétique est caractérisé par deux sous-réseaux (figure 3). Les spins de chaque sous-réseau sont alignés de manière anti-parallèle mais leurs moments ne sont pas égaux, ce qui confère à l'échantillon ferrimagnétique un moment magnétique net. L'arrangement des spins de la magnétite qui est ferrimagnétique, est représenté de la manière suivante :

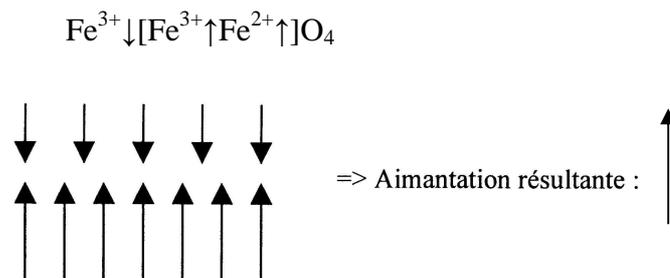


Figure 3 : Ferrimagnétisme

Le ferrimagnétisme macroscopique est également caractérisé par une structure en domaine. Les cristaux superparamagnétiques d'un diamètre de l'ordre de 10 nanomètres (10^{-8} m) sont de taille inférieure à un monodomaine et donc complètement aimantés. C'est la raison pour laquelle ils sont également nommés nano-aimants.

2. Partie expérimentale

La méthode de synthèse utilisée pour obtenir des cristaux de magnétite est basée sur le protocole développé par Molday^[3], illustré ci-dessous en figure 4. Elle consiste en une co-précipitation d'un mélange d'ions Fe^{2+} et Fe^{3+} (dans un rapport molaire égal à 0,5) en milieu basique (NH_3) et en présence de macromolécules qui formeront la barrière stérique (dextran).

La réaction est la suivante : $2 \text{Fe}^{3+} + \text{Fe}^{2+} + 8 \text{OH}^- \rightarrow \text{FeO} \cdot \text{Fe}_2\text{O}_3 + 4 \text{H}_2\text{O}$

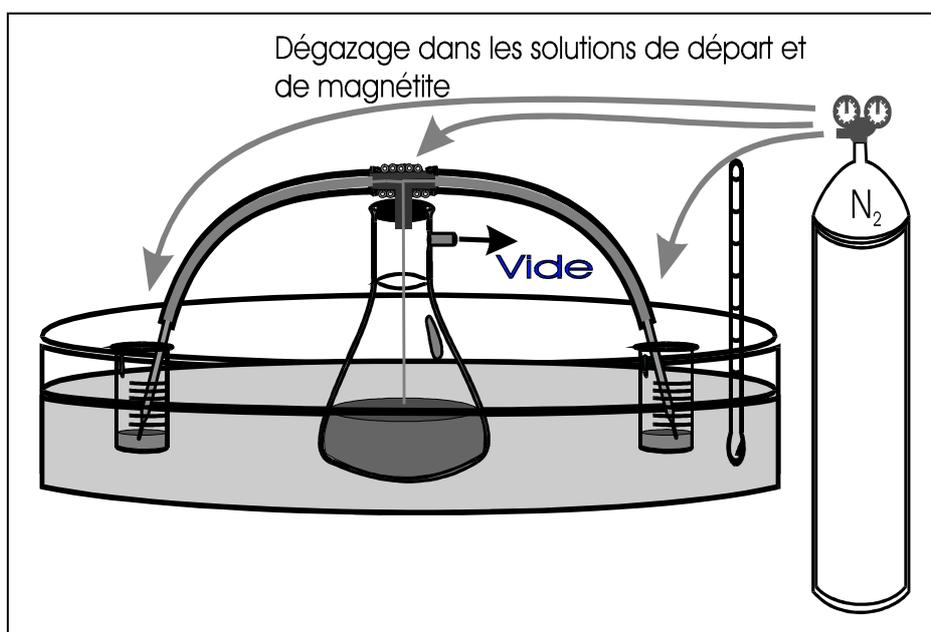


Figure 4 : Dispositif expérimental

Dans le but d'améliorer la reproductibilité de la synthèse, la réaction de précipitation est réalisée dans un mini-réacteur en forme de T assurant un parfait contrôle de la vitesse de mélange des réactifs et de la température. Ce dispositif permet le mélange de deux réactifs : le premier est constitué de 250 ml d'une solution (pH~2) d'ions Fe^{2+} et Fe^{3+} avec le dextran et le second consiste en une solution aqueuse de NH_3 à une concentration de 0,5 M. Sauf indication contraire, la quantité de dextran utilisée pour la synthèse est de 5g.

Les propriétés magnétiques et relaxométriques de chaque échantillon sont établies par mesure d'une part de la courbe magnétométrique sur un magnétomètre vibrant de marque MOLSPIN (Newcastle Upon Tyne, Angleterre) qui donne l'évolution de l'aimantation de l'échantillon avec le champ magnétique appliqué et d'autre part par la mesure du profil NMRD (Nuclear Magnetic Relaxation Dispersion) qui donne l'évolution de la relaxivité en fonction du champ magnétique (généralement exprimé par sa fréquence protonique de Larmor) grâce à un relaxomètre à champ cyclé de marque STELAR (Mede (PV), Italie). L'ajustement théorique des profils NMRD par un modèle développé au sein du laboratoire de l'Université de Mons-Hainaut et des profils magnétométriques par une fonction de Langevin permettent la détermination de la taille et de l'aimantation spécifique des nano-cristaux synthétisés.

La mesure de la taille de la particule entière, ou taille hydrodynamique, est obtenue par spectroscopie de photo-corrélation sur un appareil de marque BROOKHAVEN (New-York, Etats-Unis).

3. Résultats

3.1 Contrôle de la reproductibilité de la synthèse

Les paramètres expérimentaux utilisés lors de cette synthèse reproduisent exactement ceux utilisés lors d'un travail précédent^[4] (une solution de fer $[\text{Fe}^{2+}]/[\text{Fe}^{3+}]$ dans un rapport 0.67 et avec 5 g de dextran 78 000 dalton) dans le seul but d'en vérifier la reproductibilité.

A la figure 5, les courbes de magnétométrie et les profils NMRD de deux de nos synthèses sont comparées avec celle du travail précédent. La superposition des profils NMRD et des courbes de magnétométrie montre la parfaite reproductibilité entre les synthèses réalisées dans le cadre de ce travail et les résultats précédents.

Le lissage théorique de ces courbes permet de déterminer l'aimantation à saturation des échantillons ainsi que la taille des cristaux qui les composent.

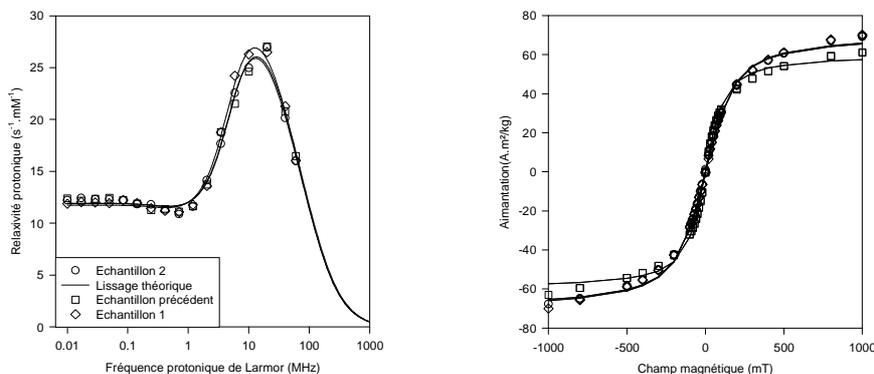


Figure 5 : Profils NMRD et courbes de magnétométrie¹

Cette parfaite reproductibilité des synthèses a été confirmée en reprenant trois fois toutes les expériences réalisées dans la suite du travail. Les paramètres de synthèse étudiés sont la masse moléculaire du dextran d'enrobage et le rapport entre les concentrations en ions ferreux et ferriques.

3.2 Influence du rapport en fer sur la relaxivité protonique

Les différents essais réalisés afin de déterminer l'influence de la masse moléculaire du dextran sur les propriétés des particules produites ont été effectuées pour deux rapports différents entre la concentration en Fe^{2+} et Fe^{3+} , soit respectivement $[Fe^{2+}]/[Fe^{3+}] = 0.67$ et $[Fe^{2+}]/[Fe^{3+}] = 2$.

La figure 6 donne les profils NMRD et les courbes magnétométriques pour un échantillon enrobé par du dextran de poids moléculaire égal à 78000. Les résultats obtenus pour les autres types de molécules d'enrobages donnent le même type d'évolution.

¹ La légende pour les courbes NMRD et les courbes magnétométriques étant la même, elle ne sera reprise qu'une seule fois. Il en sera toujours ainsi.

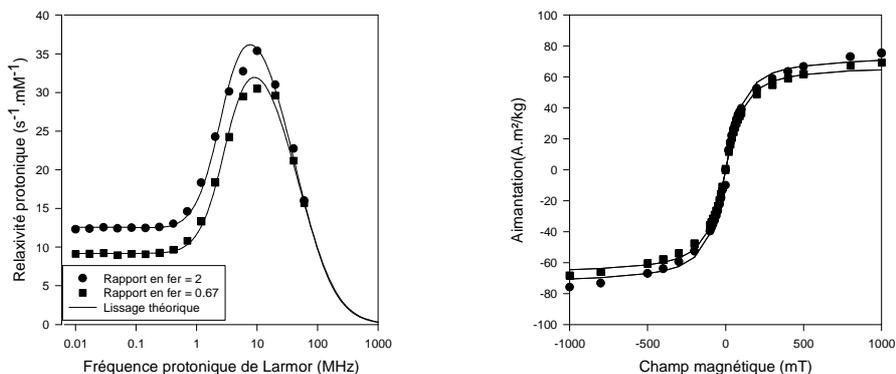


Figure 6 : Profils NMRD et courbes de magnétométrie

Une variation du rapport de la concentration en sels ferreux et ferriques permet de modifier la taille du cristal de magnétite obtenu. Si ce rapport est de 0.67, la relaxivité et la taille du nano-aimant sont plus petites que pour un rapport égal à deux. La meilleure relaxivité des échantillons obtenus avec le rapport $[\text{Fe}^{2+}]/[\text{Fe}^{3+}]$ égal à deux annonce une meilleure efficacité comme agent de contraste en IRM. Malheureusement, la reproductibilité de ces échantillons est moins bonne à cause de leur agglomération.

3.3 Influence de la masse moléculaire du dextran sur la relaxivité protonique

La figure 7 montre les courbes de magnétométrie et les profils NMRD des cristaux de magnétite enrobés de dextran de différentes masses moléculaires et un rapport $[\text{Fe}^{2+}]/[\text{Fe}^{3+}]$ égal à deux. Une évolution semblable des profils NMRD avec l'enrobage est observée si le rapport en ions ferreux et ferriques est égal à 0.67.

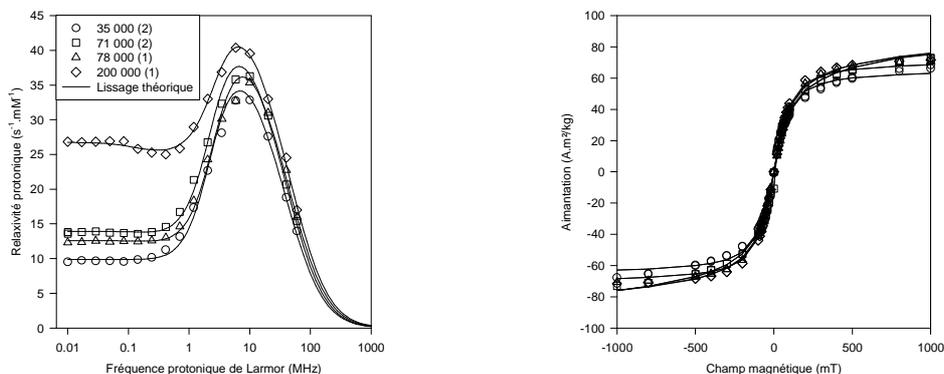


Figure 7 : Profils NMRD et courbes de magnétométrie ($[Fe^{2+}]/[Fe^{3+}] = 2$)

Quelque soit le rapport en fer, la masse moléculaire influence très peu la relaxivité à haut champ. Les différences observées sont dues aux variations des tailles des cristaux synthétisés. Par contre, une diminution de la relaxivité à bas champ est observée lorsque la taille diminue. Le lecteur intéressé trouvera de plus amples explications dans le travail de fin d'études^[5].

Le peu d'influence de la masse moléculaire nous permettra d'utiliser le type de dextran le moins cher. Ce constat est important car le dextran est le plus onéreux des réactifs utilisés pour la synthèse.

3.4 Influence de la quantité de dextran sur la relaxivité protonique

Le produit de synthèse obtenu avec 5 g de dextran 15 000 et un rapport en fer de 0.67 ou de 2 conduit à des particules qui relaxent très peu. Il constitue donc un produit très peu efficace pour un usage en IRM. Les cristaux formés dans ces conditions sont très petits et faiblement aimantés.

La figure 8 montre qu'une diminution de la quantité de dextran permet d'obtenir des échantillons plus aimantés. Pour les échantillons suivants, seule la quantité de dextran utilisée varie.

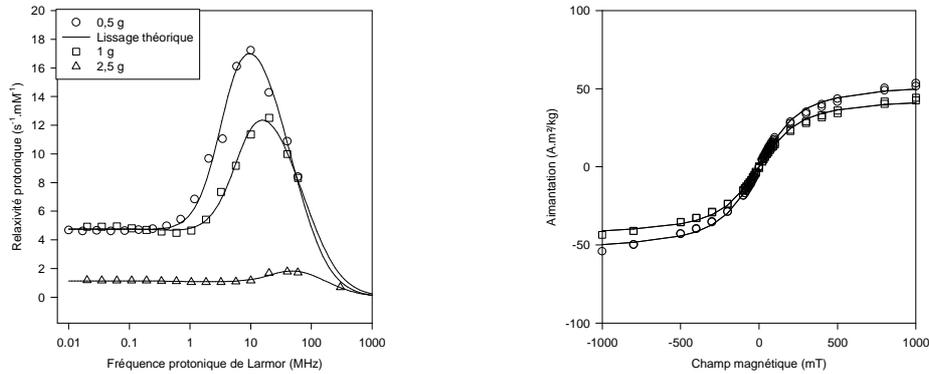


Figure 8 : Courbes de magnétométrie et profils NMRD

Ces essais mettent en évidence d'une part une très faible relaxivité pour l'échantillon préparé avec 2,5 g de dextran et d'autre part une augmentation de la relaxivité à haut champ lorsque la quantité de dextran diminue.

Il serait utile de poursuivre les mesures, notamment pour mettre en évidence une éventuelle saturation de la relaxivité à haut champ. De plus, l'agglomération observée (par mesure de tailles à l'aide d'une technique appropriée) avec 0,5 g de dextran incite à croire que le dextran est en défaut.

Les courbes de magnétométrie se superposent aux erreurs près, ce qui est une preuve de la reproductibilité. L'aimantation de l'échantillon synthétisé avec 2,5 g de dextran était trop faible pour obtenir une courbe de magnétométrie significative.

Une perspective serait de diminuer la quantité de dextran utilisée pour les autres familles de dextran afin de mettre en évidence une éventuelle augmentation de la relaxivité protonique à haut champ. Si tel est le cas, on pourrait optimiser davantage les paramètres et obtenir de plus petites particules possédant de meilleures propriétés.

4. Le greffage

Les échantillons synthétisés sont utilisés pour des essais de vectorisation, via le greffage d'une molécule cible sur la particule. Dans le cadre de ce travail, l'effet du greffage d'une molécule particulière, l'épichlorhydrine, sur les propriétés relaxométriques des particules obtenues est étudié. Cette molécule servira par la suite de centre d'accrochage pour des molécules de ciblage spécifiques comme par exemple des petits peptides.

Un schéma original de fonctionnalisation permettant de simplifier de manière très significative le processus de greffage des molécules cibles sur les particules a été développé au laboratoire. En effet, la molécule active peut être liée au coating au terme de deux ou trois étapes de réaction. Ainsi, par exemple, les fonctions hydroxyles du dextran réagissent avec l'épichlorhydrine puis avec la molécule cible portant un groupement amine^[6].

Un seul type de dextran (le 71 000) est ici représenté car les conclusions que l'on peut tirer des courbes de magnétométrie et relaxométrie illustrées sur la figure 9 sont les mêmes pour tous les dextrans.

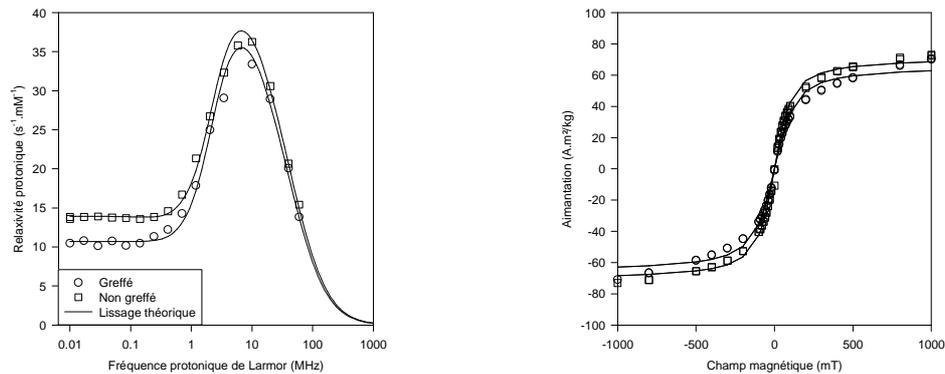


Figure 9 : Courbes de magnétométrie et profils NMRD

Excepté dans le cas d'échantillons fortement agglomérés, les différences entre les courbes magnétométriques et relaxométriques des échantillons greffés et non greffés sont très faibles et peuvent s'expliquer par des erreurs lors des dosages du fer.

La taille hydrodynamique des particules augmente avec le greffage. L'addition à la particule de l'épichlorhydrine ne suffit pas pour expliquer cette augmentation de la taille. Il est donc nécessaire d'admettre la présence d'un processus d'agglomération lors du greffage. Ceci peut poser un problème lors de l'injection de ces particules chez un patient.

5. Conclusions générales

Les premières synthèses réalisées dans le cadre de ce travail sont parfaitement reproductibles avec celles effectuées antérieurement avec le même protocole expérimental et en confirment les résultats.

La masse moléculaire des dextrans, utilisés pour réaliser l'enrobage du cristal de magnétite et assurer la stabilité colloïdale de la suspension, influence très peu la relaxivité à haut champ. Par contre, une diminution de la relaxivité à bas champ est observée lorsque la taille diminue.

La variation du rapport entre la concentration en sels ferreux et ferriques permet de modifier la taille du cristal de magnétite obtenu. Si ce rapport est de 0.67, la relaxivité et la taille du nano-aimant sont plus petites. La relaxivité des échantillons obtenus avec un rapport $[\text{Fe}^{2+}]/[\text{Fe}^{3+}]$ égal à deux annonce une meilleure efficacité comme agent de contraste en IRM. Malheureusement, la reproductibilité de ces échantillons est plus difficile à assurer.

Le greffage de molécules d'épichlorhydrine au dextran semble induire une agglomération que l'on peut suivre grâce à l'évolution de la taille obtenue par photo-corrélation.

6. Références bibliographiques

- [1] LAUTERBUR P.C., *Image formation by induced local interactions : example employing NMR*, Nature. 242 160, 1973.
- [2] TATSUSHI S., SOJI O., MASAKAZU U., NOBUTUSHI A., MASAKI K., *Magnetic resonance imaging of oesophageal squamous cell carcinoma using magnetite particles coated with anti epidermal growth factor receptor antibody*, Int. J. Cancer 75,626-634, 2001.
- [3] MOLDAY R.S., *Magnetic Iron – Dextran Microspheres*, US Patent, International Patent Number : 4,452,773, 1984.
- [4] FASTREZ S., mémoire de licence, *Elaboration et optimisation d'une synthèse reproductible de colloïdes nanoparticulaires magnétiques*, Université de Mons,2002.
- [5] NICOTRA C., mémoire d'Ingénieur Industriel, *Synthèse et caractérisation de nanoparticules superparamagnétiques*, ISIC Ht Mons, 2003-2004.
- [6] Université de Mons-Hainaut, *Projet Nomade : rapport d'activité semestriel*, Subvention unité de recherche universitaire ou de niveau universitaire, 2003