

# THÈSE

UNIVERSITE DE PAU ET DES PAYS DE L'ADOUR

École doctorale des Sciences Exactes et de leurs Applications (ED 211)

Soutenue le 10 décembre 2015

par **Samantha SOULÉ**

pour obtenir le grade de docteur  
de l'Université de Pau et des Pays de l'Adour

**Spécialité : Chimie Physique**

## **Synthèse et caractérisation de nanomatériaux hybrides de type Au@SiO<sub>2</sub> : potentialités dans le domaine de la nanomédecine**

### MEMBRES DU JURY

#### RAPPORTEURS

- Mme Christine DUPONT
- M. Thibaud CORADIN

Professeur / IMCN-BSMA, Université Catholique de Louvain  
Directeur de Recherche CNRS/ LCMCP, Université Pierre et Marie Curie

#### EXAMINATEURS

- Mme Solenne FLEUTOT
- M. Laurent BILLON
- M. Fabien DELPECH

Maître de conférences / IJL-N2EV, Université de Lorraine  
Professeur / IPREM-EPCP, Université de Pau et des Pays de l'Adour  
Professeur / INSA-LPCNO, Université Toulouse III

#### DIRECTEURS et ENCADRANTS

- M. Hervé MARTINEZ
- M. Jean-Charles DUPIN
- M. Joachim ALLOUCHE

Professeur / IPREM-ECP, Université de Pau et des Pays de l'Adour  
Maître de conférences HDR/ IPREM-ECP, Université de Pau et  
des Pays de l'Adour  
Chargé de Recherche CNRS / IPREM-ECP, Université de Pau et  
des Pays de l'Adour



## REMERCIEMENTS

Ce travail a été réalisé au sein de l'équipe de Chimie-Physique de l'Institut des Sciences Analytiques et de Physico-chimie pour l'Environnement et les Matériaux (IPREM, UMR 5254) à Pau. Je tiens à remercier M. Olivier Donard, directeur de l'institut, et Mme Danielle Gonbeau, co-directrice, pour m'avoir accueillie au laboratoire, ainsi que Mme Isabelle Baraille et M. Hervé Martinez pour m'avoir permis de mener à bien mes travaux de thèse dans l'équipe de Chimie Physique.

Par ailleurs, je remercie grandement Mme Christine Dupont et M. Thibaud Coradin d'avoir accepté de rapporter cette thèse, ainsi que Mme Solenne Fleutot, M. Laurent Billon et M. Fabien Delpech d'avoir accepté d'être membres de mon jury de thèse. Je les remercie pour l'intérêt scientifique qu'ils ont porté à ce travail ainsi que pour la discussion enrichissante menée le jour de la soutenance.

Je voudrais encore remercier Hervé Martinez, mon directeur de thèse, pour la confiance qu'il m'a accordé durant ces trois années. Merci d'avoir supporté mon caractère et merci pour tes précieux conseils. J'ai beaucoup appris à tes côtés.

Un grand merci à Jean-Charles Dupin, co-directeur de cette thèse, pour son soutien tant scientifique que pédagogique mais également pour ses qualités humaines. Merci aussi pour toutes ces séances de TP du vendredi que nous avons partagé.

Je remercie également Joachim Allouche, co-encadrant de ce travail. Je ne suis pas prête d'oublier ces longues journées passées dans l'obscurité à enregistrer des images de microscopie électronique sur le site d'Arkema à Lacq.

Un immense merci à Fabien Delpech et Céline Nayral du LPCNO de Toulouse avec qui j'ai eu la chance de collaborer. Vous avez apporté une plus-value indéniable à ce travail. Merci vraiment pour toutes nos discussions, pour votre patience, votre disponibilité mais aussi pour votre pédagogie. Un grand merci également à Héloïse pour son accueil durant mon stage au LPCNO mais aussi à Will, mon maître en synthèse organométallique (ces fameux « Magic Sized » m'en auront fait voir de toutes les couleurs...).

Je tiens à remercier également Yannick Coppel, l'ingénieur RMN (LCC, Toulouse) qui a réalisé l'ensemble des expériences RMN.

Je remercie très chaleureusement Cécile Courrèges pour m'avoir fait partager sa passion pour la RMN. Quel plaisir de travailler avec toi !

Je remercie Frédéric Plantier pour les analyses en volumétrie d'adsorption/désorption d'azote. Nous n'avons travaillé que très peu ensemble mais ce fut un réel plaisir.

Merci à Françoise Portail pour son accueil au GRL d'Arkema à Lacq.

Je souhaite également remercier plusieurs personnes de l'équipe du LCABIE de l'IPREM, en particulier Jérôme Frayret (merci pour le lyoph), Bruno Grassl et Laurent Rodriguez (merci pour la DLS et le zêta), Stéphane Faucher et Gaëtane Lespes qui ont réalisé les analyses ICP-MS. Un grand merci également à Anne-Laure Bulteau et Marlène Dezest qui ont effectué les tests *in vitro* et m'ont initié au domaine de la biologie.

Merci également à Thibaud Coradin, Sylvie Masse et Bernard Haye du LCMCP (Paris) pour les coupes ultra-fines de cellules ainsi que les images de microscopie associées.

Je tiens à remercier sincèrement l'ensemble des membres de l'équipe de Chimie-Physique qui m'ont entouré dans mon travail de tous les jours. Je remercie tout particulièrement Patricia (merci pour ta disponibilité, ta gentillesse et aussi tes sucreries), Jean-Bernard (merci pour ton aide et tes explications qui m'ont presque toujours éclairé), Stéphane (merci de m'avoir prêté quelques fois ta paillasse et pour l'ATG) mais aussi Dominique, Rémi, Delphine, Yann, Mickaël, Sylvie, Pierre, Jérémy, Aurore. J'aimerais aussi grandement remercier M. Michel Loudet (merci pour tous ceux que vous m'avez enseigné, pour m'avoir transmis cette passion et cet intérêt à vouloir comprendre le fond des choses).

Un grand merci également à mes collègues de bureau, Bertrand, Rabeb, Lulu (j'ai vraiment apprécié partager ces années avec toi) et Arnaud (merci pour toutes ces discussions en off ou pas). Merci pour votre soutien tout au long de la thèse.

Une pensée pour ceux qui ont continué avec moi sur le chemin de la thèse : Nico, Damien et Aurélie.

Je tiens à remercier plus longuement mes collègues et amis du midi. Tout d'abord Charlene, mon binôme depuis la Licence 1<sup>ère</sup> année que je n'ai ensuite plus quitté. Merci d'avoir partagé ces huit années à mes côtés, d'avoir supporté mes râleries, d'avoir toujours été là.

Je voudrais également remercier Dimitri. Merci pour ta bonne humeur quotidienne, pour tes blagues (drôles ou pas), tes rébus, tes montages... Bref tu as rendu la période de la rédaction bien plus agréable. Merci aussi de m'avoir supporté jusqu'à la fin ce qui j'en suis sûre, n'a pas dû être tous les jours facile. Merci aussi à Jean-Baptiste, merci pour ton soutien (je n'oublierais pas le petit thé réconfortant que tu m'avais apporté).

Je tiens enfin à remercier tous ceux qui m'ont entouré pendant ces années de thèse : ma famille, mes parents, mes amis de toujours (Camille, Laura). Et enfin un grand merci également à Damien qui a toujours été à mes côtés.

# TABLE DES MATIERES

## ABREVIATIONS

INTRODUCTION GENERALE.....	1
----------------------------	---

## **CHAPITRE I. INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE**

I.	Généralités concernant les nanomatériaux.....	9
II.	L'or à l'échelle nanométrique.....	13
	1. Propriétés physiques.....	13
	a. La résonance plasmon de surface.....	13
	b. Propriétés photothermiques.....	15
	2. Les différents types de nanoshells d'or.....	16
	a. Nanoshells d'or à partir de nanoparticules de SiO <sub>2</sub> .....	17
	b. Nanoshells d'or à partir de nanoparticules métalliques.....	20
	3. Applications biologiques des nanoshells d'or.....	24
III.	Les nanoparticules cœur-coquille Au@SiO <sub>2</sub> .....	25
	1. La silice.....	25
	a. Le procédé sol-gel.....	25
	b. Synthèse de nanoparticules de silice.....	27
	i. Méthode « Stöber ».....	27
	ii. Méthode « Stöber modifiée » : synthèse de nanoparticules de silice mésoporeuse.....	27
	2. Synthèse de nanoparticules Au@SiO <sub>2</sub> .....	31
	a. Les nanoparticules Au@SiO <sub>2</sub> dense.....	31
	b. Les nanoparticules Au@SiO <sub>2</sub> mésoporeuse (Au@mSiO <sub>2</sub> ).....	33
	3. Les nanoparticules hybrides Au@SiO <sub>2</sub> .....	34
	a. Les matériaux hybrides : définition.....	34
	b. Les nanoparticules hybrides : Application biomédicales.....	35
	i. Exemples de nanoparticules hybrides Au@SiO <sub>2</sub> pour la détection.....	35
	ii. Exemples de nanoparticule hybrides pour la délivrance contrôlée.....	36
	i.1. La silice mésoporeuse pour l'encapsulation.....	37
	ii.2. Les bio-hybrides à base de silice pour l'encapsulation.....	38
IV.	Toxicité des nanoparticules.....	42
	1. Généralités.....	42

2. Evaluation de la cytotoxicité in vitro .....	44
V. Propos sur l'analyse des nanoparticules .....	45

## **CHAPITRE II. SYNTHÈSE ET CARACTÉRISATION DE NANOPARTICULES D'OR CREUSES**

I. Méthode de remplacement galvanique pour la synthèse des nanoparticules.....	58
1. Les nanoparticules d'argent gabarits .....	58
a. La réduction par tri-citrate de sodium (méthode Turkevich) .....	58
2. Les nanoshells d'or .....	64
a. Optimisation de l'état de surface des nanoshells .....	64
i. Effet de la température de réaction .....	65
ii. Effet de la nature du précurseur d'or .....	67
b. Modulation des propriétés optiques .....	70
II. Caractérisation physico-chimique de surface des nanoparticules .....	74
1. Spectroscopie Photoélectronique à Rayonnement X.....	74
a. Principe général .....	74
b. Caractérisation XPS de nanoparticules .....	77
c. Conditions expérimentales .....	81
i. Conditions d'analyse XPS .....	81
ii. Préparation/montage de l'échantillon pour l'analyse .....	82
iii. Analyse des spectres XPS .....	83
d. Caractérisation XPS du cœur des nanoparticules .....	84
i. Matériaux référence .....	84
i.1. Composés à base d'argent .....	84
i.2. Composés à base d'or .....	87
ii. Caractérisation des nanoparticules .....	88
ii.1. Les nanoparticules d'argent .....	88
ii.2. Nanoshells d'or (NS) .....	89
2. Spectroscopie d'électrons Auger .....	92
a. Principe général .....	92
b. Conditions expérimentales d'analyse .....	97
c. Préparation de l'échantillon .....	98
d. Résultats .....	99
i. Morphologie des nanoparticules .....	99
ii. Composition de surface des nanoparticules.....	101

**CHAPITRE III. ASSEMBLAGE Au@SiO<sub>2</sub> HYBRIDES MULTIFONCTIONNELS**

I.	Synthèse de la coquille silicique hybride .....	114
1.	Elaboration de la coquille de silice mésoporeuse .....	114
2.	Fonctionnalisation de la coquille de silice mésoporeuse .....	119
II.	Caractérisation physico-chimique des nano-systèmes cœur-coquille.....	126
1.	Analyse XPS des nanoparticules .....	126
a.	Matériaux références .....	126
i.	Silice mésoporeuse de synthèse .....	127
ii.	Les nanovalves .....	127
ii.1.	Le greffon .....	127
ii.2.	Le macrocycle .....	130
ii.3.	Le [2]pseudorotaxane (greffon <sup>+</sup> /CB6) .....	131
b.	Les nanoparticules cœur-coquille fonctionnalisées.....	134
i.	La coquille de SiO <sub>2</sub> mésoporeuse des NS@mSi .....	134
ii.	Les nanoparticules NS@mSi fonctionnalisées .....	134
ii.1.	Greffage (NS@mSi-gref) - Analyse des pics de cœur Si2p et O1s .....	134
ii.2.	Nano-systèmes complets (NS@mSi-valve) .....	135
2.	Analyse par RMN des liquides et des solides des nanoparticules .....	137
a.	Etude préliminaire des matériaux de référence par RMN des liquides .....	137
b.	Caractérisation par RMN des solides <sup>29</sup> Si, <sup>13</sup> C, <sup>1</sup> H .....	141
i.	Analyse par RMN des solides <sup>29</sup> Si .....	141
ii.	Analyse par RMN des solides <sup>13</sup> C (CP-MAS) .....	144
ii.1.	Caractérisation des composés de référence : greffon protoné (greffon <sup>+</sup> ) et macrocycle (CB6) .....	145
ii.2.	Nanoparticules fonctionnalisées (NS@mSi-gref et NS@mSi-valve) .....	146

**CHAPITRE IV. ELABORATION DE NANOSYSTEMES Au@SiO<sub>2</sub> HYBRIDES PAR UNE APPROCHE BIO-INSPIREE**

I.	Elaboration de la coquille hybride polymère/silice .....	170
1.	Adsorption du polymère (NS@polymère) .....	170
2.	Minéralisation de la coquille (NS@polymère/SiO <sub>2</sub> ).....	172
II.	Caractérisation XPS des nanoparticules synthétisées .....	175
1.	Analyse des matériaux de référence .....	175
a.	Les polymères .....	175
b.	Les nanoshells .....	178

2.	Analyse des nanoparticules hybrides .....	179
a.	Les nanoparticules NS@polymère .....	179
b.	Les nanoparticules NS@polymère/SiO <sub>2</sub> .....	182
III.	Discussion .....	185
1.	Nanoparticules NS@polymère .....	185
2.	Nanoparticules NS@polymère/SiO <sub>2</sub> .....	186
IV.	Interaction des nanoparticules avec les cellules :	
	étude de l'exposition à temps court (16h).....	187
1.	Etude de viabilité cellulaire .....	189
2.	Etude de l'internalisation .....	191
	CONCLUSION GENERALE .....	197
	ANNEXES .....	205
	Annexes A.1. Tableau récapitulatif des produits utilisés .....	207
	Annexes A.2. Techniques de caractérisation.....	209
	Annexes A.2.i. Spectroscopie Photoélectronique à rayonnement X.....	210
	Annexes A.2.ii. Résonance Magnétique Nucléaire.....	221



## ABREVIATIONS

AES : Auger Electron Spectroscopy

APTES : 3-aminopropyltriéthoxysilane

BET : Brunauer- Emmett- Teller

CB6 : Cucurbit-[6]-uril

CTAB : Bromure de cetyltriméthylammonium

DFT : Density Functional Theory

DLS : Dynamic Light Scattering

DMF : Diméthylformamide

EDX : Energy Dispersive X-ray spectroscopy

Gél : Gélatine

HAADF : High-Angle Annular Dark-Field imaging

ICP-MS : Inductively Coupled Plasma – Mass Spectrometry

IR : InfraRouge

MCM : Mobil Cristalline Material

MEB : Microscopie Electronique à Balayage

MET : Microscopie Electronique en Transmission

mSi ou mSiO<sub>2</sub>: Silice mésoporeuse

NP : Nanoparticule

NS : Nanoshells

pI : Point isoélectrique

PLL : Poly-L-lysine

PVP : Polyvinylpyrrolidone

RMN : Résonance Magnétique Nucléaire :

- BaBa2Rot : Back-to-Back, 2 Rotations
- CP : Cross Polarization
- DOSY : Diffusion Ordered SpectroscopY
- DQ : Double Quanta
- HMBC : Heteronuclear Multiple-Bond Coherence
- HMQC : Heteronuclear Multiple-Quantum Coherence
- HETCOR : HETeronucler CORrelation
- HSQC : Heteronuclear Single-Quantum Coherence
- MAS : Magic Angle Spinning
- NOESY : Nuclear Overhauser Effect SpectroscopY
- ROESY : Rotating frame nuclear Overhauser Effect SpectroscopY

SAM : Scanning Auger Microscopy

TEOS : Tétraéthoxysilane

TOF-SIMS : Time Of Flight- Secondary Ion Mass Spectrometry

UV-vis : Ultraviolet-visible

SPR : Surface Plasmon Resonance

XPS : X-ray Photoelectron Spectroscopy

- $E_{cin}$  : Energie cinétique
- $E_L$  : Energie de liaison
- FWHM : Full Width at Half Maximum

# INTRODUCTION GENERALE



L'intérêt pour les matériaux de taille nanométrique n'a cessé de croître ces trois dernières décennies avec l'avènement de nouvelles procédures de synthèse et l'essor d'outils d'analyse avec des résolutions spatiales submicroniques. Le sous-dimensionnement en taille des particules conduit intrinsèquement à l'accroissement du rapport surface sur volume qui exalte alors le comportement des atomes externes et donne accès à un nouveau domaine de réflexion où prédominent les effets quantiques. Cette caractéristique dimensionnelle ouvre la voie à des propriétés magnétiques, optiques, électroniques, catalytiques et biologiques uniques, différentes de celles du matériau massif, qui sont très prometteuses pour de nouvelles applications technologiques. Les propriétés des nanomatériaux varient notamment selon leur composition chimique, leur taille, leur surface spécifique, l'état chimique de surface, ou encore la forme du nano-objet considéré. De plus, chaque nanomatériau peut être doté d'une réactivité ou d'un comportement différent selon la formulation et la matrice du produit fini qui le contient.

Désormais, les systèmes nanostructurés ne sont plus seulement confinés dans les laboratoires de recherche, mais sont aujourd'hui intégrés dans de nombreux procédés industriels et participent à la composition d'une multitude de produits utilisés dans la vie courante (la catalyse, les textiles, les aliments, l'électronique, les transports, le stockage et la production de l'énergie ou la santé, etc.).

Il existe une grande variété de nanomatériaux (métaux, oxydes métalliques, silicium, polymères, ...). Parmi ces nanomatériaux, un engouement scientifique s'est développé autour des nanoparticules d'or en raison de leurs propriétés catalytiques intéressantes, de leurs propriétés optiques fascinantes à l'échelle nanométrique et enfin en raison de leur biocompatibilité.

Même si leur tendance à s'agglomérer impose l'utilisation d'agents de stabilisation, ces nanoparticules représentent des objets parfaitement adaptés de par leur synthèse plutôt aisée mais aussi par leur grande capacité de fonctionnalisation (voire de multi-fonctionnalisation) en surface, par greffage de molécules (soufrées ou aminées essentiellement), de molécules biologiques, d'anticorps...

Le choix des stabilisants, présents à la surface métallique, permet d'une part de contrôler la taille, la forme, la composition de la surface et d'autre part de moduler la sélectivité chimique de ces nanoparticules dans le cas des réactions de fonctionnalisation surtout en biologie.

Une nouvelle classe de matériaux, dits « nano-hybrides », est apparue récemment avec la volonté de combiner les spécificités des nanoparticules métalliques et celles d'une phase « couvrante », de nature minérale ou polymérique. L'intérêt pour ces nanocomposites n'a cessé de croître grâce aux progrès soutenus des techniques de fabrication. Ces assemblages, d'au moins deux matériaux nanométriques non miscibles, possèdent des propriétés qui vont au-delà de celles de chacun des constituants. Leur organisation confère des propriétés supplémentaires de type optique, électrique ou magnétique. Ces nano-hybrides sont généralement monophasés (solution solide) ou associés (de type cœur/coquille ou de type Janus) et peuvent être fonctionnalisés en surface grâce à des liaisons chimiques stables entre la particule et des composés organiques ou molécules biologiques. L'intérêt majeur est d'allier les propriétés de la matrice inorganique (optiques, magnétiques...) à celles de molécules organiques par des greffages de surface (fluorescence, activation biologique...).

Les objectifs de ce travail ont été d'aborder l'étude de systèmes nanostructurés dans leur ensemble, de la synthèse à la caractérisation physico-chimique, en apportant également des premières données biologiques.

Dans ce contexte, nos travaux se sont orientés vers la synthèse par voie chimique de nanoparticules hybrides cœur-coquille Au@SiO<sub>2</sub> avec l'intention de modifier les morphologies déjà connues pour générer une fonction spécifique de délivrance moléculaire. En adaptant les procédures de synthèse (remplacement galvanique à partir de « gabarits » pour le cœur et méthode sol-gel pour la coquille), il semble effectivement possible d'associer les propriétés optiques du nano-cœur d'or (résonance plasmon) avec celles de la coquille minérale (confinement moléculaire intra-pore). C'est ainsi que dans le domaine de la médecine, les nanotechnologies ouvrent aujourd'hui un réservoir d'applications encore peu exploré et permettent d'envisager par exemple de nouveaux traitements pour des pathologies telles que le cancer ; en effet, le transport de molécules anticancéreuses par des nanoparticules permet d'augmenter leur sélectivité pour les tumeurs, et ainsi de réduire les sévères effets secondaires accompagnant les chimiothérapies. Ces nanoparticules, capables de délivrer sélectivement un principe actif (greffé en surface ou confiné dans un réseau) dans les cellules cibles, incarnent la version moderne des « magic bullets » imaginées au début du XX<sup>ème</sup> siècle par le médecin allemand Paul Ehrlich<sup>1</sup>. Les nanoparticules peuvent également être utilisées pour d'autres types de thérapies, telles que la radiothérapie ou encore la thermothérapie. Cette dernière, connue également sous le nom d'hyperthermie consiste à provoquer par une source extérieure (magnétique ou laser par exemple) un échauffement local grâce à des nanoparticules situées dans la zone à traiter, de manière à ce que l'énergie dissipée soit suffisante pour élever la température de quelques degrés (autour de 45°C) induisant la destruction des cellules.

Dans cette étude, la libération des molécules invitées est conditionnée par l'activation de nanovalves organiques greffées en surface de la coquille suite à la photostimulation du cœur d'or par un laser opérant dans la gamme des longueurs d'onde de la fenêtre biologique. L'ouverture des pores est déclenchée par effet thermique via l'irradiation des particules dans le proche infrarouge induisant un échauffement local du cœur d'or et finalement la désorganisation des nanovalves. Dans cette réflexion globale autour de la fonctionnalité de la coquille, une évolution a également été imaginée avec un intérêt particulier porté à des couches externes alternatives à base de polymère ou de biopolymère afin d'améliorer la biocompatibilité d'ensemble.

Au-delà de la synthèse contrôlée des nanoparticules, le fil conducteur de cette thèse a été également de proposer, en marge des analyses classiques effectuées par microscopie électronique, une description approfondie de l'état chimique de ces nano-objets par le biais de techniques d'analyse de surface

---

<sup>1</sup> K. Strebhardt, A. Ullrich, *Nature Reviews Cancer*, 8 (2008) 473-480

(spectroscopie photoélectronique à rayonnement X (XPS) et spectroscopie d'électrons Auger (AES)). Leur caractère nanostructuré nous a également conduit à développer de nouvelles procédures analytiques couplées (coupe transverse ionique/spectroscopie d'électrons) afin de mieux percevoir l'architecture de leur assemblage. Cette approche spectroscopique dans le domaine des nanosciences est novatrice au sein de l'équipe même si elle repose sur des compétences reconnues depuis plusieurs années autour de la caractérisation des surfaces. L'avenir du développement de tels systèmes réside sûrement dans la compréhension des interfaces entre les phases interne et externe même si leur description est complexe à appréhender, comme nous aurons l'occasion de le montrer dans ce travail.

Une partie de nos résultats est le fruit d'une collaboration avec le Laboratoire de Physique et de Chimie des Nano-Objets de Toulouse (LPCNO, UMR5215 CNRS). Cette collaboration a donné une plus-value indéniable à l'étude, avec des analyses RMN réalisées en phase liquide et solide et qui se sont avérées être le parfait complément des analyses de surface pour la compréhension de la fonctionnalisation des assemblages cœur-coquille.

Ce manuscrit est divisé en quatre chapitres. Afin d'introduire les nano-systèmes étudiés, le premier chapitre du mémoire présente quelques généralités sur les nanomatériaux avant d'aborder les différents aspects (synthèse-caractérisation-propriétés) des nanosystèmes Au@SiO<sub>2</sub>. Le choix a été fait de présenter cette partie bibliographique sous l'angle de l'application potentielle des nanoparticules considérées dans ce travail, même si notre étude se situe naturellement nettement plus en amont.

Le deuxième chapitre porte sur la synthèse et la caractérisation du cœur des assemblages hybrides. Le procédé de remplacement galvanique sera étudié pour la mise en œuvre de nanoparticules d'or creuses appelées « nanoshells ». L'influence de plusieurs paramètres de synthèse sur la morphologie et la structure des nano-objets sera dans un premier temps discutée. La résonance plasmon à l'origine des propriétés optiques et photothermiques de ces nanoparticules sera par la suite modulée en considérant l'application potentielle de ces objets en nanomédecine. La description physico-chimique des nanoparticules sera réalisée par spectroscopie photoélectronique à rayonnement X (XPS) et spectroscopie d'électrons Auger (AES). Une approche analytique originale sera également proposée avec la coupe transverse de nanoparticules ; l'enjeu est ici de mieux comprendre la mécanistique du processus de formation de ces nanoparticules creuses.

Une troisième partie sera consacrée à l'élaboration de la coquille hybride de silice mésoporeuse autour des nano-cœurs métalliques, l'objectif étant de combiner les propriétés photothermiques du cœur et la fonction de « réseau hôte » de la couche inorganique. Les nanoparticules cœur-coquille seront fonctionnalisées avec des assemblages supramoléculaires mécanisés (nanovalves) constitués d'une entité linéaire moléculaire (greffée) et d'une entité cyclique macromoléculaire, toutes deux en interaction à la surface des nanoparticules. L'optimisation de tels systèmes nécessite une caractérisation

physico-chimique approfondie. Ainsi, une étude détaillée XPS/RMN sera présentée et apportera une description précise des différentes interfaces organiques-inorganiques (greffage) et organiques-organiques (nanovalves) existantes.

Le quatrième et dernier volet constitue une ouverture vers l'élaboration des systèmes Au@SiO<sub>2</sub> via une approche dite « biomimétique ». Le mécanisme de biosilicification, inspirée des diatomées, sera adapté pour la réalisation de nanocomposites caractérisés par une coquille hybride polymère/silice. L'influence de la nature et de la structure du polymère utilisé sur la morphologie des couches obtenues sera dans un premier temps discutée. La nature physico-chimique des coquilles élaborées sera ensuite appréhendée par des analyses en spectroscopie photoélectronique à rayonnement X. Enfin, l'impact des nano-objets sur des cellules de type HaCaT sera étudié *in vitro* en terme de cytotoxicité et d'internalisation cellulaire.



# CHAPITRE I.

INTRODUCTION

BIBLIOGRAPHIQUE



## I. Généralités concernant les nanomatériaux

Le vingtième siècle a été témoin d'avancées spectaculaires dans notre compréhension de la matière qu'elle soit inerte ou vivante. À la suite d'une longue série de découvertes, s'agissant du développement de nouvelles méthodes d'élaboration (synthèse chimique, épitaxie, lithographie etc...) ou de techniques d'observation microscopiques de plus en plus performantes, il est désormais possible de « voir » et d'agir à l'échelle de la molécule voire de l'atome. Ces évolutions techniques ou scientifiques ont donné naissance aux nanosciences et nanotechnologies, qui ont pour objet l'étude, la manipulation de la matière et la conception de dispositifs à l'échelle du nanomètre ( $10^{-9}$  m ou le milliardième de mètre). Il ne s'agit pas d'une discipline à part entière mais plutôt d'une science interdisciplinaire regroupant la physique, la chimie, la biologie et l'ingénierie autour de cette échelle de longueur<sup>[1-4]</sup>.

Le terme de nanomatériau est devenu d'un usage courant, mais il est dans une certaine mesure difficile à définir ; en tous cas il demande à être précisé au cas par cas car il ne fait pas nécessairement référence, comme son nom le suggère, à un matériau dont la taille est strictement confinée au nanomètre. Ce terme est issu finalement des évolutions qui sont intervenues dans le domaine des sciences et des technologies concernant l'amélioration des connaissances dans l'organisation de la matière. L'organisation intramoléculaire était connue ou au moins soupçonnée depuis le début du siècle précédent, mais au-delà, c'est-à-dire l'organisation des espèces atomiques, ioniques ou moléculaires dans les phases condensées, le caractère aléatoire ou non aléatoire de leur répartition, étaient ignorés. En ce qui concerne la matière cristalline, la connaissance était bornée par la puissance d'investigation des outils de recherche dont on disposait. La microscopie optique classique dont la limite théorique est de l'ordre des longueurs d'onde du visible (plusieurs centaines de nanomètres), permettait de reconnaître les grains cristallins et les joints de grain, sans pour autant accéder à leur organisation interne.

Dans ce contexte difficile à normaliser, on considère aujourd'hui que l'on a affaire à un nanomatériau lorsque son échelle de constitution est inférieure à une limite en-dessous de laquelle ses propriétés sont différentes de celles du matériau massif habituel (de l'ordre de quelques nanomètres) (Figure I-1).

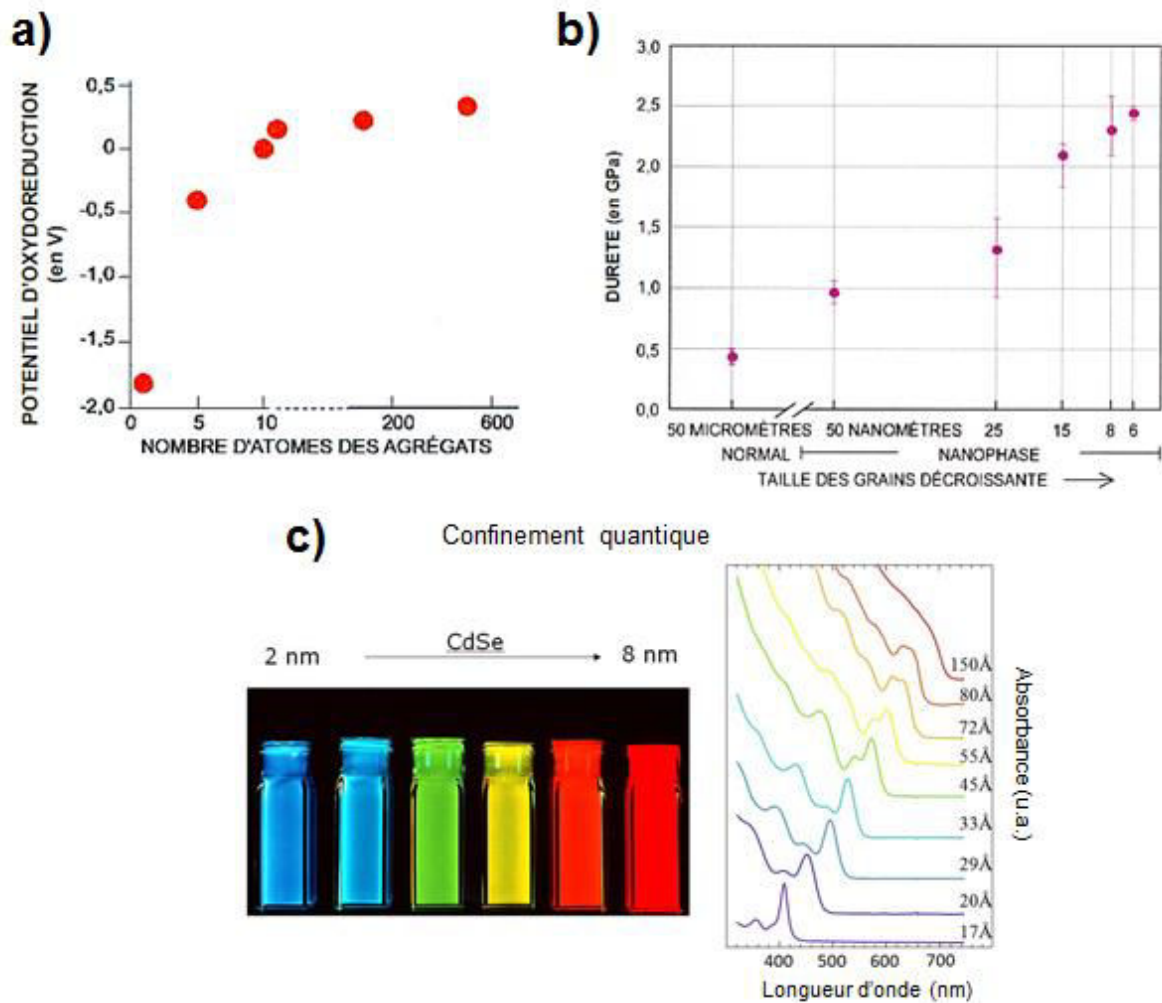
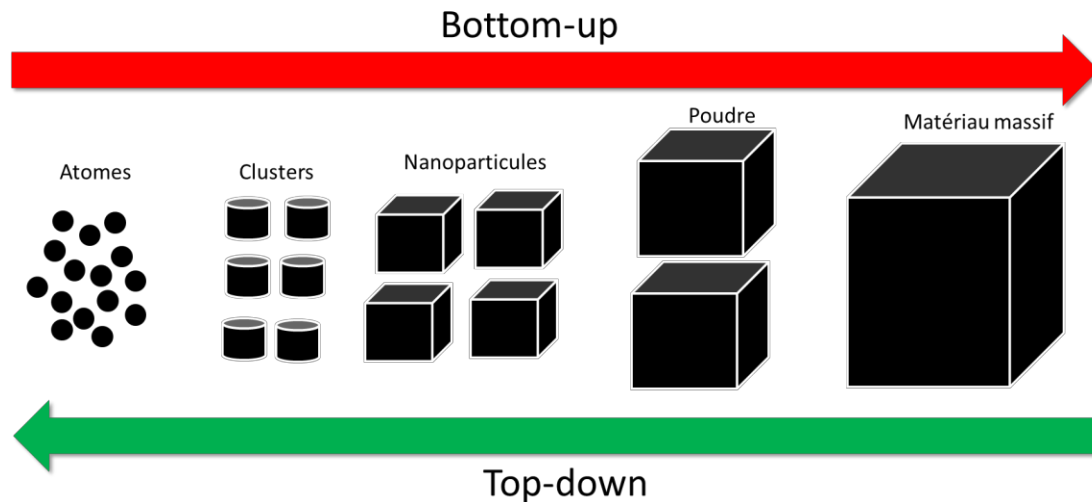


Figure I-1 : Exemples de propriétés de nanomatériaux dépendant de leurs tailles : a) Potentiel d'oxydoréduction d'agrégats d'argent. Grâce à cette étude, le mécanisme du développement photographique, employé empiriquement depuis plus d'un siècle est enfin complètement expliqué<sup>[5]</sup>. b) Evolution de la dureté du cuivre en fonction de la taille de ses grains. Le cuivre nanophasé est 5 fois plus dur que le cuivre ordinaire (absence de dislocations)<sup>[5]</sup>. c) Effet du confinement quantique : évolution de photoluminescence induite sous éclairage UV et de l'absorbance de nanocristaux de semi-conducteurs CdSe en fonction du diamètre moyen des nanoparticules<sup>[6]</sup>.

En fonction du domaine d'application et/ou des disciplines des chercheurs, la conception et l'élaboration de dispositifs ou matériaux à l'échelle nanométrique ont suivi historiquement deux voies diamétralement opposées qui sont (Figure I-2) :

- la démarche, dite « *top-down* » ou *descendante* issue de la microélectronique, consiste à miniaturiser les systèmes actuels en optimisant les outils d'investigation, d'analyse et les technologies existantes, afin de passer de l'objet centimétrique ou millimétrique à un objet de dimensions nanométriques ;

- la démarche inverse, qualifiée de « *bottom-up* » ou *ascendante* issue généralement des disciplines de la chimie, consiste à construire des nanomatériaux atome par atome, molécule par molécule ou agrégat par agrégat. L'assemblage ou le positionnement de ces « briques » s'effectue de façon précise, contrôlée et exponentielle, permettant ainsi l'élaboration de matériaux fonctionnels dont la structure doit être complètement maîtrisée.



**Figure I-2 : Schématisation des démarches « bottom-up » et « top-down » dans la construction de matériaux et dispositifs en nanotechnologie**

Depuis la fin des années 1990, les nanosciences et nanotechnologies offrent d'importantes perspectives dans de nombreux secteurs, en particulier ceux qui concernent trois thèmes importants aux yeux de nos sociétés actuelles :

- *l'environnement et le développement durable*. Les nanotechnologies permettraient d'utiliser l'énergie de façon plus rationnelle, de réaliser des produits moins gourmands en matières premières, de mettre au point de nouveaux procédés de dépollution ;
- *le traitement des informations et la communication*. On peut espérer traiter des données, les stocker et communiquer avec des capacités largement supérieures à celles dont on dispose de nos jours ;
- *la santé*. En interfaçant la matière inerte au niveau moléculaire avec le vivant, on serait plus efficace pour concevoir des méthodes de diagnostic, des thérapies originales voire à plus long terme des substituts pour des organes défaillants.

C'est en effet à des échelles comprises entre le nanomètre et le micromètre qu'opère le vivant. Les cellules, unités fonctionnelles de quelques micromètres de diamètre réalisent les réactions chimiques nécessaires à leur survie, leur croissance ou leur multiplication au sein de compartiments de quelques nanomètres cubes. Le passage à l'intérieur des cellules de composés chimiques (médicaments,

médiateurs, métabolites, etc.) se fait au travers de pores de quelques nanomètres. Les nombreuses molécules (protéines réceptrices, immunoglobulines, récepteurs membranaires) qui sont des agents de la réponse biologique ont des dimensions caractéristiques de l'ordre de la dizaine de nanomètres. Il était donc naturel que les nanotechnologies rencontrent les sciences biologiques<sup>[4]</sup>.

Dans ce domaine très vaste des nanomatériaux pour la santé, il existe maintenant un nombre conséquent de nanosystèmes dont les architectures, la composition chimique ou les fonctionnalités sont particulièrement variées. Toutefois, les recherches engagées aujourd'hui se concentrent pour une bonne partie sur des fonctions de diagnostic ou de thérapie (hyperthermie magnétique<sup>[7]</sup> ou photothermie<sup>[8,9]</sup>, libération contrôlée d'un principe actif<sup>[10]</sup>) avec de plus en plus la combinaison de ces deux fonctions (agents « théranostiques »)<sup>[11]</sup>.

En thérapie, il est maintenant généralement admis que trois aspects essentiels sont à considérer. Le premier aspect concerne la protection d'un éventuel principe actif ou médicament (fonction réservoir du matériau). Un exemple de systèmes très répandus concerne les vésicules de type liposomes formées par organisation supramoléculaire de molécules amphiphiles, comme par exemple des phospholipides, des sphingolipides, des surfactants non ioniques, des stérols voire des lipides chimiquement modifiés<sup>[12]</sup>. Une phase lipidique se retrouve enfermée au sein du liposome qui exprime, à sa périphérie, un caractère hydrophile qui facilite leur dispersion dans des solvants aqueux. Ainsi des médicaments (souvent lipophiles) peuvent être circonscrits à l'intérieur du liposome. Plus récemment, un vif intérêt a été porté aux structures cœur@coquille hybrides avec l'idée de l'insertion du médicament dans un réseau poreux silicique<sup>[13,14]</sup>.

Le deuxième aspect concerne le transport du matériau et/ou la vectorisation d'un principe actif dans un milieu biologique vers sa cible. Ce ciblage peut être conduit par modification chimique des nanomatériaux en utilisant des molécules actives ayant une affinité spécifique pour des récepteurs exprimés ou surexprimés chez certaines cellules malades<sup>[15]</sup>.

Enfin, le troisième aspect concerne le déclenchement de l'action thérapeutique. Il s'agit dans ce cadre d'élaborer des systèmes capables de libérer un médicament<sup>[16]</sup> ou d'induire un échauffement local<sup>[7,9]</sup> (hyperthermie) via des stimuli extérieurs (irradiation, champ magnétique, variation de pH...)

C'est dans ce contexte très vaste des nanomatériaux pour la santé que nous nous sommes intéressés dans ce travail plus particulièrement à un système de type cœur-coquille associant un cœur métallique à base d'or et une coquille silicique. Un état de l'art précis sur ces deux entités, leurs propriétés intrinsèques, leur mise en forme et leurs applications est reporté dans les paragraphes suivants.

## II. L'or à l'échelle nanométrique

Les nanoparticules d'or apparaissent comme des objets parfaitement adaptés pour des applications biologiques du fait de leur biocompatibilité mais également de par leurs propriétés thérapeutiques qui sont directement liées à l'émergence de propriétés originales à l'échelle nanométrique.

### 1. Propriétés physiques

#### a. La résonance plasmon de surface

A l'échelle nanométrique, le couplage entre les phénomènes de confinement électronique et les effets de surface implique l'apparition de nouvelles propriétés. En particulier, les nanoparticules de métaux nobles présentent des propriétés optiques remarquables qui expliquent en partie tout l'intérêt qu'elles suscitent.

L'histoire des nanoparticules d'or commence un peu avant le Moyen-âge et se poursuit ensuite au XVII<sup>ème</sup> siècle. Leurs propriétés, bien que méconnues à l'époque, étaient utilisées par les maîtres verriers pour teinter les vitraux d'une couleur rubis.

Faraday<sup>[17]</sup> expliqua ensuite de manière empirique que cette couleur rouge était due à l'or métallique sous sa forme colloïdale. En 1908, Mie<sup>[18]</sup> fut le premier à expliquer ce phénomène de manière théorique par la résolution des équations de Maxwell pour l'absorption et la diffusion d'une onde électromagnétique par des particules sphériques.

L'origine physique de ces propriétés optiques résulte du phénomène appelé la « résonance plasmon de surface ». L'interaction du champ électromagnétique incident avec la nanoparticule métallique induit un dipôle électrique caractérisé par une oscillation cohérente des électrons de conduction localisée au niveau de la surface (Figure I-3).

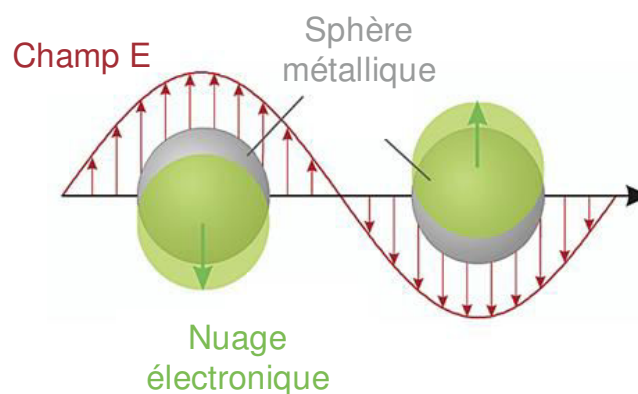
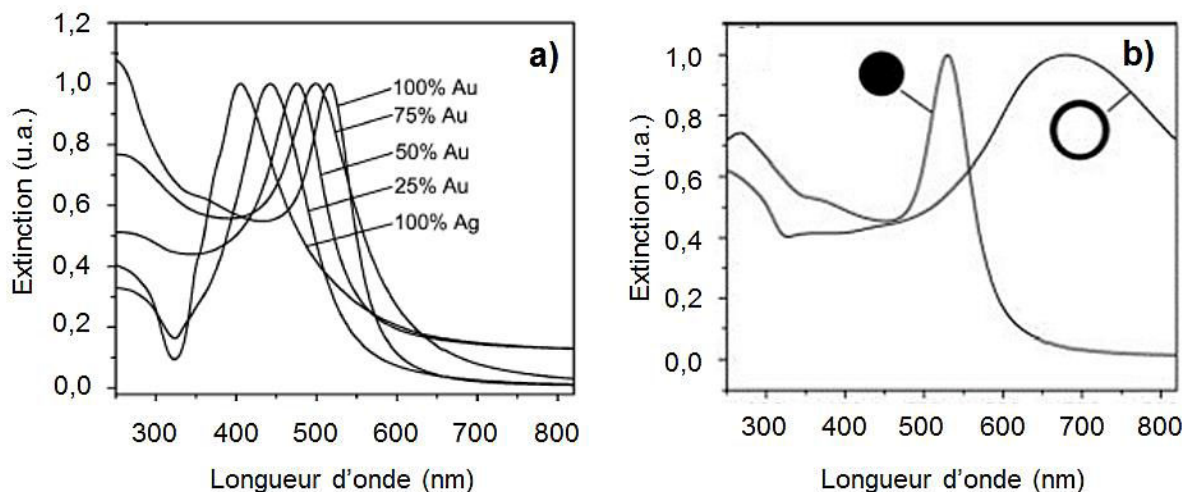


Figure I-3 : Schéma de principe de la résonance plasmon de surface<sup>[19]</sup>

Lorsque la fréquence d'oscillation du gaz d'électrons libres est équivalente à celle du champ excitateur, le système entre en résonance. A la fréquence de résonance plasmon, la polarisation de la particule induit une exaltation du champ électrique près de la surface qui se traduit par l'apparition d'une bande d'absorption dans la région du visible pour les particules de métaux nobles. Dans le cas précis de nanoparticules d'or de 15 nm<sup>[20]</sup>, cette résonance est détectée autour de 520 nm et traduit la couleur rouge rubis observée.

De façon intéressante, les propriétés optiques des nanoparticules d'or peuvent être modulées en fonction de l'application recherchée. En effet la cristallinité du matériau, sa nature chimique<sup>[21]</sup>, la taille<sup>[22]</sup>, la forme des particules<sup>[23]</sup>, la nature du milieu environnant<sup>[24]</sup> ainsi que la distance inter-particules<sup>[25]</sup> sont autant de paramètres qui influencent la résonance plasmon de surface.

Par exemple, la résonance plasmon de nanoparticules d'argent est localisée à 405 nm alors que celle de nanoparticules d'or se situe autour de 516 nm. Dans le cas de nanoparticules composées d'un alliage Ag-Au, la bande plasmon apparaît alors à une position intermédiaire entre ces deux valeurs et se déplace vers le rouge lorsque la quantité d'or augmente<sup>[21]</sup> (Figure I-4.a).



**Figure I-4 : Influence de a) la composition<sup>[26]</sup> et b) la forme<sup>[27]</sup> des nanoparticules sur la longueur d'onde de la résonance plasmon**

La morphologie des nanoparticules semble influencer de manière plus importante la position ainsi que la largeur de la bande plasmon. Ainsi, dans le cas de nanoshells d'or (particules sphériques creuses), qui consistent en un cœur diélectrique et une coquille métallique (or), celle-ci est considérablement déplacée vers le rouge (de 150 nm environ) par rapport à des nanosphères pleines d'or de même dimension<sup>[27]</sup> (Figure I-4.b).

Les propriétés optiques fascinantes de ces nanoparticules peuvent être exploitées de nombreuses manières. En effet, ces champs électromagnétiques intenses générés au voisinage de l'interface particule/milieu environnant permettent par exemple d'amplifier des effets non linéaires tels que la génération de seconde harmonique par la surface ou la diffusion inélastique par les molécules<sup>[28]</sup>. Cette



dernière est d'ailleurs au cœur de la spectroscopie Raman exaltée de surface (SERS) qui permet de résoudre la structure chimique de matériaux même à l'échelle de molécules uniques<sup>[29]</sup>.

De plus, du fait de leur section efficace d'absorption et de diffusion importantes, les nanoparticules d'or sont en particulier très étudiées pour des applications en imagerie, diagnostic et thérapie du cancer.

## b. Propriétés photothermiques

Le phénomène de résonance plasmon est à l'origine de propriétés photothermiques. En effet, la photo-excitation des nanoparticules d'or conduit à la formation d'un gaz d'électrons chauds qui se refroidit rapidement ( $t \approx 1$  ps) par relaxation dans le réseau cristallin via des interactions électron-phonon. Un échange thermique avec le milieu environnant se produit ensuite via des interactions phonon-phonon, diminuant ainsi la température du réseau cristallin<sup>[30]</sup>. L'efficacité de cet échange dépend des propriétés thermiques de l'interface et de la matrice environnante.

Cette capacité à convertir, de manière efficace, l'énergie absorbée en un échauffement localisé en fait de bons candidats pour la destruction de cellules cancéreuses par photothermie.

Généralement, le potentiel photothermique est dans un premier temps mis en évidence en solution. De cette manière, Xia et *al.*<sup>[31]</sup> ont pu montrer l'effet de la puissance laser utilisée pour un temps d'exposition donné. En effet, pour une concentration de  $10^{11}$  particules/ml, après 10 minutes d'exposition, la variation de température est égale à  $43,9^\circ\text{C}$  dans le cas d'une puissance de  $1 \text{ W/cm}^2$ , alors qu'elle est de  $34,5^\circ\text{C}$  avec une puissance de  $0,5 \text{ W/cm}^2$ . L'influence de la concentration en nanoparticules pour une puissance laser donnée ( $1 \text{ W/cm}^2$ ) a également été étudiée. Comme le montre la Figure I-5, une concentration de  $10^9$  nanoparticules/ml (équivalent à environ 1 ppm d'or dans ce cas) suffit à augmenter la température de  $5\text{-}10^\circ\text{C}$  et donc à causer des dommages irréversibles aux cellules et aux tissus du fait de la dénaturation des biomolécules<sup>[32]</sup>.

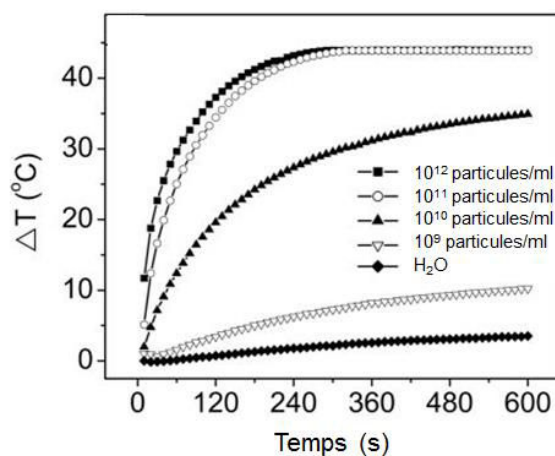


Figure I-5 : Evolution de la température de suspensions de nanocages d'or (nanocubes creux) de différentes concentrations en fonction du temps d'exposition laser ( $1 \text{ W/cm}^2$ )<sup>[31]</sup>

Afin d'envisager des traitements, il faut cependant que la fréquence de résonance plasmon des nanoparticules d'or appartienne à la fenêtre biologique. Dans cette zone du proche infrarouge, située entre 650 et 900 nm, la pénétration de la lumière est maximale en raison de la diminution des coefficients d'absorption de l'eau et de l'hémoglobine des tissus (Figure I-6).

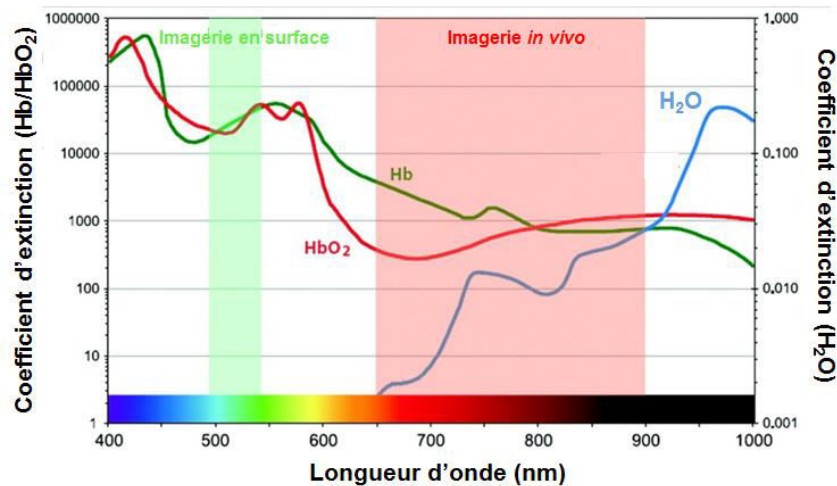


Figure I-6 : Evolution des coefficients d'extinction de l'hémoglobine (Hb, HbO<sub>2</sub>) et de l'eau dans la région du visible – proche IR<sup>[33]</sup>

Les trois principales approches permettant d'adapter les propriétés optiques des nanoparticules à cette fenêtre consiste à: i) synthétiser des nanoparticules allongées appelées nanobâtonnets qui présentent deux fréquences de résonance dont une dans le proche IR (mode de résonance longitudinal), ii) recouvrir la surface de nanoparticules sphériques diélectriques avec une coquille d'or (nanoshells) et enfin, iii) vider l'intérieur de nanoparticules d'or pour former des « nanobox », « nanocages », « nanoshells » qui sont des objets creux. De plus, le développement des méthodes de synthèses permet aussi l'exploitation et la maîtrise de nouvelles formes « exotiques » telles que les « nanostars » ou encore les « nanohexapods »<sup>[18]</sup>.

Dans le cadre de ce travail, nous avons décidé de nous focaliser sur l'étude des nanoshells qui sont plutôt bien adaptées à des utilisations potentielles en nanomédecine.

## 2. Les différents types de nanoshells d'or

Deux grandes méthodes de synthèse sont reportées dans la littérature pour l'élaboration des nanoshells d'or. Elles se différencient par la nature du cœur diélectrique qui peut être :

- soit un cœur solide du type polymérique<sup>[35]</sup> ou silicique<sup>[36]</sup>
- soit un cœur creux<sup>[37]</sup>

### a. Nanoshells d'or à partir de nanoparticules de SiO<sub>2</sub>

Oldenburg et al.<sup>[36]</sup> ont réalisé la première synthèse de nanoshells d'or par un procédé qui peut être décrit en 3 étapes (Figure I-7). La première consiste à synthétiser des nanoparticules de silice via le procédé Stöber<sup>[38]</sup> qui permet d'obtenir des nanoparticules relativement monodisperses. Dans un second temps, la surface de ces nanoparticules est fonctionnalisée avec le 3-aminopropyltriéthoxysilane (APTES). Enfin la dernière étape consiste à utiliser la méthode de « croissance ensemencée » (« seed-growth » en anglais pour germination-croissance) pour la formation de la coquille d'or. Pour cela, la surface de silice est tout d'abord décorée avec de très petites nanoparticules d'or (1 à 3 nm) par simple adsorption (Figure I-8.a). Les interactions mises en jeu entre les groupements amines, majoritairement sous la forme R-NH<sub>3</sub><sup>+</sup> à pH < 10, et les particules d'or, chargées négativement, sont purement électrostatiques. Ensuite, la croissance de ces particules isolées se fait par réduction d'un mélange d'acide chloroaurique et de carbonate de potassium par du borohydrure de sodium dans ce cas précis.

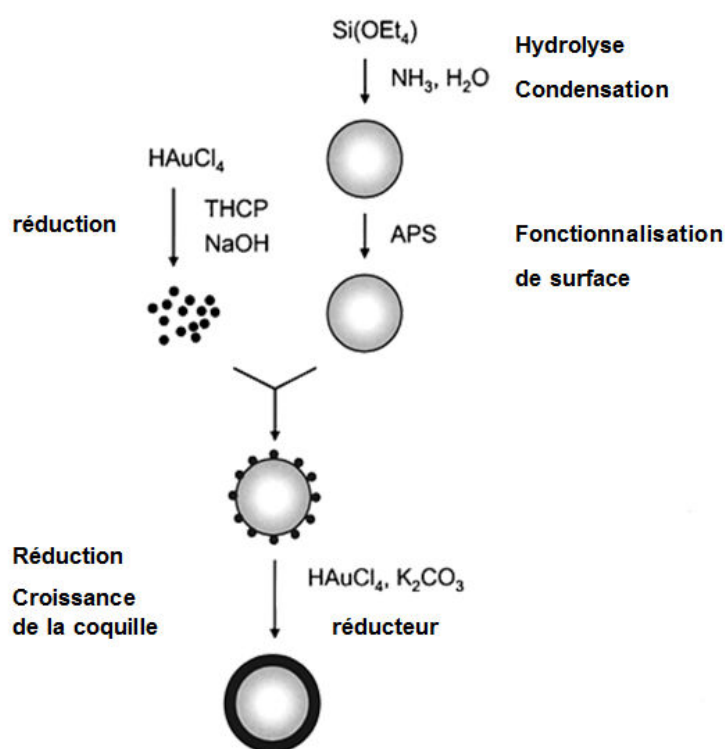
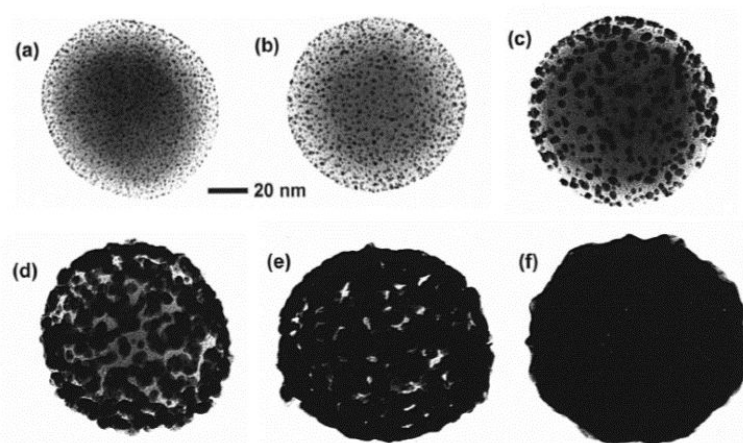


Figure I-7 : Schématisation des étapes de la synthèse de nanoshells mise au point par Oldenburg et al.<sup>[36,39]</sup>

Les clichés MET (Figure I-8.b-f) illustrent parfaitement la croissance progressive de la coquille métallique. Au début de la réaction, la taille des nanoparticules d'or adsorbées augmente (Figure I-8.b-c). Elles commencent ensuite à coalescer à la surface de la silice (Figure I-8.d-e) pour finalement former une coquille continue de 33nm d'épaisseur (Figure I-8.f).

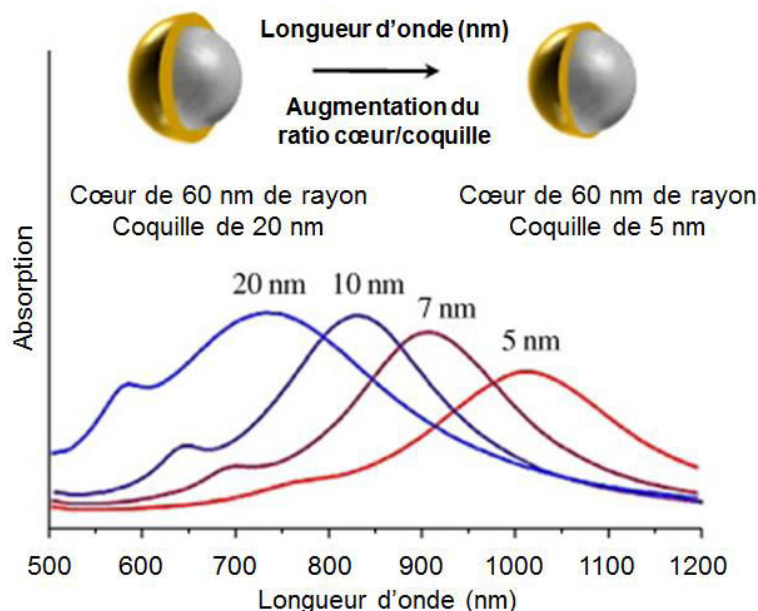


**Figure I-8 : Clichés MET de la croissance de nanoshells sur un cœur de silice de 120 nm ; a) nanoparticule de silice décorée avec des nanoparticules d'or, b)-e) croissance et coalescence des nanoparticules d'or à la surface, f) nanoshell d'or métallique<sup>[36]</sup>**

La modification de surface des nanoparticules de  $\text{SiO}_2$  est une étape essentielle de ce procédé. Elle conditionne le taux de couverture par les nanoparticules d'or qui jouent le rôle important de sites de nucléation pour la croissance de la coquille. Ainsi, l'utilisation de polyélectrolytes tels que le chlorure de poly(diallyldiméthylammonium) (PDADMAC)<sup>[40]</sup> ou encore le poly(éthylèneimine) (PEI)<sup>[41]</sup> permet d'augmenter le taux de couverture (supérieur à 40% pour le PDADMAC contre 15-30% pour l'APTES<sup>[36]</sup>) par la présence d'un nombre de groupements amines plus important.

L'étape suivante de la croissance de la coquille d'or est en particulier dépendante de la nature du réducteur utilisé. Pour obtenir une coquille bien définie, uniforme et continue, il est important que la croissance de tous les germes d'or à la surface de la silice soit simultanée. Il faut également éviter la formation de particules d'or secondaires qui pourraient venir s'accrocher à la surface des nanoshells et modifier l'état de surface. Par conséquent, de nouveaux réducteurs, plus faibles que le borohydrure de sodium<sup>[36]</sup>, qui a tendance à favoriser la formation de nouvelles particules, ont été étudiés. En effet, la force du réducteur a une influence sur la vitesse de réduction et par conséquent sur la croissance de la coquille d'or. Le formaldéhyde<sup>[42]</sup>, qui réagit très lentement, conduit lui aussi à la précipitation de l'or en solution. D'autres réducteurs intermédiaires ont donc été testés comme le chlorohydrate d'hydroxylamine<sup>[39]</sup>, le glucose<sup>[43]</sup> ou le monoxyde de carbone<sup>[44]</sup> qui conduit d'ailleurs à une coquille relativement fine et donc à une absorbance dans la zone du proche IR.

Les propriétés optiques de ces matériaux sont directement reliées, comme l'ont montré des calculs théoriques<sup>[19]</sup>, au rapport entre le diamètre du cœur de SiO<sub>2</sub> et l'épaisseur de la coquille d'or. Plus ce rapport est grand et plus la bande plasmon est déplacée vers le proche IR. Il est donc possible de moduler l'absorbance de ces nanoparticules en jouant sur la taille du cœur et sur l'épaisseur de la coquille (Figure I-9).



**Figure I-9 : Spectres d'absorption de nanoshells métalliques (cœur de silice, coquille d'or) calculés théoriquement en fonction du ratio rayon du cœur : épaisseur de la coquille<sup>[36]</sup>**

La construction d'une coquille suffisamment fine pour déplacer la bande plasmon dans le proche IR est fortement limitée par la taille des nanoparticules d'or primaires adsorbées (environ 2 nm) qui servent de sites de nucléation. Ainsi, la plupart des travaux rapportent la synthèse de nanoshells de taille comprise entre 80 et 150 nm. En dessous de ces tailles, les nanoshells ont très fortement tendance à s'agréger lors de la synthèse<sup>[46]</sup>.

De nombreuses méthodes dérivées du procédé de synthèse classique ont été développées afin de réduire le nombre d'étapes, améliorer la reproductibilité et pallier à cette contrainte de taille: synthèse de nanoparticules de silice déjà fonctionnalisées (co-condensation) ou encore procédé de déposition-précipitation qui supprime l'étape d'adsorption des germes<sup>[47]</sup>.

Néanmoins, l'ensemble de ces synthèses dépendent de nombreux paramètres (taille des particules de SiO<sub>2</sub>, pH, température, concentration des réactifs) qui ont une influence importante sur la structuration de la coquille d'or.

## b. Nanoshells d'or à partir de nanoparticules métalliques

Une deuxième approche plutôt originale consiste à utiliser des nanoparticules métalliques comme gabarits. Elle est basée sur une réaction de remplacement galvanique qui a lieu spontanément en solution lorsque les atomes d'un métal réagissent avec des ions métalliques ayant un potentiel électrochimique plus important. Les atomes métalliques sont oxydés et dissous en solution pendant que les ions métalliques sont réduits à la surface des gabarits (Figure I-10).

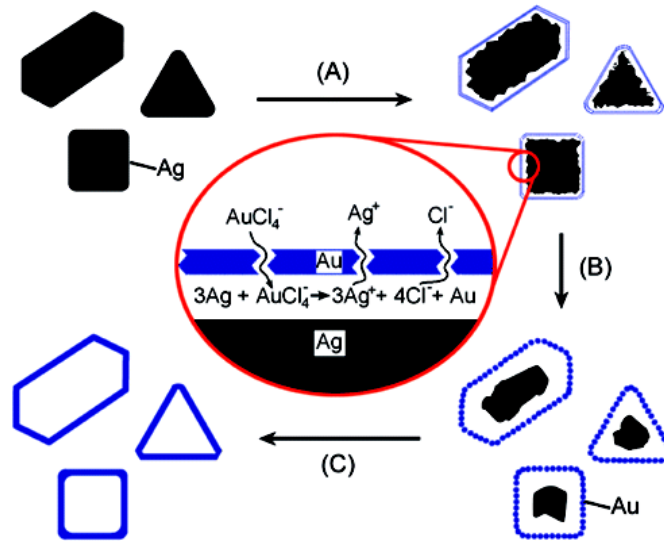
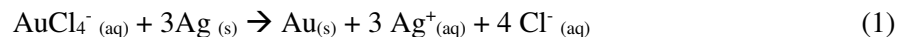


Figure I-10 : Schématisation du procédé expérimental conduisant à la formation de nanoshells d'or à partir de gabarits d'argent de différentes morphologies<sup>[37]</sup>

De cette manière, le potentiel standard du couple AuCl<sub>4</sub><sup>-</sup>/Au (0,99 V vs ESH) étant supérieur à celui du couple Ag<sup>+</sup>/Ag (0,80 V vs ESH), des nanoparticules d'argent en solution peuvent être oxydées par le sel d'or chloroaurique selon la réaction suivante :

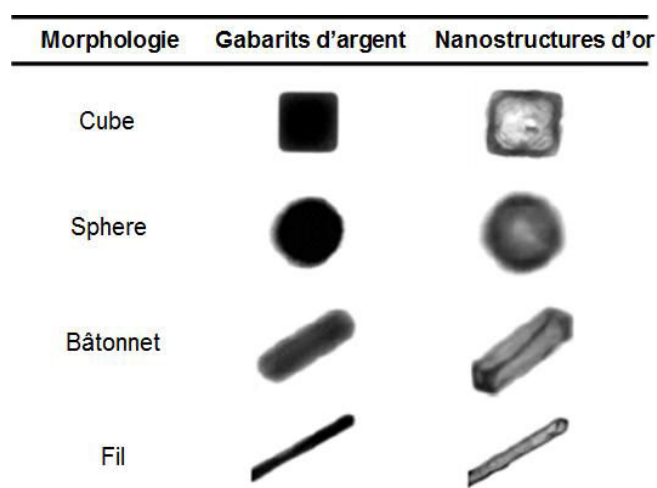


Dans la méthode de synthèse classique développée par Sun et Xia<sup>[37]</sup>, cette réaction se fait à 100°C. Cette température permet d'augmenter la solubilité du sel AgCl formé et donc prévient la contamination des nanoshells<sup>[48]</sup>. Elle a également une influence sur les coefficients de diffusion des espèces en solution et par conséquent joue un rôle sur la morphologie des nanoparticules finales<sup>[48]</sup>.

Un mécanisme de formation a été proposé pour ces nanostructures originales synthétisées par la voie classique. La réaction est dans un premier temps initiée sur un site spécifique de la surface conduisant à la formation d'un trou. L'or métallique formé est confiné près de la surface du gabarit et se dépose de manière épitaxiale à la surface des nanoparticules d'argent, leurs structures cristallines étant relativement proches. Il se forme alors une fine couche d'or incomplète, et de ce fait, le trou reste le seul site de réaction et de diffusion des espèces formées. Au cours du remplacement galvanique, les nanostructures se creusent et les atomes d'or continuent de se déposer ce qui augmente l'épaisseur de la

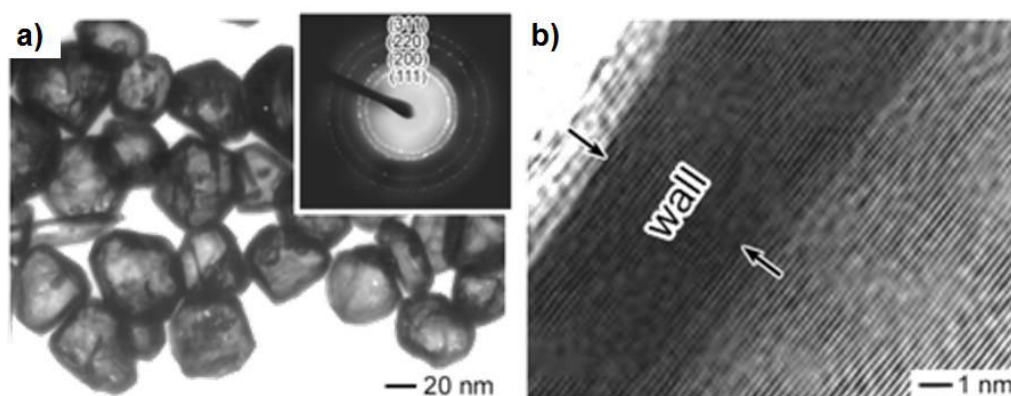
coquille. Au-delà d'une certaine épaisseur (environ 1 nm), des phénomènes de diffusion du type mûrissement d'Ostwald interviennent quand la température de la réaction avoisine les 100°C, diminuant ainsi la taille des trous jusqu'à la formation d'une surface lisse et homogène<sup>[27,48]</sup>.

Le paramètre qui dicte la morphologie de la structure finale est la forme du gabarit de départ<sup>[27]</sup>. Comme le montre la Figure I-11, la réaction de remplacement galvanique conduit à une nanoparticule creuse, avec une forme identique à celle du gabarit de départ et des dimensions légèrement plus larges<sup>[49]</sup>.



**Figure I-11 : Clichés MET de nanostructures d'argent de différentes morphologies et les nanostructures d'or creuses correspondantes après réaction de remplacement galvanique<sup>[49]</sup>**

D'un point de vue structural, Sun et *al.*<sup>[50]</sup> ont pu mettre en évidence la formation d'une coquille hautement cristalline par le biais de ce processus. En effet, la figure de diffraction électronique obtenue par MET (Figure I-12.a) montre des anneaux de diffraction correspondant à une phase cristalline pure du type cubique à faces centrées et dont le paramètre de maille est d'environ 4.08 Å (4.0786 Å pour l'or et 4.0862 Å pour l'argent). Ils ont également enregistré des clichés haute résolution de la coquille d'une nanoshell qui révèlent des franges uniformes et donc indiquent un haut degré de cristallinité (Figure I-12.b).

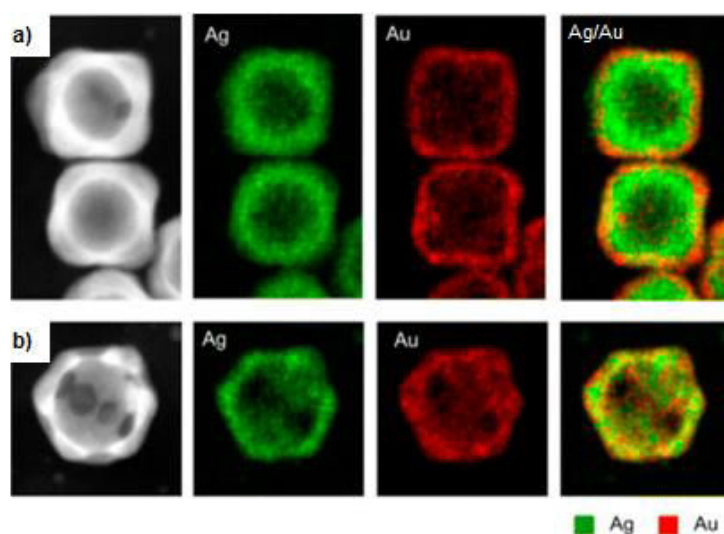


**Figure I-12 : Mise en évidence de la cristallinité des nanoshells : a) Figure de diffraction obtenue par focalisation du faisceau électronique sur un groupe de nanoshells (cf image MET), b) Cliché HRMET de la coquille d'une nanoshell<sup>[50]</sup>**

Concernant la composition chimique de ces nanostructures creuses, elle semble dépendre des conditions d'élaboration. Qi et Lee<sup>[51]</sup> ont établi par des méthodes de dynamique moléculaire que l'alliage Ag-Au était plus stable thermodynamiquement que la structure bimétallique Ag/Au. Ainsi, la formation de l'alliage aurait lieu spontanément en solution impliquant des phénomènes de diffusion à l'interface favorisés par la présence de défauts<sup>[52]</sup>, même si un facteur cinétique doit également être considéré dans ce processus.

Dans les travaux de Vongsavat et al.<sup>[53]</sup>, le rapport atomique Ag/Au obtenu par analyse dispersive en énergie EDX (sonde de volume) est plus grand que celui déduit des analyses spectroscopiques XPS (sonde de surface) impliquant donc un gradient de composition avec l'argent localisé au niveau de la surface interne.

Afin d'apprécier plus précisément la distribution des éléments au sein de la coquille, Liz-Márzan et al.<sup>[54]</sup> ont réalisé des cartographies chimiques par microscopie électronique en transmission (MET)-EDX (Figure I-13), sur des nanoparticules obtenues à partir de différentes concentrations en sel d'or. Les superpositions des cartographies de l'argent et de l'or montrent clairement une structure plutôt bimétallique au départ qui évolue ensuite vers la formation d'un alliage.



**Figure I-13 : Cartographies EDX de nanocages obtenues pour des concentrations croissantes en sel d'or H<sub>2</sub>AuCl<sub>4</sub> (a- b), clichés HAADF-STEM en projection et les cartographies correspondantes de l'Ag, de l'Au ainsi que la superposition Ag/Au<sup>[54]</sup>**

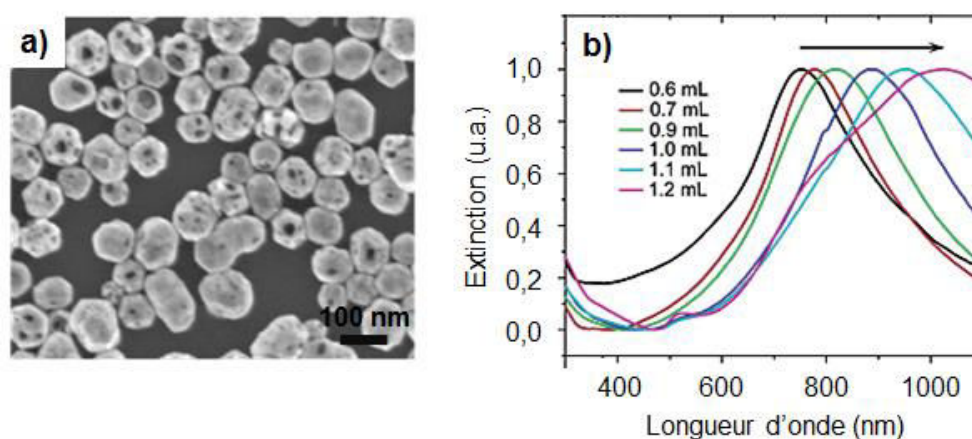
Par le biais d'une analyse le long du diamètre de nanoparticules similaires, Park et al.<sup>[55]</sup> ont mis en évidence la coexistence des éléments métalliques avec une répartition plutôt homogène sur la zone analysée.

Finalement, il est assez difficile de conclure de manière générale sur la formation d'un alliage ou non car chaque exemple rapporté de la littérature met en jeu des conditions de synthèse différentes



(température, nature du solvant, nature du sel d'or, quantité de sel d'or, taille et forme des gabarits d'argent ...etc.) qui peuvent jouer un rôle dans la composition finale des nano-objets.

Cependant, dans le cas particulier de la synthèse classique, (c'est-à-dire en milieu aqueux, à 100°C et en utilisant  $\text{HAuCl}_4$  comme sel d'or), Sun et Xia<sup>[56]</sup> ont pu mettre en évidence un phénomène de « dealloying » (corrosion sélective) lorsque la quantité de sel d'or utilisée dépasse une certaine concentration. Il se traduit simultanément par la réduction de l'épaisseur de la coquille (oxydation sélective des atomes d'argent de l'alliage) et la création de petits trous à la surface des nanoshells (coalescence des vacances formées) (Figure I-14.a). Cette étape contribue significativement au déplacement de la fréquence de résonance plasmon des nanoshells dans le proche IR (Figure I-14.b). Ce résultat implique par conséquent la formation préliminaire d'un alliage au cours du remplacement galvanique.



**Figure I-14 : Mise en évidence du processus de « dealloying » : a) Image MEB : identification de petits trous à la surfaces des nanoshells et b) Spectres UV-vis : évolution de la fréquence plasmon en fonction du volume d'or ajouté<sup>[56]</sup>**

Finalement, cette méthode de synthèse pour l'élaboration des nanoshells peut-être décrite en deux étapes : (i) la formation de nanoshells (présentant une surface homogène et uniforme) via la combinaison du remplacement galvanique et de la formation de l'alliage et (ii) la formation de nanoshells plus « poreuses » du fait du processus de « dealloying ».

Cependant les conditions de synthèse ont un impact sur la mécanistique et donc sur les nanostructures. Quelques exemples dans la littérature rapportent des méthodes de synthèse légèrement modifiées par rapport à celle de Sun et Xia: réalisées en milieu organique<sup>[57]</sup>, avec un précurseur d'or modifié<sup>[53]</sup> ou encore à température ambiante<sup>[53,55]</sup>. Quelles que soient ces conditions, ce procédé original implique peu d'étapes de synthèse, est facile à mettre en œuvre mais surtout permet d'obtenir des nanoshells creuses dont la bande plasmon est facilement ajustable à la fenêtre biologique.

### 3. Applications biologiques des nanoshells d'or

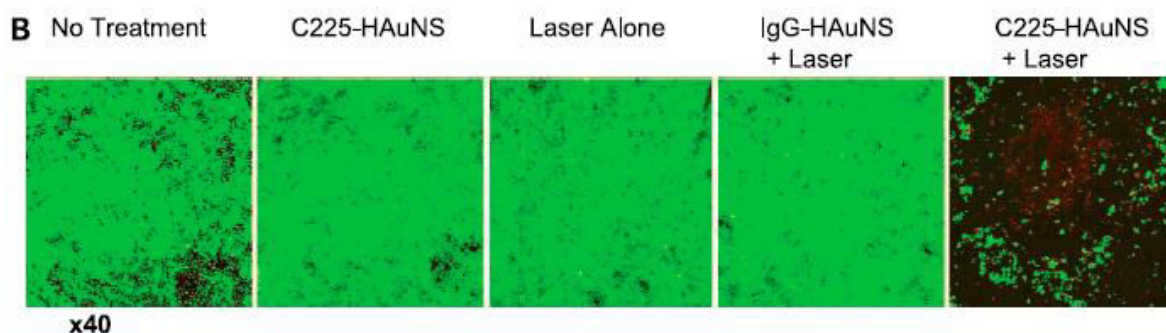
Du fait de la faible absorption de la lumière du proche IR par les tissus, il est possible d'envisager l'ablation de tumeurs par photothérapie plasmonique (plasmonic photothermal therapy, PPTT<sup>[9]</sup>). L'idée est de délivrer une dose létale de chaleur dans un volume spécifique de tumeurs. L'intérêt de cette technique est de limiter les dommages collatéraux dus à l'échauffement localisé produit par les nanoshells.

Par exemple, Hirsch et al.<sup>[58]</sup> lors d'une étude *in vitro* puis *in vivo* ont mis en évidence tout le potentiel des nanoshells d'or. En effet, l'exposition laser (820 nm, 4 W/cm<sup>2</sup>, 4-6 min) de tumeurs traitées directement avec ces nanoparticules induit une augmentation de la température moyenne ( $\Delta T = 37,4 \pm 6,6$  °C) à l'origine de lésions irréversibles des tissus. Le contrôle (sans nanoshells + exposition au laser) révèle une augmentation de la température moyenne significativement plus faible ( $\Delta T < 10$ °C) ne causant, d'après les auteurs, aucun dommage. Néanmoins, dans la majorité des applications, l'injection directe dans la tumeur n'est pas envisageable.

Une approche alternative consiste à injecter les nanoshells par voie intraveineuse qui vont donc circuler puis s'accumuler dans la tumeur avant le traitement laser. La taille des nanoparticules devient alors un paramètre critique. Plusieurs études ont montré que des nanoparticules de 60-400 nm de diamètre peuvent s'extravaser et s'accumuler dans les tumeurs via un mécanisme passif appelé effet EPR (enhanced permeability and retention effect)<sup>[59]</sup>.

L'efficacité de ce mécanisme a pu être démontrée par O'Neal et al.<sup>[60]</sup> ; 6h après l'injection intraveineuse de nanoshells, la variation de température induite par l'exposition laser (808 nm, 4W/cm<sup>2</sup>, 3min) est significativement différente entre la zone tumorale et une zone saine située à quelques millimètres. Sur cette dernière zone saine, la réponse thermique obtenue est identique à celle enregistrée quand l'animal ne reçoit pas d'injection de nanoshells (contrôle). Ce résultat suggère une accumulation préférentielle des nanoshells dans la tumeur. Par ailleurs, une régression complète des tumeurs est observée 10 jours après le traitement et la reprise de leur développement n'est remarquée qu'après 60 jours.

Il est également possible d'augmenter l'efficacité du traitement en fonctionnalisant les nanoshells de sorte à cibler les cellules à traiter et favoriser l'accumulation dans les tissus tumoraux. De cette manière, Melancon et al.<sup>[61]</sup> ont conjugué des nanoshells d'or (HAuNs) avec un anticorps spécifique (C225) et un anticorps non spécifique (IgG). Ils ont alors étudié *in vitro* l'influence sur des cellules cancéreuses de plusieurs conditions : aucun traitement, seule injection des nanoshells, seule irradiation laser et enfin le couplage des deux (nanoshells IgG-HAuNs + laser et nanoshells C225-HAuNs + laser). Comme le montre la Figure I-15, la mort des cellules (marquées en rouge) n'est observée que dans le cas où les cellules ont été traitées avec l'association nanoshells conjuguées avec l'anticorps spécifique/laser. Dans tous les autres cas, les cellules ne sont pas impactées (marquées en vert).



**Figure I-15 : Viabilité cellulaire observée par microscopie de fluorescence après différents traitements. Les cellules vivantes sont marquées en vert et les cellules mortes en rouge<sup>[61]</sup>**

Cet exemple illustre parfaitement l'intérêt du ciblage qui permet d'augmenter la sélectivité et donc améliorer significativement l'efficacité du traitement.

### III. Les nanoparticules cœur-coquille Au@SiO<sub>2</sub>

Afin d'améliorer l'efficacité des traitements, l'hyperthermie peut être utilisée en combinaison avec d'autres thérapies. En effet, l'échauffement généré permet d'améliorer la sensibilité des cellules au traitement par chimiothérapie (délivrance de médicament)<sup>[62]</sup>.

Grâce aux potentialités offertes par l'échelle nanométrique, des objets à structure originale permettant la combinaison de thérapies cancéreuses sont envisagés pour les traitements.

Les nanoparticules du type cœur-coquille (« core-shell » en anglais) sont définies comme des nanomatériaux composites présentant un cœur et une coquille de nature chimique différente. L'intérêt premier de la formation de nanoparticules à structure cœur-coquille est de pouvoir combiner les propriétés de chaque phase. La coquille peut également, selon sa nature, améliorer la stabilité chimique, thermique, colloïdale mais aussi prévenir de l'oxydation du cœur ou encore augmenter la fonctionnalité par la conjugaison avec d'autres molécules<sup>[63]</sup>.

En particulier, la formation d'une coquille en silice apparaît très intéressante pour des applications biomédicales. En effet, la silice est un matériau inerte, transparent, qui présente une bonne stabilité chimique et colloïdale mais surtout qui peut être fonctionnalisé avec une large gamme de molécules<sup>[63]</sup>. Ainsi, la synthèse de nanoparticules Au@SiO<sub>2</sub> permet d'envisager de nouvelles applications du fait de la multifonctionnalité de ces nanosystèmes qui les rend plus performants. Dans ces assemblages, l'élaboration de la coquille silicique est généralement réalisée par voie sol-gel comme décrite ci-après.

#### 1. La silice

##### a. Le procédé sol-gel

En 1846 le chimiste français Ebelmen<sup>[64]</sup> réalise la première synthèse « sol-gel » conduisant à un verre de silice de façon plus douce (énergétiquement) en évitant le passage par son point de fusion.

Cependant, cette découverte prématurée passa inaperçue. En effet, le procédé « sol-gel » était né, mais il fallut attendre 1939 pour que le premier brevet<sup>[65]</sup> soit déposé par la firme verrière allemande Schott Glaswerk et environ vingt années supplémentaires avant qu'un intérêt scientifique réel ne soit suscité.

Un « sol » se définit comme le mélange en solution d'oligomères colloïdaux, de petites macromolécules ainsi que, selon le degré d'avancement de la réaction de polymérisation, de différents monomères partiellement hydrolysés. Le gel est quant à lui constitué d'un réseau d'oxydes tridimensionnel, gonflé par un solvant et de viscosité infinie.

Ainsi, le procédé sol-gel, qui repose sur la polymérisation inorganique de précurseur moléculaire en solution à température ambiante, met en œuvre des conditions de chimie « douce », principe introduit par Jacques Livage dans les années 70<sup>[66]</sup>.

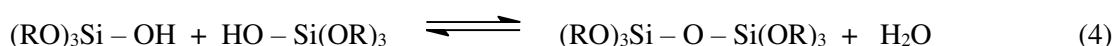
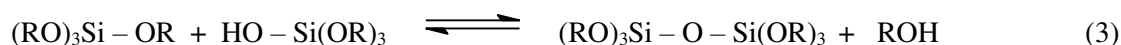
Dans le cas d'une polymérisation hydrolytique, le procédé sol-gel peut être décrit par une succession de réactions d'hydrolyse et de condensation. Les précurseurs les plus communément utilisés sont les alcoxydes métalliques car contrairement aux sels métalliques, les sous-produits de la réaction (alcools) peuvent être facilement éliminés.

Dans le cas particulier de la silice, le mécanisme, décrit en deux étapes, est le suivant :

Une première étape d'activation : l'hydrolyse



Une deuxième étape de propagation : la condensation



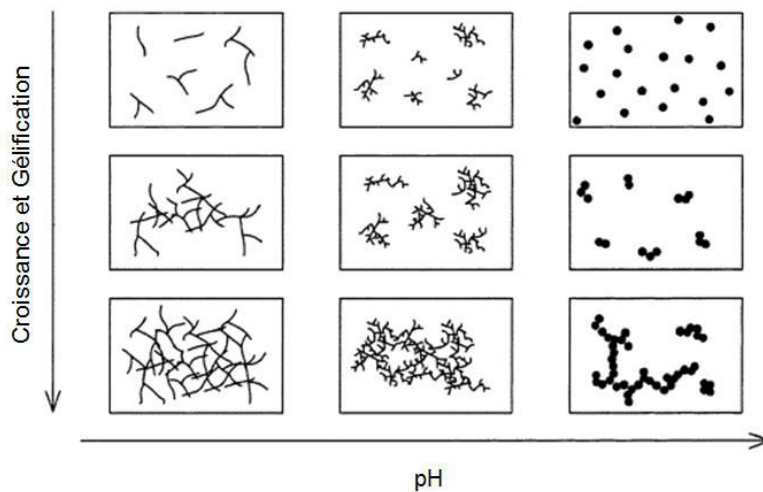
où R est un groupement alkyle  $C_nH_{2n+1}$ .

La réaction d'hydrolyse est une substitution nucléophile qui permet le remplacement des fonctions alcoxydes par des fonctions hydroxydes plus réactives. La réaction de condensation qui suit met en jeu deux mécanismes en concurrence : l'alcoxolation (3) et l'oxolation (4), qui aboutissent tous deux à la création de ponts siloxanes.

Les alcoxydes de silicium étant insolubles dans l'eau, un co-solvant (généralement l'alcool parent) est utilisé dans la synthèse. En milieu neutre, la formation du gel de silice peut prendre plusieurs jours, voire plusieurs semaines du fait des faibles vitesses d'hydrolyse des alcoxysilanes. En effet, les alcoxydes de silicium réagissent très lentement avec l'eau ; ainsi une catalyse acide ou basique est nécessaire pour déclencher l'étape d'hydrolyse.

Cependant la catalyse n'a pas seulement une influence sur les vitesses de réaction mais également sur la structure du gel formé<sup>[67]</sup>. La catalyse acide avec un faible rapport  $[H_2O]/[Si]$  conduit à des réseaux

polymériques peu « branchés » alors que la catalyse basique avec un rapport important favorise la formation de particules colloïdales fortement condensées (Figure I-16).



**Figure I-16 : Influence du pH sur la morphologie dans le procédé sol-gel<sup>[68]</sup>**

Les vitesses des réactions d'hydrolyse et de condensation peuvent aussi être influencées par la température, la nature du solvant, la nature de l'alcooxysilane et la concentration des différents réactifs.

## b. Synthèse de nanoparticules de silice

### i. Méthode « Stöber »

La première synthèse de nanoparticules de silice par voie sol-gel a été développée par Stöber<sup>[38]</sup>, et consiste en l'hydrolyse et la condensation du tétraéthoxysilane (TEOS), catalysées par l'hydroxyde d'ammonium en milieu eau/éthanol. Dans cette réaction, l'hydroxyde d'ammonium permet non seulement d'établir un pH basique mais il influence également la morphologie des nanoparticules formées.

Il est ainsi possible d'obtenir des nanoparticules sphériques et monodisperses en taille, de diamètre compris entre 50 nm et 2 $\mu$ m par la simple variation du rapport  $[H_2O]/[NH_3]$ .

### ii. Méthode « Stöber modifiée » : synthèse de nanoparticules de silice mésoporeuse

Au-delà de la méthode Stöber classique, diverses stratégies ont été développées afin de synthétiser des nanomatériaux à structures poreuses. Unger et *al.*<sup>[69]</sup> furent les premiers à adapter la procédure initiale pour l'élaboration de nanoparticules de silice mésoporeuse du type MCM-41.

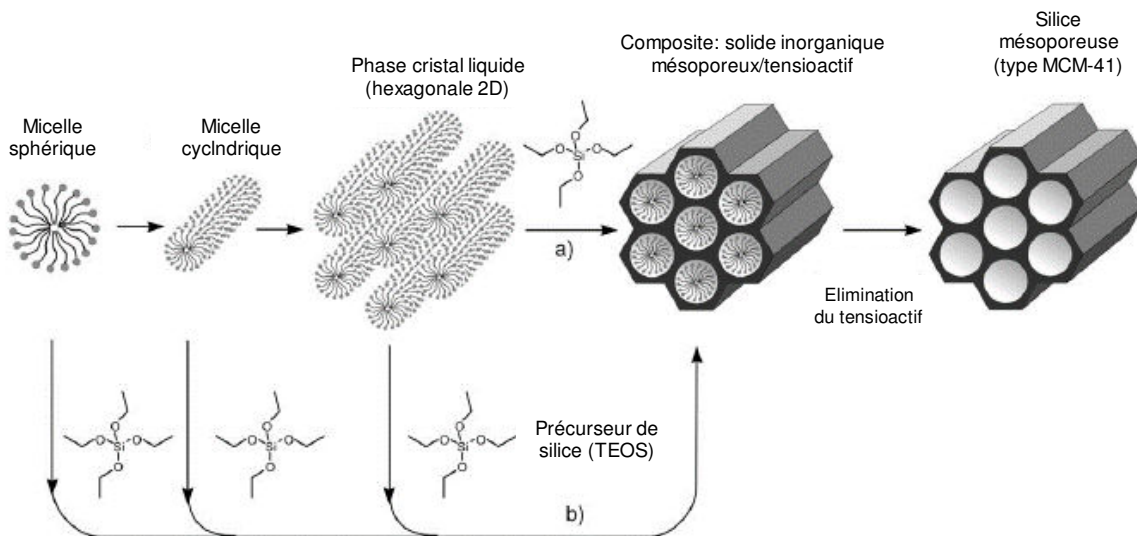
Depuis leur découverte en 1992<sup>[70]</sup>, les MCM-41 sont devenus les plus populaires de la famille des matériaux mésoporeux silicatés et aluminosilicatés M41S. Les MCM-41 sont caractérisés par un

système de pores de diamètre compris entre 2 et 10 nm, organisés en un réseau hexagonal bidimensionnel. Ces matériaux présentent des surfaces spécifiques supérieures à 400 m<sup>2</sup>/g et une importante stabilité chimique et thermique. L'ensemble de ces propriétés physiques les rendent particulièrement intéressants pour des applications en catalyse.

De par l'intérêt croissant porté à ces matériaux, de nombreux efforts ont été depuis fournis afin de contrôler plus précisément la taille des pores ainsi que leur structure. Ces développements ont ouvert la voie vers l'utilisation de ces matériaux en tant que matériaux hôtes pour l'adsorption et la libération de molécules à propriétés spécifiques. En 2001, le premier article rapportant le potentiel des MCM-41 en tant que réservoir pour la délivrance de médicament a ainsi été publié<sup>[71]</sup>.

La porosité des silices mésoporeuses est générée par l'introduction de tensioactifs cationiques du type bromure d'alkylammonium qui jouent un rôle d'agent structurant.

En effet, au-delà d'une certaine concentration en solution (CMC, concentration micellaire critique), les tensioactifs forment des micelles qui peuvent s'auto-assembler en un arrangement hexagonal de cylindres. Dans ce cas, le précurseur de silice s'hydrolyse et se condense préférentiellement autour des micelles (Figure I-17-a), en raison de la très forte interaction entre les têtes polaires du tensioactif et les ions silicatés en milieu basique.

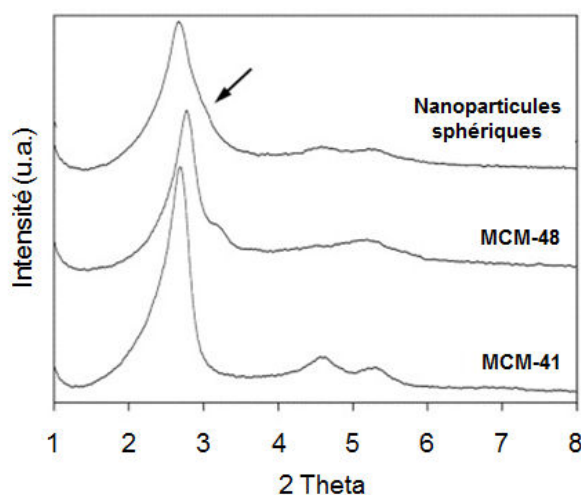


**Figure I-17 : Modèle schématique du mécanisme de formation des MCM-41. Mésoporosité dirigée par a) une phase cristal-liquide: LCT mécanisme (Liquid Crystal Templating) ou par b) les anions silicatés<sup>[72]</sup>**

Beck et al.<sup>[70]</sup>, qui ont suggéré ce premier modèle n'excluent cependant pas que l'auto-assemblage puisse être dirigé par l'addition du précurseur de silice (Figure I-17.b).

Un autre mécanisme a également été proposé par Stucky et *al.*<sup>[73]</sup> suggérant plutôt une auto-association des précurseurs de silice et des molécules de tensioactif conduisant à une phase lamellaire qui évolue ensuite en phase hexagonale.

L'élimination du tensioactif, par extraction ou calcination, conduit à des matériaux nanostructurés qui présentent une porosité dont l'organisation dépend des conditions de synthèse. Par exemple, l'ajout d'alcool dans le milieu réactionnel peut modifier la structuration des pores qui se traduit par le passage d'une phase hexagonale type MCM-41 à une phase cubique type MCM-48 identifiable par des analyses en DRX<sup>[74]</sup> (Figure I-18).

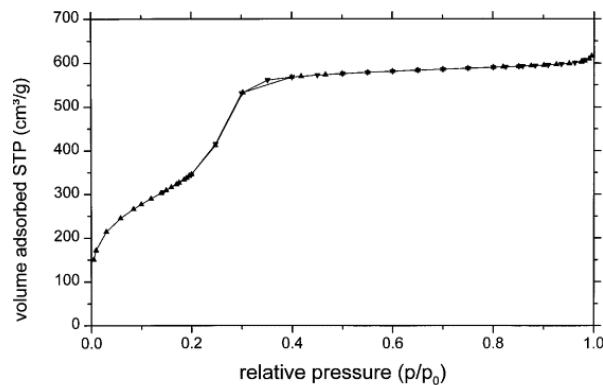


**Figure I-18 : Diagramme de diffraction d'un matériau type MCM-41 à porosité hexagonale, d'un matériau type MCM-48 à porosité cubique et de nanoparticules sphériques mésoporeuses<sup>[74]</sup>**

Aussi, lorsque les conditions de synthèse approchent celle de la méthode Stöber c'est-à-dire lorsque la concentration en alcool devient très importante, la porosité évolue à nouveau vers une organisation hexagonale et le matériau formé se présente sous la forme bien définie de nanoparticules sphériques<sup>[74]</sup>. Le diagramme de diffraction suggère également la présence d'une seconde phase (repérée par la flèche sur le diagramme de diffraction de la Figure I-18). A travers cette étude, le double rôle de co-solvant et co-surfactant de l'alcool a pu ainsi être mis en évidence.

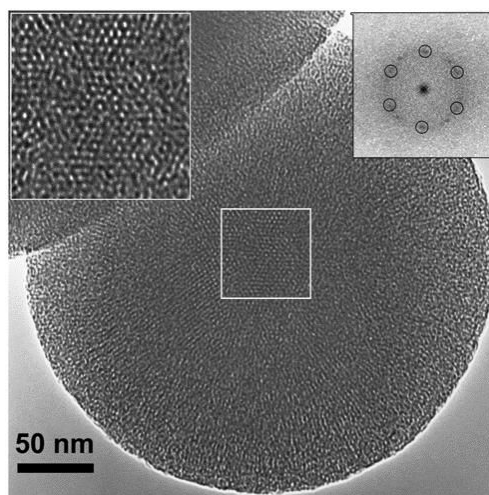
Malgré l'obtention d'informations sur l'arrangement des pores, l'interprétation des données de diffraction reste assez difficile du fait de la localisation des pics aux petits angles ainsi qu'une largeur souvent importante observée dans le cas des nanoparticules (Figure I-18).

D'autre part, les analyses d'adsorption de diazote sont classiquement utilisées pour caractériser la texture de ces matériaux et renseignent spécifiquement sur la porosité (surface spécifique, volume poreux, diamètre des pores). L'ensemble de ces caractéristiques sont extraites d'isothermes de sorption. Typiquement, un matériau mésoporeux de type MCM-41 présente une isotherme de type IV d'après la classification IUPAC<sup>[75]</sup> (Figure I-19). Cette classification vise à distinguer des adsorbants typiques mais en réalité les isothermes d'adsorption obtenues sont généralement des isothermes composites révélant la complexité des adsorbants étudiés.



**Figure I-19 : Isothermes de sorption d'azote de type IV caractéristique des matériaux mésoporeux (nanoparticules type MCM-41)<sup>[76]</sup>**

Il peut être intéressant d'utiliser la transformée de Fourier sur des images haute résolution de microscopie électronique en transmission (HRMET). De cette manière, Liu et al.<sup>[77]</sup> ont pu évaluer plus précisément l'ordre local de la porosité et mettre en évidence une distribution radiale des pores pour les nanoparticules mais surtout un arrangement des pores hexagonal au centre d'une nanoparticule (Figure I-20).



**Figure I-20 : Cliché de microscopie électronique haute résolution d'une nanoparticule sphérique bien organisée au niveau du centre, un agrandissement du centre est donné (en haut à gauche) et la figure correspondante obtenue par transformée de Fourier (en haut à droite) montre clairement une symétrie hexagonale<sup>[77]</sup>**



La combinaison de la microscopie électronique en transmission et de la diffraction d'électrons a également permis de suggérer que ces nanoparticules consistaient en réalité en un cœur octaédrique tronqué de structure cubique type MCM-48 et des pores cylindriques distribués de manière radiale depuis la surface de cet octaèdre tronqué avec un arrangement du type hexagonal<sup>[74]</sup>.

Finalement, cette approche originale impliquant l'utilisation de tensioactif pour l'élaboration de nanoparticules mésoporeuses a conduit au développement de nouvelles familles de matériaux. En effet, l'influence de la nature du tensioactif a été étudiée. Par exemple, l'utilisation d'un copolymère tri-blocs en tant que tensioactif non ionique a permis l'obtention des mésoporeux SBA<sup>[78]</sup> (Santa Barbara Acidic) qui présentent une porosité hexagonale et des microporosités entre les canaux mésoscopiques ou encore les MSU<sup>[79]</sup> (Michigan State University) qui possèdent une structure vermiculaire poreuse 3D.

Afin d'améliorer le contrôle de la taille des nanoparticules, Yoon *et al.*<sup>[80]</sup> ont utilisé des nanoparticules de silice denses monodisperses comme support de structuration d'une coquille mésoporeuse, organisée dès lors avec une orientation des mésopores perpendiculairement à la surface du cœur dense (Figure I-21). Cette organisation particulière, obtenue pour différents tensioactifs du type C<sub>n</sub>-TAB (C<sub>n</sub>H<sub>2n+1</sub>N(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>Br avec n = 12, 14, 16, 18), s'est révélée être directement dépendante de la valeur du rapport molaire C<sub>n</sub>-TAB/TEOS. Dans ce cas, l'épaisseur de la coquille formée varie avec la longueur de la chaîne alkyle du tensioactif utilisé.

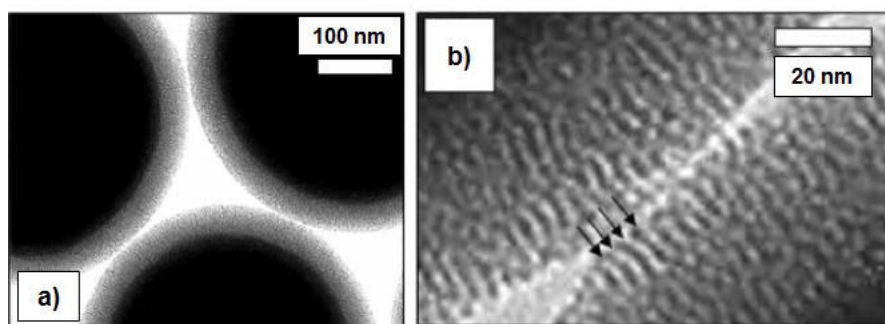


Figure I-21 : Clichés MET des nanoparticules synthétisées avec le C<sub>16</sub>-TAB. Mise en évidence de a) la structure cœur-coquille et b) l'orientation des pores perpendiculaire au cœur<sup>[80]</sup>

## 2. Synthèse de nanoparticules Au@SiO<sub>2</sub>

### a. Les nanoparticules Au@SiO<sub>2</sub> dense

L'accroche de la silice sur une surface métallique telle que l'or est une difficulté à contourner par rapport aux surfaces oxydées notamment. En effet, l'or métallique a une très faible affinité avec la silice car, contrairement à la plupart des métaux, l'or ne forme pas de couche de passivation du type oxyde en solution.

Les premières tentatives pour contourner ce caractère vitreophobe impliquaient l'hétéro-coagulation de nanoparticules d'or sur des nanoparticules de SiO<sub>2</sub> en solution, suivi de la croissance

dans l'éthanol<sup>[81]</sup>. Cette première approche conduit malheureusement à un mélange de cœur-coquille (en très faible concentration) et de nanoparticules de SiO<sub>2</sub> secondaires.

Une autre méthode fondamentalement différente a été par la suite développée par Liz-Márzan *et al.*<sup>[82]</sup>. Elle consiste à rendre la surface des nanoparticules d'or vitrophile en utilisant un agent de couplage du type aminoalcoxysilane. Du fait de la grande affinité de l'or et des amines, le 3-aminopropyltriéthoxysilane vient dans un premier temps se substituer à l'agent stabilisant (citrate dans ce cas) pour former une monocouche à la surface des nanoparticules d'or. La croissance de la coquille de SiO<sub>2</sub> se fait par la suite par ajout de silicate de sodium, à pH entre 8 et 10, de sorte que la solubilité des silicates en solution soit réduite. Ainsi, le processus de polymérisation/précipitation est suffisant pour que la couverture soit homogène et relativement rapide pour éviter la nucléation secondaire. La coquille de SiO<sub>2</sub> formée est plutôt fine mais rugueuse du fait de la nature oligomérique du précurseur de silice.

Finalement, la croissance peut être prolongée et contrôlée via la méthode Stöber. Cette étape nécessite alors le transfert des nanoparticules en milieu alcoolique impliquant donc que la première coquille de SiO<sub>2</sub> formée en milieu aqueux soit suffisamment importante pour éviter la floculation des nanoparticules induite par des forces de type Van der Waals.

Ainsi cette méthode de « croissance ensemencée » conduit à la formation de nanoparticules Au@SiO<sub>2</sub>, avec une épaisseur de coquille ajustable et peu d'effet de nucléation secondaire. Cependant, la première étape de cette méthode est fortement dépendante du pH, difficilement contrôlable, et nécessite des temps de réaction relativement importants (supérieurs à 24h).

Sur la base de ce constat, Graf *et al.*<sup>[83]</sup> ont développé une méthode permettant le transfert direct des nanoparticules en milieu hydro-alcoolique par l'adsorption d'un polymère amphiphile et non ionique : le poly(vinylpyrrolidone) (PVP). L'avantage de ce polymère est qu'il peut s'adsorber sur différents colloïdes mais surtout les stabiliser en milieu aqueux et/ou non aqueux. Avec cette adsorption initiale de PVP, le procédé Stöber permet par la suite d'obtenir des nanoparticules avec une coquille homogène et dont l'épaisseur est ajustable par la variation de la concentration en TEOS.

Finalement, il apparaît possible d'effectuer la synthèse sans utiliser d'agent de couplage, en jouant sur l'ordre d'ajout des réactifs ainsi que sur leur concentration. En effet, Mine *et al.*<sup>[84]</sup> ont réalisé la croissance directe d'une coquille de silice sur des nanoparticules d'or stabilisées par du citrate (Figure I-22). D'après ces travaux, les molécules de TEOS, qu'elles soient hydrolysées ou non, peuvent interagir avec le citrate adsorbé conduisant à la formation préférentielle de silice à la surface des nanoparticules d'or. De plus, les concentrations en éthanol et en ammoniacque utilisées ainsi que l'ordre d'introduction des réactifs permet de contrôler l'agrégation et d'éviter la floculation des nanoparticules dans le milieu.

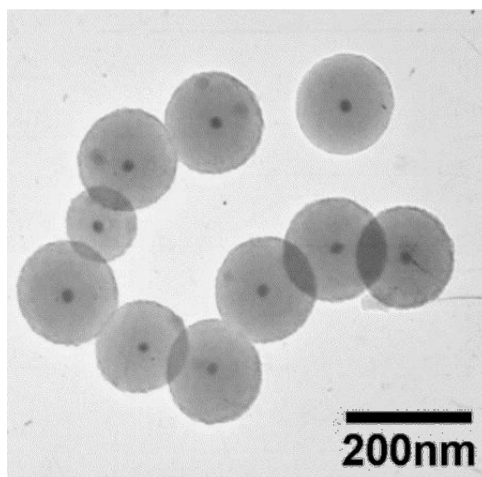


Figure I-22 : Cliché MET de nanoparticules Au@SiO<sub>2</sub> sans utilisation d'agent de couplage<sup>[84]</sup>

### b. Les nanoparticules Au@mSiO<sub>2</sub> mésoporeuse (Au@mSiO<sub>2</sub>)

A partir de ces nanoparticules Au@SiO<sub>2</sub>, il est possible de modifier la structuration de la coquille de SiO<sub>2</sub> dense par une transformation pseudomorphique<sup>[85]</sup>. Ce procédé implique la création du système micellaire de tensioactifs au cours de la dissolution de la silice, induite par un milieu alcalin et son interaction avec la surface. Après traitement hydrothermal, la coquille présente une porosité complexe, où les mésopores ne sont pas alignés mais forment plutôt une structure vermiculaire avec une distribution aléatoire dans toutes les directions, depuis le cœur des nanoparticules vers la surface externe (Figure I-23-b). Cependant, une porosité hexagonale peut être distinguée dans certains domaines.

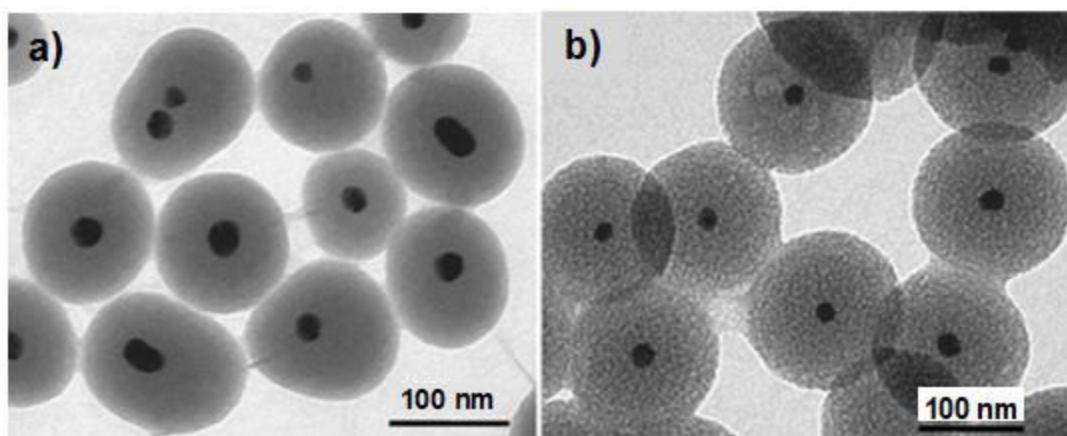


Figure I-23 : Clichés MET des nanoparticules a) Au@SiO<sub>2</sub> dense et c) Au@mSiO<sub>2</sub> mésoporeuse obtenues par pseudomorphisme<sup>[85]</sup>

D'autres travaux<sup>[86]</sup> ont pu montrer la construction d'une coquille de SiO<sub>2</sub> mésoporeuse directement sur des nanoparticules Au@SiO<sub>2</sub>. Cette méthode s'apparente ainsi à un procédé « seed-growth » puisque la première coquille de silice dense sert de site de nucléation pour la deuxième coquille

mésoporeuse. Dans ce cas, la porosité de la silice semble plus facilement contrôlable. En effet, la première coquille de silice permettrait de maîtriser plus précisément l'orientation de pores<sup>[80]</sup>.

A l'inverse, Maturaa et *al.*<sup>[87]</sup> ont réussi à favoriser la formation directe d'une coquille de SiO<sub>2</sub> mésoporeuse sur des nanorods d'or stabilisés par du CTAB. Dans ce cas, la structure des pores est désordonnée mais la croissance sur le cœur d'or est favorisée du fait de la stabilisation par le CTAB.

Enfin Croissant et *al.*<sup>[88]</sup> ont mis au point une synthèse en une seule étape, dite « one pot », permettant la formation de nanoparticules cœur-coquille Au@mSiO<sub>2</sub>. Ce travail repose sur l'optimisation de multiples paramètres de synthèse (ordre d'ajout des réactifs, concentrations des réactifs, température de réaction etc...) et par conséquent est très difficilement adaptable pour la synthèse de cœur-coquille avec un cœur différent (nature ou forme) ou une structuration de porosité différente par exemple.

### 3. Les nanoparticules hybrides Au@SiO<sub>2</sub>

L'intérêt des nanoparticules cœur-coquille est dans un premier temps de combiner les propriétés de chacun des systèmes. La formation d'une coquille de SiO<sub>2</sub> sur des nanoparticules d'or a permis d'envisager de nouveaux concepts au niveau des applications biomédicales comme nous le verrons par la suite. L'attrait de pouvoir fonctionnaliser la surface de ces assemblages par des motifs moléculaires, polymériques ou biologiques repousse encore davantage leur extraordinaire potentiel.

#### a. Les matériaux hybrides : définition

La silice est une matrice unique pour l'incorporation de groupements fonctionnels organiques conduisant à la création de matériaux hybrides.

Les matériaux hybrides peuvent être défini comme le mélange intime d'une entité organique et d'une entité inorganique au sein d'un même matériau. L'assemblage de ces deux entités peut être soit homogène, dans le cas où le matériau résulte de composés organiques et inorganiques miscibles, soit hétérogène et dans ce cas le matériau est constitué de plusieurs phases dont au moins un domaine a une dimension comprise entre quelques Å et plusieurs nanomètres<sup>[89]</sup>.

L'interface inorganique-organique influence de manière importante les propriétés de ces matériaux. Une classification des matériaux hybrides a d'ailleurs été établie en fonction de la nature des interactions existant à l'interface<sup>[89]</sup>. La première classe inclut les matériaux qui présentent une interaction faible entre la matrice organique et la matrice inorganique (du type Van der Waals, liaisons hydrogènes ou forces électrostatiques). La seconde (classe II) concerne ceux présentant une interaction forte (liaisons covalentes ou iono-covalentes entre sous réseaux).

Les propriétés de ces matériaux étant directement liées à la synergie entre les deux sous-systèmes, le contrôle de l'assemblage est essentiel. Pour cela, plusieurs voies sont envisageables pour la

synthèse de ces matériaux hybrides<sup>[90,91]</sup> (Figure I-24). Les deux premières voies diffèrent de par la nature des précurseurs utilisés. Lorsque les précurseurs, de nature chimique différente, sont moléculaires, la chimie sol-gel conventionnelle ou les méthodes hydrothermales peuvent être mises en œuvre pour la formation de l'hybride. Par contre, lorsque ce sont des nano-objets, la dispersion ou l'assemblage s'effectue dans ce cas par l'intermédiaire de composés organiques. Une autre voie concerne les procédures d'auto-assemblages de surfactants organiques pour diriger la croissance ainsi que la structuration de matériau inorganique comme dans le cas des matériaux mésoporeux par exemple. Enfin, la dernière voie fait appel à la chimie intégrative c'est-à-dire la combinaison du contrôle de la taille des objets à l'échelle du micron et les méthodes citées précédemment. Ainsi, il devient possible d'élaborer des objets hiérarchiquement organisés en termes de structure et de fonction et surtout une architecture à différentes échelles.

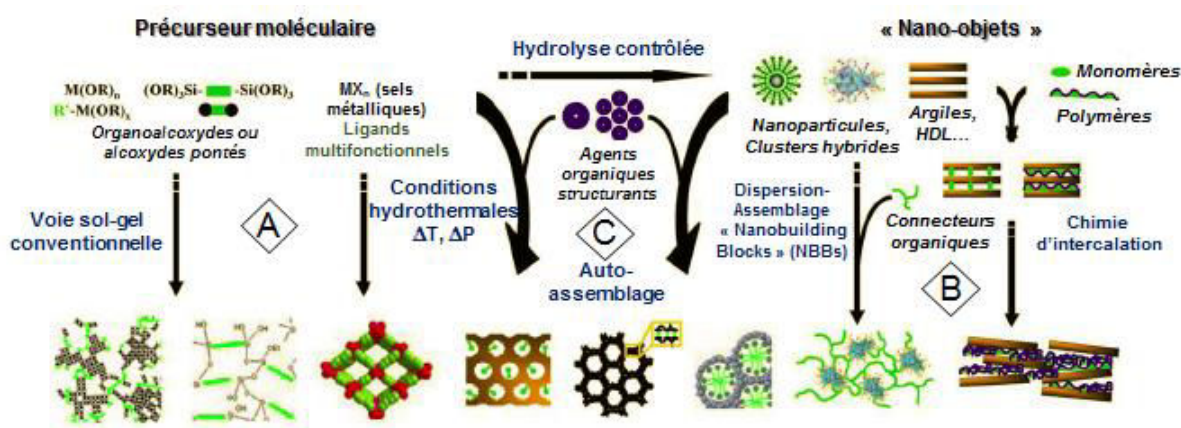


Figure I-24 : Schéma des principales voies chimiques pour la synthèse de matériaux nanostructurés hybrides organiques-inorganiques<sup>[92]</sup>

De toute évidence, la conception d'une multitude de matériaux hybrides, avec un contrôle unique de la structure et des propriétés, une flexibilité de taille et de composition permet donc d'envisager de nombreuses applications.

## b. Les nanoparticules hybrides : applications biomédicales

Dans le cas particulier des applications biomédicales, la conception de nanomatériaux hybrides est à l'origine de progrès significatifs dans les domaines du diagnostic, de la détection et du traitement du cancer. En particulier, la formation d'une coquille de silice hybride sur des nanoparticules d'or permet la combinaison de multiples propriétés et donc la création de nouveaux nanomatériaux.

### i. Exemples de nanoparticules hybrides Au@SiO<sub>2</sub> pour la détection

La résonance plasmon de l'or peut être utilisée afin d'exalter des propriétés telles que la fluorescence (MEF pour « metal enhanced fluorescence »). Dans ce cas, la coquille de silice permet la

fonctionnalisation par l'entité fluorescente mais elle permet également de moduler les interactions entre le fluorophore et le cœur métallique qui est fonction de la distance entre les deux entités. En effet, les nanoparticules métalliques peuvent, du fait des champs électriques intenses au voisinage de la surface, exalter la fluorescence mais également produire l'effet inverse c'est-à-dire la « quencher » si le fluorophore est trop proche du cœur métallique (moins de 5 nm).

Ainsi l'utilisation de la silice en tant qu'espaceur apparaît particulièrement adaptée puisque l'épaisseur de la coquille peut être précisément contrôlée par le procédé sol-gel.

De cette façon des nanosystèmes Au@SiO<sub>2</sub> décorés avec des « quantum dots » CdSe<sup>[93]</sup> ont été synthétisés. La surface de silice de ces nanoparticules est fonctionnalisée avec une molécule organique, le 3-aminopropyltriméthoxysilane, qui va en partie réagir avec les groupements silanols de surface de la silice (via les groupements méthoxy) mais également interagir avec les quantum dots par l'intermédiaire des groupements amines (Figure I-25).

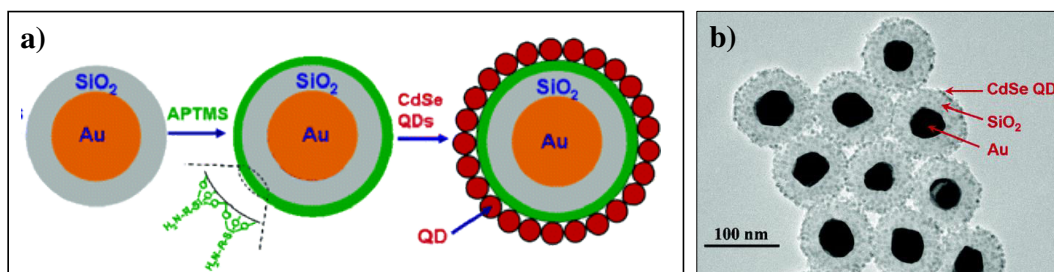


Figure I-25 : a) Schéma de synthèse multi-étapes et b) Cliché MET de nanostructures hybrides Au@SiO<sub>2</sub>/CdSe<sup>[93]</sup>

De la même manière, des nanoparticules de SiC ont été utilisées en tant que fluorophores. Même si leur rendement quantique est plus faible que celui des quantum dots CdSe, leur biocompatibilité est bien meilleure. Sui et *al.*<sup>[94]</sup> ont en effet étudié l'influence de la nature de l'interaction, entre la surface de silice fonctionnalisée et les nanoparticules de SiC. Lorsque l'interaction est du type électrostatique, la fluorescence est améliorée (multipliée par 1,3) alors qu'elle est exaltée d'un facteur 3,2 fois pour une interaction covalente. Ce résultat souligne l'effet de la nature de l'interface sur les propriétés des matériaux.

La technique MEF peut donc être utilisée afin d'augmenter la sensibilité pour la détection de biomolécules par fluorescence ou pour l'imagerie cellulaire.

## ii. Exemples de nanoparticules hybrides pour la délivrance contrôlée

Les propriétés photothermiques de l'or peuvent être également utilisées pour contrôler la délivrance de médicaments. La coquille de silice est alors mise à profit pour l'encapsulation et le transport du principe actif.

## ii.1. La silice mésoporeuse pour l'encapsulation

Depuis l'introduction en 2001 du concept des nanoparticules mésoporeuses de silice (MSN, mesoporous silica nanoparticles) en tant que nano-cargo pour le transport de molécules thérapeutiques<sup>[71]</sup>, de nombreux efforts ont été menés pour le développement de nanoparticules multifonctionnelles stimulables pour la délivrance de médicaments. Le contrôle de la libération est alors dirigé par la fonctionnalisation de surface des nanoparticules dont la nature varie en fonction du stimulus utilisé.

Le groupe de Zink, un des groupes pionniers dans ce domaine, a imaginé des nanosystèmes susceptibles d'être activés par différents stimuli comme le pH<sup>[95]</sup>, la lumière<sup>[96]</sup>, l'application d'un champ magnétique<sup>[97]</sup>... etc. Pour cela, les nanoparticules de silice mésoporeuses sont fonctionnalisées avec des machines moléculaires « mécanisées » appelées nanovalves capables de changer de configuration sous l'effet d'un stimulus.

Des nanovalves activables par la température ont par exemple été envisagées sur la base de complexes [2]pseudorotaxanes constitués d'un macrocycle qui interagit (via des interactions faibles) avec un fragment moléculaire linéaire (diaminoalcoxysilane) greffé à la surface de silice<sup>[88]</sup>. L'efficacité de ces systèmes en tant qu'obturateurs de pore a été démontrée par l'encapsulation puis la libération d'une molécule modèle (rhodamine B) activée par effet photothermique. En effet, lorsque ces nanoparticules Au@SiO<sub>2</sub> sont irradiées avec un laser de longueur d'onde appropriée (c'est-à-dire correspondant à la fréquence de résonance plasmon du cœur d'or), la température augmente près de la surface de l'or, ce qui conduit à l'ouverture des nanovalves et donc à la libération de la molécule colorée (Figure I-26).

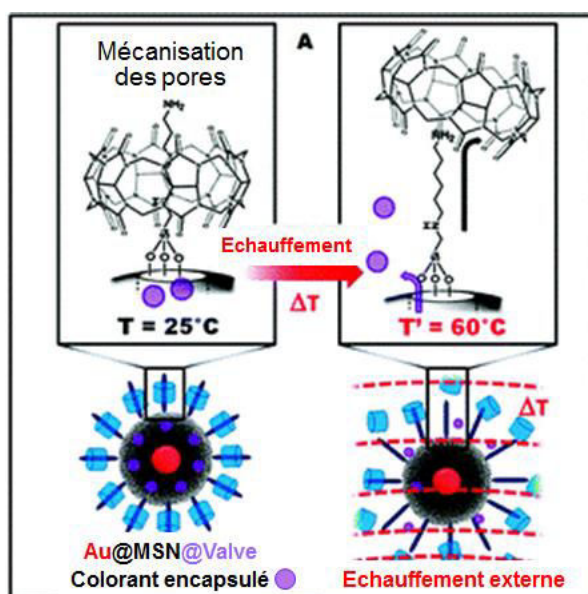
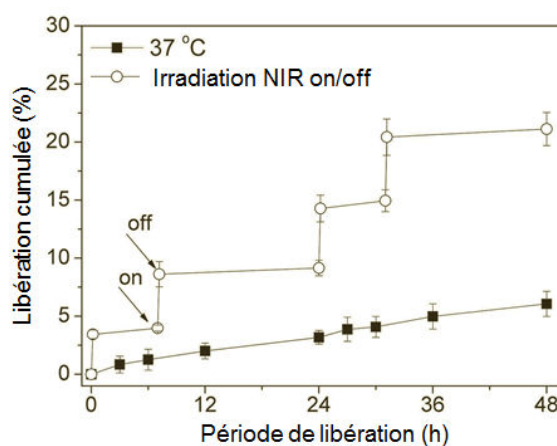


Figure I-26 : Schéma de dissociation du complexe fragment moléculaire/macrocycle sous l'effet de l'irradiation laser conduisant à l'ouverture des nanovalves et à la libération de la molécule colorée<sup>[88]</sup>

Le nanosystème Au@mSiO<sub>2</sub> de Yang et al.<sup>[98]</sup> est fonctionnalisé avec un polymère thermosensible : le poly(N-isopropylacrylamide). Ce polymère subit une transformation réversible autour de 32°C qui correspond à la température inférieure critique de solubilité (LCST lower critical solubility temperature). En dessous de cette température, il est hydrophile et gonflé ce qui obture les mésopores et au-delà, il devient hydrophobe et se recroqueville conduisant à l'ouverture partielle de la porosité.

Duguet et al.<sup>[99]</sup> ont par ailleurs démontré l'efficacité du 1-tétradécanol (TD) en tant qu'obturateurs de pores sur des systèmes Au@mSiO<sub>2</sub>. Cette molécule, insoluble dans l'eau, possède un point de fusion autour de 38-39°C et donc ce changement de phase peut être mis à profit pour la délivrance de médicaments activée par effet photothermique (Figure I-27).



**Figure I-27 : Libération cumulée de doxorubicine (DOX) à partir de nanoparticules Au@mSiO<sub>2</sub>@DOX@TD lors de cycle d'irradiation laser on/off – Comparaison avec le profil de libération cumulée à 37°C<sup>[99]</sup>**

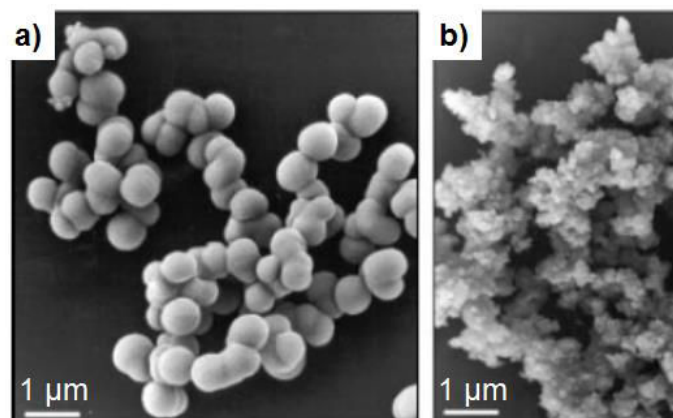
## ii.2. Les bio-hybrides à base de silice pour l'encapsulation

### ii.2.a Biosilicification

La silice est l'un des minéraux les plus abondants sur Terre qui est produit par de nombreux organismes vivants. Par exemple, la diatomée *Cylindrotheca fusiformis* est un matériau bio-hybride qui a particulièrement suscité l'intérêt de la communauté scientifique. De manière intéressante, ces organismes unicellulaires utilisent une matrice organique comme gabarit pour former une capsule de silice appelée frustule qui présente une microstructure avec des tailles caractéristiques de l'échelle nanométrique : c'est la biosilicification. La dissolution sélective de la silice a permis l'isolation et l'identification de la partie organique constituée de peptides polycationiques appelés silaffines.



De manière intéressante, ces espèces organiques sont capables, lorsqu'elles sont ajoutées à une solution d'acide silicique, de générer en quelques secondes un réseau de nanoparticules de silice (Figure I-28).



**Figure I-28 : Images MEB de silice précipitée par a) la silaffin-1A ( $d(\text{particules}) = 500\text{-}700\text{ nm}$ ) et b) un mélange de silaffines ( $d(\text{particules}) < 50\text{nm}$ )<sup>[100]</sup>**

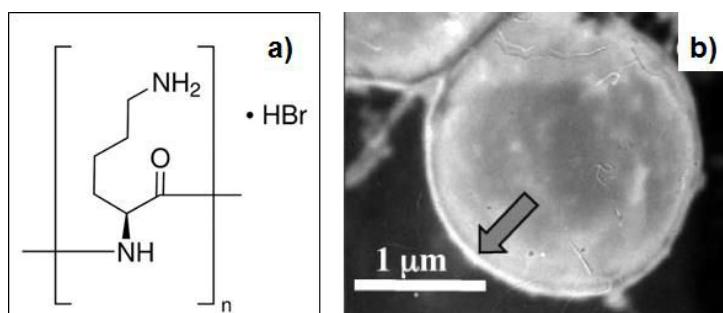
Comme le montre ces images MEB, la nature des peptides mis en jeu a une influence sur l'organisation du réseau et sur la taille des nanoparticules formées<sup>[100]</sup>. Des polyamines à longues chaînes ont été également identifiées dans plusieurs diatomées suggérant leur participation dans la machinerie de la biogénèse de la silice. En effet, leur ajout dans une solution d'acide silicique *in vitro* induit la formation de précipités composés de silice et de polyamines<sup>[101]</sup>. La stœchiométrie de la réaction réalisée suggère une interaction relativement forte entre les groupements amines et les groupes silanols de la silice. Par ailleurs, la formation de liaisons hydrogènes a également été démontrée dans des hybrides synthétisés à partir de polyallylamine<sup>[102]</sup>. Kröger et *al.*<sup>[101]</sup> ont également montré, par fractionnement des chaînes de polyamines extraites des diatomées en fonction de leur masse molaire, que la taille des chaînes avait une influence sur la taille des nanoparticules de silice obtenues.

Ainsi l'action combinée des silaffines et polyamines dirige la condensation de la silice et conduit à une diversité de formes et de structures qui caractérisent les diatomées.

## ii.2.b Capsules bio-hybrides

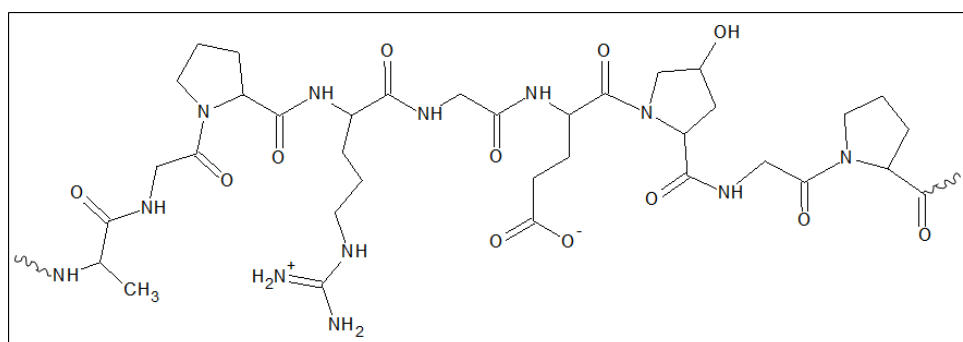
Ces systèmes biologiques hybrides ont inspiré les scientifiques pour le développement de nouvelles méthodes de synthèse de silice structurée utilisant l'acide silicique comme source. Le processus de biosilicification a donc été largement exploré avec différents acides aminés et macromolécules<sup>[103,104]</sup>, qui sont des (poly)cations dans les conditions de pH utilisées.

Parmi ces espèces, la lysine a fait l'objet d'un intérêt particulier puisqu'elle a été identifiée dans les silaffines comme l'élément structural qui accélère la polymérisation de l'acide silicique et favorise la formation de réseaux de nanosphères<sup>[100]</sup>. Par la suite, Coradin et *al.*<sup>[103,105]</sup> ont montré que la poly-L-lysine, qui correspond à un enchaînement d'unités L-lysine (Figure I-29.a), favorisait également la condensation des silicates de sodium. Ce mécanisme a d'ailleurs été mis en œuvre afin d'améliorer les propriétés mécaniques de microcapsules dédiées à l'encapsulation de cellule<sup>[106]</sup>. Dans ce cas, l'utilisation de la poly-L-lysine conduit à des particules caractérisées par une surface lisse et homogène (Figure I-29.b).



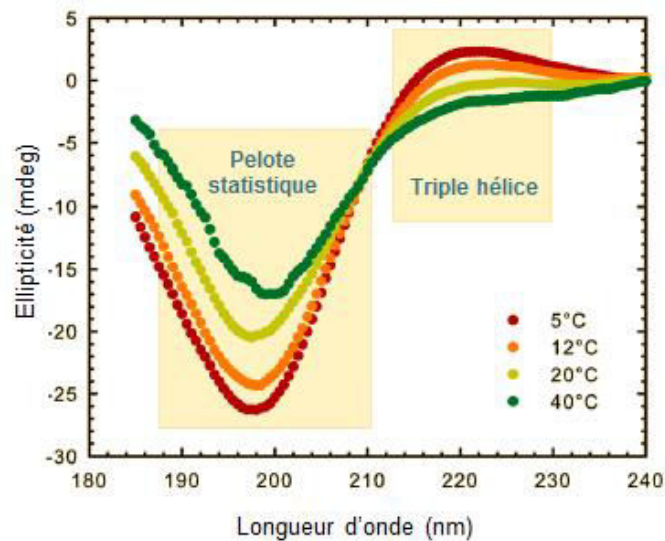
**Figure I-29 : La poly-L-lysine pour la biosilicification : a) Structure chimique et b) Image MEB d'une capsule hybride alginate/poly-L-lysine/SiO<sub>2</sub><sup>[107]</sup>**

La gélatine, qui est gel physique issue de l'hydrolyse partielle du collagène (Figure I-30), a été également très étudiée dans le mécanisme de biosilicification<sup>[108-110]</sup>. En effet, la structuration de ces chaînes en réseau va diriger la formation de la silice et donc la taille et la morphologie des structures obtenues. Ce biopolymère est une protéine constituée de chaînes isolées de collagène, qui, à des températures supérieures à celle de la dénaturation du collagène natif, se comportent comme des polymères en solution. Cependant, en dessous de cette température, les chaînes s'associent pour former une structure en triple hélice.



**Figure I-30 : Structure chimique de la gélatine**

La mesure du dichroïsme circulaire dans l'UV lointain, qui contient des informations sur la structure secondaire des protéines, permet de mettre en évidence cette transition conformationnelle de la gélatine<sup>[111]</sup> (Figure I-31). En effet, lors du refroidissement de la solution de gélatine ( $c = 2 \text{ g/l}$ ), un maximum se développe à 221 nm caractéristique d'une structure en triple hélice. Cette transition conduit à la création d'un réseau tridimensionnel qui piège les molécules d'eau présentes. Le gel formé est un gel physique, les triples hélices n'étant stabilisées que par des liaisons hydrogènes (liaisons faibles) qui peuvent facilement être rompues en augmentant la température.



**Figure I-31 : Spectres de dichroïsme circulaire d'une solution de gélatine à 2 g/l enregistrés à différentes températures<sup>[111]</sup>**

Ce phénomène, réversible, peut être utilisé pour l'encapsulation/libération de médicaments. La température de solubilité de la gélatine se situe autour de 37°C (pour la gélatine issue de la peau de porc), ce qui est relativement bas pour ces applications. Cependant, ce paramètre est modulable ; les stabilités thermique et mécanique de la gélatine peuvent être améliorées grâce à des agents de réticulation tels que les silicates.

Cette synthèse bio-inspirée a dans un premier temps été mise en œuvre pour la formation de silice sur des microparticules de gélatine<sup>[108]</sup>. Par la suite, le développement des méthodes de synthèse pour la réduction de taille de ces particules de polymère, a permis la réalisation de nanocapsules hybrides gélatine/silice<sup>[110]</sup>.

A ce jour, un système plus complexe du type Au@gélatine/silice a été reporté dans la littérature<sup>[112]</sup>, mais la gélatine ne catalyse pas la formation de la couche de silice qui se fait via le procédé Stöber classique.

## IV. Toxicité des nanoparticules

### 1. Généralités

La connaissance de la toxicité potentielle ainsi que l'impact sur la santé des nanoparticules est essentielle avant d'envisager des essais cliniques.

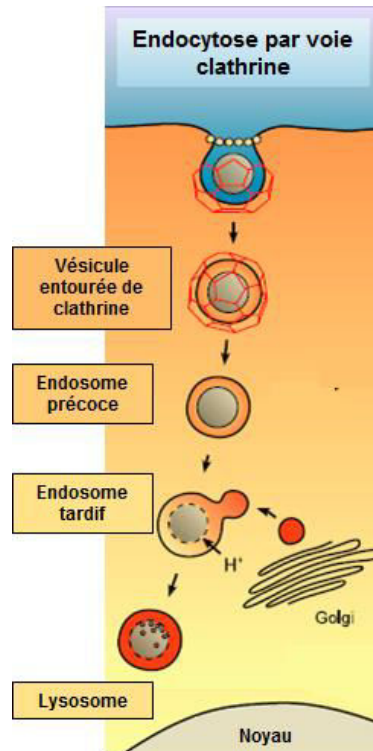
La façon la plus commune d'étudier la biocompatibilité consiste à évaluer la toxicité des nanoparticules *in vitro*, c'est-à-dire dans des milieux de cultures cellulaires.

Ces tests de viabilité évaluent la toxicité globale des nanoparticules en étudiant le nombre de cellules qui survivent ainsi que la prolifération cellulaire après exposition aux nanoparticules. La connaissance de la dose de nanoparticules est essentielle ; de nombreux médicaments qui sont bénéfiques à faibles doses sont toxiques à des doses élevées. Dans la littérature, les doses de nanoparticules utilisées varient beaucoup et le nombre de cellules exposées aux nanoparticules à une concentration donnée n'est pas toujours signalé<sup>[113]</sup>.

De par leurs dimensions, les nanoparticules peuvent interagir avec les cellules. Ces interactions conduisent ou non à leur internalisation par différents processus et peuvent déclencher une réponse des cellules *in vitro* traduisant divers degrés de toxicité.

En effet, lorsque les nanoparticules sont suffisamment petites et qu'elles possèdent des groupements de surface adéquats, elles sont capables de traverser la membrane cellulaire directement par diffusion<sup>[114]</sup>. Mais plus généralement, les nanoparticules sont internalisées par un mécanisme d'endocytose. Parmi les différents mécanismes, l'endocytose par voie clathrine est l'un des plus rencontrés. Cette internalisation peut se faire par reconnaissance de récepteurs spécifiques ou non.

Lors du mécanisme d'endocytose, les nanoparticules viennent dans un premier temps s'adsorber sur la membrane plasmique pour ensuite pénétrer dans le cytoplasme via l'invagination de la membrane et la formation d'une vésicule (Figure I-32). Cette vésicule fusionne ensuite avec un endosome et enfin le matériel est recyclé, via la fusion des endosomes avec les lysosomes qui ont une action dégradative<sup>[115,116]</sup>. Dans le cas où les nanoparticules ne peuvent être digérées, la cellule devient exposée à des doses importantes de nanoparticules et répond alors par les voies classiques des systèmes de défense.



**Figure I-32 : Mécanisme d'endocytose d'une nanoparticule : exemple de la voie clathrine<sup>[115]</sup>**

L'exposition des cellules aux nanoparticules, qu'elles soient internalisées ou non, peut induire un stress oxydant qui résulte de la sur-production extra ou intracellulaire d'espèces réactives de l'oxygène ce qui déclenche une réponse inflammatoire et peut endommager la membrane ou dans le pire des cas conduire à l'apoptose (mort cellulaire programmée).

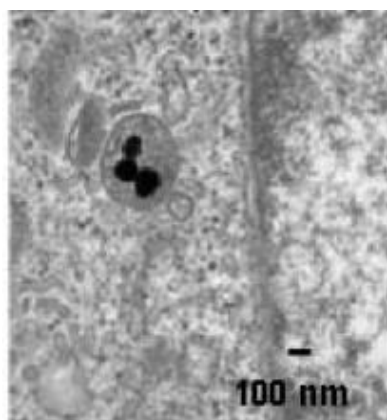
Le nombre de publications traitant de la compréhension des interactions entre différents types de nanoparticules et de cellules en fonction de la taille, de la forme et de la chimie de surface des nanomatériaux n'a cessé d'augmenter ces dix dernières années. Par exemple, des nanoparticules d'or stabilisées par du citrate (13 nm de diamètre) se sont avérées toxiques pour une lignée cellulaire de carcinome humain de poumons et non toxiques pour une lignée cellulaire de carcinome humain du foie<sup>[117]</sup> et ce à concentration identique. D'un autre côté, Slowing et *al.*<sup>[118]</sup> ont montré l'influence de la fonctionnalisation de surface de nanoparticules de silice mésoporeuse sur l'internalisation par des cellules cancéreuses humaines (HeLa). Cette étude a montré que les nanoparticules chargées positivement avaient tendance à être mieux internalisées du fait des interactions avec la membrane plasmique chargée négativement. Ce résultat a également été mis en évidence avec des nanoparticules d'or sur une autre lignée de cellule cancéreuse humaine (SK-BR-3)<sup>[119]</sup>.

Cependant, de manière générale, il est difficile de tirer des conclusions simples de ces différentes études à cause de la variabilité des paramètres : les propriétés physiques et chimiques des particules, le type de lignée cellulaire, les dosages ainsi que les analyses biochimiques utilisées.

## 2. *Evaluation de la cytotoxicité in vitro*

L'une des méthodes permettant d'évaluer *in vitro* la cytotoxicité des nanoparticules est la cytométrie de flux<sup>[120]</sup>. Cette technique permet de différencier ainsi que de quantifier les cellules vivantes et les cellules mortes par le biais de marqueurs spécifiques.

Pour visualiser les nanoparticules et mesurer leur concentration dans les cellules, il existe plusieurs méthodes. Les nanoparticules sont facilement distinguables des composés cellulaires par microscopie électronique en transmission en particulier si elles sont constituées de métaux qui sont des éléments riches en électrons (Figure I-33).



**Figure I-33 : Cliché MET de nanoparticules d'or de 100 nm de diamètre piégées dans une vésicule de cellule HeLa<sup>[121]</sup>**

Cependant, la préparation des échantillons ainsi que l'analyse sont généralement assez longues ce qui limite quelque peu l'utilisation de cette technique en « routine ».

La plupart des nanomatériaux étant majoritairement constitués d'éléments qui ne sont pas présents dans les cellules, il est possible de les quantifier. L'ICP-AES ou l'ICP-MS permet, de manière quantitative, d'analyser les nanoparticules dans les cellules (par digestion des cellules) ou restant dans le milieu de culture. Cette technique possède une grande spécificité ainsi qu'une limite de détection très basse qui en font un excellent outil pour l'analyse quantitative. Néanmoins, elle ne permet pas d'évaluer l'internalisation de nanoparticules carbonées (polymères ou nanotube de carbone) pour lesquelles il est impossible de différencier le carbone des cellules de celui des nanoparticules. Enfin, cette technique souffre également d'un manque d'information concernant la localisation puisqu'il est difficile de distinguer les nanoparticules adsorbées à la surface des cellules de celles internalisées par les cellules<sup>[119]</sup>.

La spectroscopie de fluorescence peut être également utilisée à la fois pour l'analyse quantitative mais aussi pour la localisation dans les cellules. Ainsi, lorsque les nanoparticules ne possèdent pas de propriétés de fluorescence intrinsèques, il est nécessaire de les fonctionnaliser avec des traceurs fluorescents tels que l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC) ou le Red Texas. Néanmoins, ces

fluorophores peuvent altérer les propriétés physico-chimiques des nanoparticules mais également impacter la cytotoxicité<sup>[122]</sup>.

## V. Propos sur l'analyse des nanoparticules

Il était opportun de clore cette revue bibliographique par quelques considérations autour de l'analyse des matériaux nanostructurés qui n'est pas triviale. Ce paragraphe permet, entre autres, de sensibiliser le lecteur sur l'originalité d'une description de la surface des nanoparticules qui est pratiquement application-dépendante. Un état de l'art des moyens de caractérisation dans le domaine des nanosciences aurait été bien exhaustif et un premier aperçu nous a semblé plus judicieux ici avant de développer les procédures analytiques par ailleurs dans la suite du manuscrit, leurs limitations ainsi que les effets induits par le sous-dimensionnement des systèmes étudiés.

Malgré le développement de moyens toujours plus sensibles à la dimension nanométrique, il est reconnu que l'information rapportée au sujet des nanomatériaux est souvent incomplète et/ou inadéquate<sup>[123]</sup>, chaque champ disciplinaire d'application ne connaissant effectivement pas la même rigueur d'investigation.

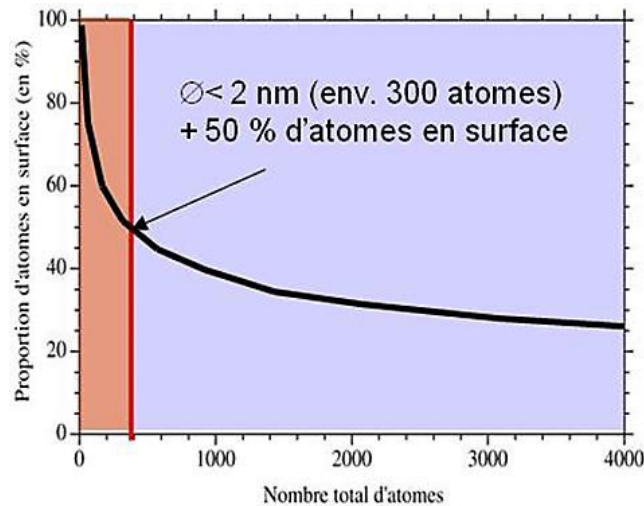
Un nombre important de challenges sur le plan de leur caractérisation reste encore à relever ; ces défis purement technologiques ou bien cette maîtrise à acquérir dans la manipulation des objets peuvent potentiellement retarder et même inhiber leur essor ainsi que celui des nanotechnologies attenantes<sup>[124]</sup>. Une caractérisation incomplète et le manque de données factuelles pour reproduire et valider les découvertes impliquant les nanomatériaux ralentissent en effet la perception à long terme de durée de vie des produits, et des questions qui relèvent des préoccupations et de la santé publique par exemple. Aujourd'hui, il est largement admis qu'avec la taille d'une particule qui diminue jusqu'à l'échelle du nanomètre (et avec l'augmentation du rapport nombre d'atomes de surface/nombre d'atomes en volume, Figure I-34), il existe une variété de raisons, incluant les effets de confinement quantique, qui entraînent une différence notable entre les propriétés physiques et chimiques de celles du matériau massif.

La fraction significative d'atomes de surface ou de molécules associées aux surfaces et interfaces, augmente par ailleurs l'impact d'impuretés de surface, d'enrichissement ou d'appauvrissement de surface ou encore de contamination de surface<sup>[123]</sup> sur les propriétés des nanoparticules et complique les mesures précises.

Pour cette raison, les phénomènes aux surfaces et interfaces doivent être intégrés dans la réflexion globale analytique afin de mettre en lumière le rôle des atomes de surface ou des motifs fonctionnels greffés.

Cette prise de conscience pour l'étude de nanocatalyseurs supportés par exemple est une réussite totale, avec l'examen de plus en plus systématique de la nanostructuration de surface ; à l'inverse, ces opérations restent *virtuellement* non entreprises pour décrire des nanoparticules non supportées dans le

domaine du biomédical et de la santé. Karatoki et *al.*<sup>[125]</sup> souligne à cet effet tout le potentiel extraordinaire de la chimie de surface des nanoparticules qui pourrait être associé à la réflexion menée autour de la toxicologie largement encore sous-estimé.



**Figure I-34 : Evolution de la proportion d'atomes de surface en fonction du nombre total d'atomes**

Les méthodes microscopiques qui permettent la visualisation de nanostructures sur des substrats ont été les éléments moteurs du développement des nanotechnologies et sont aujourd'hui toujours aussi sollicitées. Cependant, dans cette quête à la description *la plus complète soit-elle* des nanoparticules, le comité international ISO TC201 d'analyse de chimie de surface a listé récemment les besoins de caractérisation pour les nanomatériaux<sup>[126]</sup>. Il apparaît clairement que deux aspects essentiels des propriétés des nanoparticules ne sont effectivement pas bien appréciés :

- l'importance de la composition et ordre chimique de surface qui influencent directement leurs performances et propriétés ;
- leur dynamique dans un milieu donné.

Les critères pour une évaluation adéquate des nanoparticules qui ont été préconisés mettent en avant la chimie de surface et par là même la détermination de la contamination de surface, l'état chimique des éléments constitutifs, l'enrichissement des espèces à la surface ou aux interfaces et la connaissance précise de la fonctionnalisation de surface.

De façon synthétique, sont reportés dans le Tableau I-1 les différents types d'informations (topographie, composition élémentaire, état chimique et/ou moléculaire, structure) obtenus sur les nanomatériaux et les spécificités des techniques de surface les plus couramment employées à l'heure actuelle<sup>[127,128]</sup> (Spectroscopies électroniques (XPS, AES)), les méthodes complémentaires basées sur des processus ioniques (ex : TOF-SIMS) et les microscopies à champ proche (AFM et STM).

Dans les chapitres suivants de ce travail de thèse, nous adopterons volontairement une approche analytique globale des nanomatériaux synthétisés en combinant :



- la description et le contrôle structural par le biais de la microscopie électronique (MEB, MET),
- avec l'information chimique de surface obtenue par les spectroscopies d'électrons.

Cette dualité offre, en effet, davantage de relief à la perception d'objets dynamiques qui interagissent avec leur environnement, et qui sont des fois tout à fait surprenants.

**Tableau I-1 : Caractéristiques des méthodes d'analyse de surface usuelles et les types d'information disponibles pour les nanomatériaux<sup>[129]</sup>**

Surface analysis methods	Information available	Probe	Detected	Lateral resolution	Information depth	Depth resolution
<b>Electron Spectroscopies</b> X-ray photoelectron spectroscopy	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Analysis of a collection of particles deposited on a substrate or other support</li> <li>• Surface composition and/or chemical state</li> <li>• Enrichment or depletion of elements at surface</li> <li>• Presence and/or thickness of coatings or contaminants</li> <li>• Nanoparticle Size (when smaller than ~10 nm, can sometimes determine average particle size when too small to be detected by other methods or in complex matrix)</li> <li>• Surface functionalization and presence of defects</li> <li>• Electrical properties of nanoparticles and coatings</li> </ul>	X-rays	Photoelectrons	≈2 nm System dependent	≈10 nm	≈2 nm
Auger electron spectroscopy	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Surface composition of individual large nanoparticles or distribution of smaller nanoparticles (depending on spatial resolution of specific instrument)</li> <li>• Enrichment or depletion of elements at surface</li> <li>• Presence and/or thickness of coatings and/or contaminants</li> </ul>	Electrons (~3 to 20 kV)	Auger electrons	≈10 nm	≈10 nm	≈2 nm
<b>Incident Ion Methods</b> Secondary ion mass spectrometry	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Usually analysis of a collection of particles or larger individual particles deposited on a supporting substrate</li> <li>• Presence of surface coatings or contaminants on collections of nanoparticles</li> <li>• Functional groups on surface</li> </ul>	Ions (~3 – 20 kV)	Sputtered ions	≈50 nm (inorganic) > 200 nm (organic)	≈1 nm	≈1 nm (inorganic) ≈10 nm (organic)
Low-energy ion scattering	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Presence of ultrathin coating or contamination</li> <li>• Continuity or defects in surface layers</li> <li>• Effects of size</li> </ul>	Ions (~2 to 10 kV)	Elastically scattered ions	≈100 nm	≈10 nm	≈0.1 nm
Medium-energy ion scattering	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Depth Distribution in particles and coatings</li> <li>• Buried layers and particles</li> </ul>	Ions (50–200 kV)	Elastically scattered ions	10 nm (TOF) 1 nm (ESA)	~10 s nm	≈0.1 nm
<b>Scanning Probe Microscopies</b> Scanning tunneling microscopy	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Electrical characteristics of individual nanoparticles</li> <li>• Nanoparticle formation and/or size distribution of particles deposited or grown on a surface</li> </ul>	Stylus	Tunneling current	≈1 nm	≈10 nm	
Atomic force microscopy	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Shape, texture and roughness of individual particles and their distribution for an assembly of particles</li> <li>• When particle structure is known, can provide information about crystallographic orientation</li> </ul>	Stylus	Force or displacement	≈1 nm	≈10 nm	

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] J. E. Hutchison, *ACS Nano* **2008**, 2, 395.
- [2] M. Y. Gamarnik, *Nanostructured Mater.* **1996**, 7, 651.
- [3] C. Huang, A. Notten, N. Rasters, *J. Technol. Transf.* **2011**, 36, 145.
- [4] R. W. Siegel, *Nanostructure Science and Technology: R & D Status and Trends in Nanoparticles, Nanostructured Materials and Nanodevices*, Springer Science & Business Media, **1999**.
- [5] R. W. Siegel, *Pour Sci.* **1997**, 232, 58.
- [6] B. k. h. Yen, N. e. Stott, K. f. Jensen, M. g. Bawendi, *Adv. Mater.* **2003**, 15, 1858.
- [7] J.-P. Fortin, C. Wilhelm, J. Servais, C. Ménager, J.-C. Bacri, F. Gazeau, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 129, 2628.
- [8] D. Jaque, L. Martínez Maestro, B. del Rosal, P. Haro-Gonzalez, A. Benayas, J. L. Plaza, E. Martín Rodríguez, J. García Solé, *Nanoscale* **2014**, 6, 9494.
- [9] X. Huang, P. K. Jain, I. H. El-Sayed, M. A. El-Sayed, *Lasers Med. Sci.* **2008**, 23, 217.
- [10] W. H. De Jong, P. J. Borm, *Int. J. Nanomedicine* **2008**, 3, 133.
- [11] R. Bardhan, S. Lal, A. Joshi, N. J. Halas, *Acc. Chem. Res.* **2011**, 44, 936.
- [12] P. Couvreur, C. Vauthier, *Pharm. Res.* **2006**, 23, 1417.
- [13] R. Ghosh Chaudhuri, S. Paria, *Chem. Rev.* **2012**, 112, 2373.
- [14] S. Giri, B. G. Trewyn, V. S. Y. Lin, *Nanomed.* **2007**, 2, 99.
- [15] F. X. Gu, R. Karnik, A. Z. Wang, F. Alexis, E. Levy-Nissenbaum, S. Hong, R. S. Langer, O. C. Farokhzad, *Nano Today* **2007**, 2, 14.
- [16] S. Mura, J. Nicolas, P. Couvreur, *Nat. Mater.* **2013**, 12, 991.
- [17] M. Faraday, *Philos. Trans. R. Soc. Lond.* **1857**, 147, 145.
- [18] G. Mie, *Ann. Phys.* **1908**, 330, 377.
- [19] K. L. Kelly, E. Coronado, L. L. Zhao, G. C. Schatz, *J. Phys. Chem. B* **2003**, 107, 668.
- [20] S. Link, M. A. El-Sayed, *J. Phys. Chem. B* **1999**, 103, 4212.
- [21] Y. Sun, Y. Xia, *The Analyst* **2003**, 128, 686.
- [22] S. Link, M. A. El-Sayed, *J. Phys. Chem. B* **1999**, 103, 4212.
- [23] B. Sepúlveda, P. C. Angelomé, L. M. Lechuga, L. M. Liz-Marzán, *Nano Today* **2009**, 4, 244.

- [24] S. Underwood, P. Mulvaney, *Langmuir* **1994**, *10*, 3427.
- [25] T. Ung, L. M. Liz-Marzán, P. Mulvaney, *J. Phys. Chem. B* **2001**, *105*, 3441.
- [26] Y. Sun, Y. Xia, *The Analyst* **2003**, *128*, 686.
- [27] Y. Sun, B. Mayers, Y. Xia, *Adv. Mater.* **2003**, *15*, 641.
- [28] H. J. Simon, D. E. Mitchell, J. G. Watson, *Phys. Rev. Lett.* **1974**, *33*, 1531.
- [29] K. Kneipp, H. Kneipp, I. Itzkan, R. R. Dasari, M. S. Feld, *Chem. Rev.* **1999**, *99*, 2957.
- [30] S. Link, M. A. El-Sayed, *Int. Rev. Phys. Chem.* **2000**, *19*, 409.
- [31] J. Chen, C. Glaus, R. Laforest, Q. Zhang, M. Yang, M. Gidding, M. J. Welch, Y. Xia, *Small Weinh. Bergstr. Ger.* **2010**, *6*, 811.
- [32] D. Jaque, L. Martínez Maestro, B. del Rosal, P. Haro-Gonzalez, A. Benayas, J. L. Plaza, E. Martín Rodríguez, J. García Solé, *Nanoscale* **2014**, *6*, 9494.
- [33] H. Kobayashi, M. Ogawa, R. Alford, P. L. Choyke, Y. Urano, *Chem. Rev.* **2010**, *110*, 2620.
- [34] Y. Wang, K. C. L. Black, H. Luehmann, W. Li, Y. Zhang, X. Cai, D. Wan, S.-Y. Liu, M. Li, P. Kim, Z.-Y. Li, L. V. Wang, Y. Liu, Y. Xia, *ACS Nano* **2013**, *7*, 2068.
- [35] K.-T. Yong, Y. Sahoo, M. T. Swihart, P. N. Prasad, *Colloids Surf. Physicochem. Eng. Asp.* **2006**, *290*, 89.
- [36] S. J. Oldenburg, R. D. Averitt, S. L. Westcott, N. J. Halas, *Chem. Phys. Lett.* **1998**, *288*, 243.
- [37] Y. Sun, B. T. Mayers, Y. Xia, *Nano Lett.* **2002**, *2*, 481.
- [38] W. Stöber, A. Fink, E. Bohn, *J. Colloid Interface Sci.* **1968**, *26*, 62.
- [39] C. Graf, A. van Blaaderen, *Langmuir* **2002**, *18*, 524.
- [40] R. Ashayer, S. H. Mannan, S. Sajjadi, *Colloids Surf. Physicochem. Eng. Asp.* **2008**, *329*, 134.
- [41] J. Xue, C. Wang, Z. Ma, *Mater. Chem. Phys.* **2007**, *105*, 419.
- [42] T. Pham, J. B. Jackson, N. J. Halas, T. R. Lee, *Langmuir* **2002**, *18*, 4915.
- [43] J. Tharion, J. Satija, S. Mukherji, *RSC Adv* **2014**, *4*, 3984.
- [44] B. E. Brinson, J. B. Lassiter, C. S. Levin, R. Bardhan, N. Mirin, N. J. Halas, *Langmuir* **2008**, *24*, 14166.
- [45] S. J. Oldenburg, R. D. Averitt, S. L. Westcott, N. J. Halas, *Chem. Phys. Lett.* **1998**, *288*, 243.
- [46] M. R. Rasch, K. V. Sokolov, B. A. Korgel, *Langmuir* **2009**, *25*, 11777.
- [47] S. G. Jang, S.-H. Kim, S. Y. Lee, W. C. Jeong, S.-M. Yang, *J. Colloid Interface Sci.* **2010**, *350*, 387.

- [48] Y. Sun, Y. Xia, *J Am Chem Soc* **2004**, *126*, 3892.
- [49] Y. Sun, B. Mayers, Y. Xia, *Adv. Mater.* **2003**, *15*, 641.
- [50] Y. Sun, Y. Xia, *Anal. Chem.* **2002**, *74*, 5297.
- [51] W. H. Qi, S. T. Lee, *J. Phys. Chem. C* **2010**, *114*, 9580.
- [52] T. Shibata, B. A. Bunker, Z. Zhang, D. Meisel, C. F. Vardeman, J. D. Gezelter, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 11989.
- [53] V. Vongsavat, B. M. Vittur, W. W. Bryan, J.-H. Kim, T. R. Lee, *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2011**, *3*, 3616.
- [54] B. Goris, L. Polavarapu, S. Bals, G. Van Tendeloo, L. M. Liz-Marzán, *Nano Lett.* **2014**, *14*, 3220.
- [55] Y. Choi, S. Hong, L. Liu, S. K. Kim, S. Park, *Langmuir* **2012**, *28*, 6670.
- [56] Y. Sun, Y. Xia, *Nano Lett.* **2003**, *3*, 1569.
- [57] X. Lu, H.-Y. Tuan, J. Chen, Z.-Y. Li, B. A. Korgel, Y. Xia, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 1733.
- [58] L. R. Hirsch, R. J. Stafford, J. A. Bankson, S. R. Sershen, B. Rivera, R. E. Price, J. D. Hazle, N. J. Halas, J. L. West, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2003**, *100*, 13549.
- [59] D. K. Chatterjee, P. Diagaradjane, S. Krishnan, *Ther. Deliv.* **2011**, *2*, 1001.
- [60] D. P. O'Neal, L. R. Hirsch, N. J. Halas, J. D. Payne, J. L. West, *Cancer Lett.* **2004**, *209*, 171.
- [61] M. P. Melancon, W. Lu, Z. Yang, R. Zhang, Z. Cheng, A. M. Elliot, J. Stafford, T. Olson, J. Z. Zhang, C. Li, *Mol. Cancer Ther.* **2008**, *7*, 1730.
- [62] S. Fk, *Radiol. Clin. North Am.* **1989**, *27*, 621.
- [63] R. Ghosh Chaudhuri, S. Paria, *Chem. Rev.* **2012**, *112*, 2373.
- [64] M. Ebelmen, *Ann. Chim. Physique* **1846**, *16*, 129.
- [65] W. Geffcken, E. Berger, *Ger. Pat.* **1939**, 736 411.
- [66] J. Livage, *Le Monde* **1977**.
- [67] C. J. Brinker, *J. Non-Cryst. Solids* **1988**, *100*, 31.
- [68] B. L. Cushing, V. L. Kolesnichenko, C. J. O'Connor, *Chem. Rev.* **2004**, *104*, 3893.
- [69] M. Grün, I. Lauer, K. K. Unger, *Adv. Mater.* **1997**, *9*, 254.
- [70] J. S. Beck, J. C. Vartuli, W. J. Roth, M. E. Leonowicz, C. T. Kresge, K. D. Schmitt, C. T. W. Chu, D. H. Olson, E. W. Sheppard, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 10834.
- [71] M. Vallet-Regi, A. Rámila, R. P. del Real, J. Pérez-Pariente, *Chem. Mater.* **2001**, *13*, 308.

- [72] F. Hoffmann, M. Cornelius, J. Morell, M. Fröba, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 3216.
- [73] A. Monnier, F. Schüth, Q. Huo, D. Kumar, D. Margolese, R. S. Maxwell, G. D. Stucky, M. Krishnamurty, P. Petroff, A. Firouzi, M. Janicke, B. F. Chmelka, *Science* **1993**, *261*, 1299.
- [74] O. I. Lebedev, G. Van Tendeloo, O. Collart, P. Cool, E. F. Vansant, *Solid State Sci.* **2004**, *6*, 489.
- [75] K. S. W. Sing, *Pure Appl. Chem.* **1985**, *57*, DOI 10.1351/pac198557040603.
- [76] M. Grün, K. K. Unger, A. Matsumoto, K. Tsutsumi, *Microporous Mesoporous Mater.* **1999**, *27*, 207.
- [77] S. Liu, P. Cool, O. Collart, P. Van Der Voort, E. F. Vansant, O. I. Lebedev, G. Van Tendeloo, M. Jiang, *J. Phys. Chem. B* **2003**, *107*, 10405.
- [78] D. Zhao, Q. Huo, J. Feng, B. F. Chmelka, G. D. Stucky, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 6024.
- [79] P. T. Tanev, T. J. Pinnavaia, *Science* **1995**, *267*, 865.
- [80] S. B. Yoon, J.-Y. Kim, J. H. Kim, Y. J. Park, K. R. Yoon, S.-K. Park, J.-S. Yu, *J. Mater. Chem.* **2007**, *17*, 1758.
- [81] L. M. Liz-Marzán, A. P. Philipse, *J. Colloid Interface Sci.* **1995**, *176*, 459.
- [82] L. M. Liz-Marzán, M. Giersig, P. Mulvaney, *Langmuir* **1996**, *12*, 4329.
- [83] C. Graf, D. L. J. Vossen, A. Imhof, A. van Blaaderen, *Langmuir* **2003**, *19*, 6693.
- [84] E. Mine, A. Yamada, Y. Kobayashi, M. Konno, L. M. Liz-Marzán, *J. Colloid Interface Sci.* **2003**, *264*, 385.
- [85] P. Botella, A. Corma, M. T. Navarro, *Chem. Mater.* **2007**, *19*, 1979.
- [86] R. I. Nooney, D. Thirunavukkarasu, Y. Chen, R. Josephs, A. E. Ostafin, *Langmuir* **2003**, *19*, 7628.
- [87] I. Gorelikov, N. Matsuura, *Nano Lett.* **2008**, *8*, 369.
- [88] J. Croissant, J. I. Zink, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 7628.
- [89] P. Judeinstein, C. Sanchez, *J Mater Chem* **1996**, *6*, 511.
- [90] C. Sanchez, G. J. D. A. A. Soler-Illia, F. Ribot, D. Grosso, *Comptes Rendus Chim.* **2003**, *6*, 1131.
- [91] C. Sanchez, B. Julián, P. Belleville, M. Popall, *J. Mater. Chem.* **2005**, *15*, 3559.
- [92] C. Sanchez, L. Rozes, F. Ribot, C. Laberty-Robert, D. Grosso, C. Sassoie, C. Boissiere, L. Nicole, *Comptes Rendus Chim.* **2010**, *13*, 3.
- [93] N. Liu, B. S. Prall, V. I. Klimov, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 15362.

- [94] N. Sui, V. Monnier, Y. Zakharko, Y. Chevolot, S. Alekseev, J.-M. Bluet, V. Lysenko, E. Souteyrand, *J. Nanoparticle Res.* **2012**, *14*, 1.
- [95] T. D. Nguyen, K. C.-F. Leung, M. Liong, C. D. Pentecost, J. F. Stoddart, J. I. Zink, *Org. Lett.* **2006**, *8*, 3363.
- [96] S. Angelos, E. Choi, F. Vögtle, L. De Cola, J. I. Zink, *J. Phys. Chem. C* **2007**, *111*, 6589.
- [97] C. R. Thomas, D. P. Ferris, J.-H. Lee, E. Choi, M. H. Cho, E. S. Kim, J. F. Stoddart, J.-S. Shin, J. Cheon, J. I. Zink, *J Am Chem Soc* **2010**, *132*, 10623.
- [98] J. Yang, D. Shen, L. Zhou, W. Li, X. Li, C. Yao, R. Wang, A. M. El-Toni, F. Zhang, D. Zhao, *Chem. Mater.* **2013**, *25*, 3030.
- [99] J. Liu, C. Detrembleur, M.-C. De Pauw-Gillet, S. Mornet, C. Jérôme, E. Duguet, *Small* **2015**, n/a.
- [100] N. Kröger, *Science* **1999**, *286*, 1129.
- [101] N. Kröger, R. Deutzmann, C. Bergsdorf, M. Sumper, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2000**, *97*, 14133.
- [102] T. Mizutani, H. Nagase, N. Fujiwara, H. Ogoshi, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1998**, *71*, 2017.
- [103] T. Coradin, J. Livage, *Colloids Surf. B Biointerfaces* **2001**, *21*, 329.
- [104] S. V. Patwardhan, S. J. Clarson, *Mater. Sci. Eng. C* **2003**, *23*, 495.
- [105] C. Gautier, P. J. Lopez, J. Livage, T. Coradin, *J. Colloid Interface Sci.* **2007**, *309*, 44.
- [106] T. Coradin, E. Mercey, L. Lisnard, J. Livage, *Chem Commun* **2001**, 2496.
- [107] M. Boissière, P. J. Meadows, R. Brayner, C. Hélarly, J. Livage, T. Coradin, *J. Mater. Chem.* **2006**, *16*, 1178.
- [108] T. Coradin, J. Livage, *Mater. Sci. Eng. C* **2005**, *25*, 201.
- [109] T. Coradin, A. Marchal, N. Abdoul-Aribi, J. Livage, *Colloids Surf. B Biointerfaces* **2005**, *44*, 191.
- [110] J. Allouche, M. Boissière, C. Hélarly, J. Livage, T. Coradin, *J. Mater. Chem.* **2006**, *16*, 3120.
- [111] D. Pelc, S. Marion, M. Požek, M. Basletić, *Soft Matter* **2014**, *10*, 348.
- [112] S. Liu, Z. Zhang, M.-Y. Han, *Adv. Mater.* **2005**, *17*, 1862.
- [113] A. M. Alkilany, C. J. Murphy, *J. Nanoparticle Res.* **2010**, *12*, 2313.
- [114] T. Wang, J. Bai, X. Jiang, G. U. Nienhaus, *ACS Nano* **2012**, *6*, 1251.
- [115] H. Hillaireau, P. Couvreur, *Cell. Mol. Life Sci.* **2009**, *66*, 2873.
- [116] S. D. Conner, S. L. Schmid, *Nature* **2003**, *422*, 37.

- [117] H. K. Patra, S. Banerjee, U. Chaudhuri, P. Lahiri, A. K. Dasgupta, *Nanomedicine Nanotechnol. Biol. Med.* **2007**, *3*, 111.
- [118] I. Slowing, B. G. Trewyn, V. S.-Y. Lin, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 14792.
- [119] E. C. Cho, J. Xie, P. A. Wurm, Y. Xia, *Nano Lett.* **2009**, *9*, 1080.
- [120] N. G. Papadopoulos, G. V. Z. Dedoussis, G. Spanakos, A. D. Gritzapis, C. N. Baxevanis, M. Papamichail, *J. Immunol. Methods* **1994**, *177*, 101.
- [121] B. D. Chithrani, A. A. Ghazani, W. C. W. Chan, *Nano Lett.* **2006**, *6*, 662.
- [122] B. J. Marquis, S. A. Love, K. L. Braun, C. L. Haynes, *The Analyst* **2009**, *134*, 425.
- [123] D. W. Grainger, D. G. Castner, *Adv. Mater.* **2008**, *20*, 867.
- [124] D. R. Baer, J. E. Amonette, M. H. Engelhard, D. J. Gaspar, A. S. Karakoti, S. Kuchibhatla, P. Nachimuthu, J. T. Nurmi, Y. Qiang, V. Sarathy, S. Seal, A. Sharma, P. G. Tratnyek, C.-M. Wang, *Surf. Interface Anal.* **2008**, *40*, 529.
- [125] A. S. Karakoti, L. L. Hench, S. Seal, *JOM* **2006**, *58*, 77.
- [126] D. R. Baer, *J. Surf. Anal. Online* **2011**, *17*, 163.
- [127] C. J. Powell, *J. Vac. Sci. Technol. A* **2003**, *21*, S42.
- [128] F. Reniers, C. Tewel, *J. Electron Spectrosc. Relat. Phenom.* **2005**, *142*, 1.
- [129] D. R. Baer, M. H. Engelhard, G. E. Johnson, J. Laskin, J. Lai, K. Mueller, P. Munusamy, S. Thevuthasan, H. Wang, N. Washton, A. Elder, B. L. Baisch, A. Karakoti, S. V. N. T. Kuchibhatla, D. Moon, *J. Vac. Sci. Technol. A* **2013**, *31*, 050820.



CHAPITRE II.  
SYNTHESE ET CARACTERISATION  
DE NANOPARTICULES D'OR  
CREUSES



## INTRODUCTION

Ce chapitre s'intéresse à l'élaboration et la caractérisation de nanoparticules d'or sphériques creuses (« nanoshells ») qui seront par la suite considérées comme le cœur de nanosystèmes cœur-coquille Au@SiO<sub>2</sub>. L'objectif de ce travail préliminaire est de synthétiser des nanoparticules métalliques avec une morphologie contrôlée et une surface homogène pour la construction ultérieure d'une coquille inorganique et de s'assurer des propriétés optiques adaptées à la fenêtre biologique en vue d'une utilisation potentielle en tant qu'agent photothermique.

Comme nous l'avons vu dans le chapitre bibliographique, la synthèse de nanoshells d'or et plus généralement la synthèse de nanoparticules creuses, a fait l'objet d'un grand intérêt en raison de leurs propriétés optiques et photothermiques. En particulier, le groupe de Xia a développé une méthode de synthèse originale basée sur une réaction de remplacement galvanique conduisant à des nanostructures creuses et caractérisées par une surface relativement homogène<sup>[1]</sup>. Cette méthode a, par la suite, été largement utilisée et ces différentes études ont montrées que les conditions et les paramètres de synthèses mis en jeu tels que la température ou la nature du sel métallique, ont un impact sur le mécanisme de formation et donc sur la morphologie, la structure, la composition chimique ainsi que sur les propriétés des nanoparticules.

Pour ce travail de thèse, le procédé de remplacement galvanique a été amorcé sur la base de nanoparticules d'argent gabarits préalablement synthétisées. L'influence de plusieurs paramètres de synthèse sur la morphologie, la structure et l'état de surface des nanoparticules d'or a été évaluée. Dans les conditions de synthèse optimisées, nous avons ensuite abordé l'étude des propriétés optiques des nanoparticules métalliques induites par la résonance plasmon de surface, que nous avons modulées à la gamme du visible-proche infrarouge.

La description approfondie de la nature chimique de ces systèmes étant nécessaire pour la compréhension des mécanismes mis en jeu dans la synthèse, nous avons systématiquement caractérisé les nanoparticules par le biais de techniques d'analyse de surface. La spectroscopie photoélectronique à rayonnement X a dans un premier temps été utilisée pour décrire les nanoparticules aux différentes étapes du processus de remplacement galvanique. L'interprétation de l'ensemble des spectres XPS obtenus s'est appuyée essentiellement sur une base de données construite à partir de l'analyse de composés de référence. L'étude quantitative complète, qui nécessite l'analyse haute résolution de l'ensemble des éléments chimiques d'un composé, a été automatiquement réalisée, mais n'est pas toujours reportée dans le corps du texte afin de faciliter la lecture du document. Par la suite, la coupe des nanoparticules couplée à l'analyse par spectroscopie d'électrons Auger de la tranche des nano-objets ont été effectuées. Ces expérimentations spécifiques ont été envisagées afin de sonder l'ordre chimique interne des nanoshells et de mieux appréhender la mécanistique de l'élaboration de ces nanostructures. Une présentation synthétique des deux techniques d'analyse de surface utilisées dans ce travail

ainsi que les conditions expérimentales sont présentées. Pour l’XPS, nous présentons également quelques spécificités qui sont propres à l’analyse de nanoparticules.

## I. Méthode de remplacement galvanique pour la synthèse des nanoparticules

Dans cette première partie, nous détaillerons les différents modes opératoires conduisant à la réalisation de ces nanoparticules. Nous présenterons également les principales caractérisations morphologiques réalisées à chaque étape d’élaboration du matériau.

De par leur spécificité structurale (nanoparticules creuses), la synthèse des nanoshells d’or nécessite l’utilisation de nanoparticules gabarits. Nous avons choisi d’utiliser des nanoparticules d’argent qui vont donc jouer le rôle de support pour une réaction d’oxydoréduction. Cette méthode de préparation originale est simple à mettre en œuvre et conduit à des nanostructures creuses bien définies.

### 1. Les nanoparticules d’argent gabarits

La synthèse des nanoparticules d’argent sphériques peut être mise en œuvre par différentes procédures de synthèse chimiques mais également en utilisant des méthodes de synthèse alternatives comme la photochimie<sup>[2]</sup>, la radiolyse<sup>[3]</sup>, la sonochimie<sup>[4]</sup> et encore les méthodes assistées par micro-ondes<sup>[5]</sup>. Cependant, la méthode la plus simple à mettre en place est la réduction chimique d’un sel métallique en solution. Elle implique l’utilisation de trois agents essentiels : un sel métallique, un agent réducteur et un agent stabilisant. Par ce biais, la synthèse des nanoparticules peut être réalisée selon un procédé en une seule étape dit de « nucléation-croissance » ou alors selon un modèle de « croissance ensemencée ».

Dans le cas de la synthèse en une seule étape, la taille des nanoparticules peut être contrôlée précisément par la modulation du ratio molaire précurseur métallique : agent réducteur. Dans le cas de la méthode de « croissance ensemencée », les étapes de nucléation et de croissance sont dissociées, le contrôle de la taille se faisant cette fois-ci par la variation du ratio concentration en germe : concentration du précurseur métallique durant l’étape de croissance. Cette deuxième approche permet généralement d’obtenir des nano-objets mieux calibrés en taille mais nécessite une synthèse en deux étapes<sup>[6,7]</sup>.

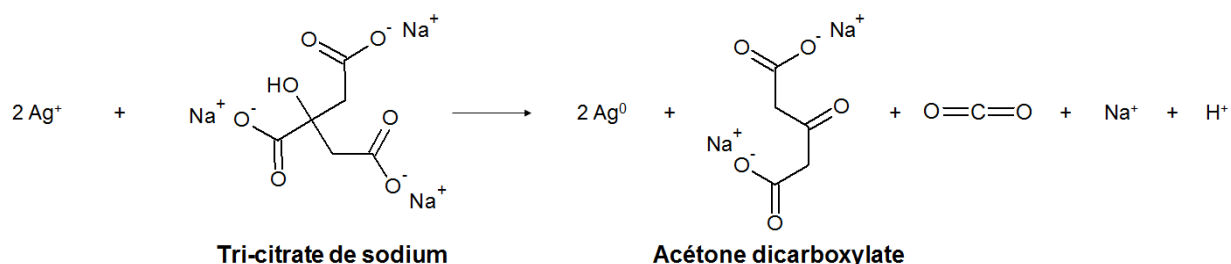
Parmi les méthodes chimiques conventionnelles en milieu organique, la plus courante est la méthode dite « polyol »<sup>[8]</sup>, réalisée à haute température, dans laquelle l’éthylène glycol utilisé est le réducteur et le polyvinylpyrrolidone (PVP) l’agent stabilisant. En milieu aqueux, la synthèse la plus largement utilisée est inspirée de la méthode « Turkevich »<sup>[9]</sup> qui met en jeu le citrate en tant que stabilisant et réducteur.

#### a. La réduction par le tri-citrate de sodium (méthode Turkevich)

En 1951, Turkevich et *al.*<sup>[9]</sup> ont réalisé la première synthèse de nanoparticules d’or sphériques en milieu aqueux utilisant la réduction de l’acide chloraurique par le tri-citrate de sodium à haute température. Les nanoparticules obtenues étaient sphériques et possédaient une distribution en taille étroite avec un diamètre

moyen de 20 nm. Plus tard, cette méthode a été mise en œuvre pour la synthèse de nanoparticules d'argent<sup>[10]</sup>. Alors qu'elle permet la synthèse de nanoparticules d'or sphériques et monodisperses, la même méthode, dans le cas de l'argent, rend le contrôle de la taille et de la forme plus délicat du fait de la réactivité de l'argent plus importante.

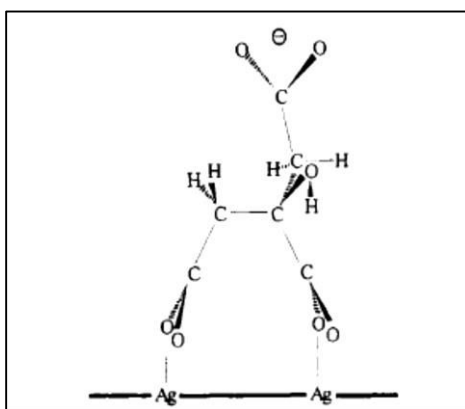
L'originalité de la méthode Turkevich réside dans le double rôle des ions citrate qui jouent à la fois le rôle d'agents réducteur et stabilisant. Le citrate étant un réducteur faible, la réaction d'oxydo-réduction nécessite d'être réalisée à température élevée. Dès lors, les ions  $\text{Ag}^+$  et le citrate réagissent en solution selon l'équation suivante :



**Figure II-1 : Réduction des ions  $\text{Ag}^+$  par le citrate**

Cette réaction conduit à la formation d'argent métal et d'acétone dicarboxylate (produit d'oxydation du citrate) qui se décompose ensuite en ion acétoacétate<sup>[11]</sup>.

L'ion citrate assure également la stabilisation en solution des nanoparticules formées. Une étude en diffusion Raman exaltée de surface (Surface-Enhanced Raman Scattering SERS) menée par Munro *et al.*<sup>[11]</sup> a permis de proposer un premier modèle d'interaction qui stipule que les ions citrate interagissent par le biais d'un groupement carboxylate terminal et d'un groupement carboxylate tertiaire. Cette configuration laisse finalement libre un des groupements carboxylates, ce qui stabilise les particules de façon électrostatique (Figure II-2). Les produits d'oxydation du citrate peuvent également s'adsorber à la surface des nanoparticules et jouer un rôle dans le processus de croissance.

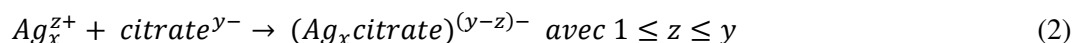
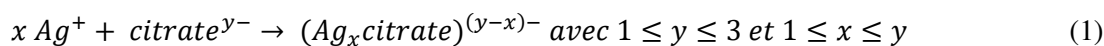


**Figure II-2 : Modèle d'interaction et d'orientation du citrate à la surface des nanoparticules d'argent proposé par Munro *et al.*<sup>[11]</sup>**

Les deux mécanismes les plus communément invoqués pour décrire la croissance des nanoparticules sont le mécanisme classique de nucléation-croissance (modèle de LaMer<sup>[12]</sup>) et le mûrissement d'Ostwald. Dans le modèle de LaMer, la croissance est initiée par la formation de germes ( $n \text{ Ag}^+ + n \text{ e}^- \rightarrow n \text{ Ag}^0 \rightarrow \text{Ag}_n^0$ ) et se poursuit par la réduction du précurseur à la surface des germes préformés ( $\text{Ag}_n^0 + \text{Ag}^+ + \text{e}^- \rightarrow \text{Ag}_{n+1}^0$ ). Le mûrissement d'Ostwald intervient lorsqu'il existe une distribution en taille des nanoparticules pour laquelle les plus grosses particules croissent au dépens des petites (transport de matière). Le mécanisme de croissance par agrégation, dans lequel les nanoparticules peuvent s'agréger et coalescer peut également se produire dans le cas où la stabilisation des nanoparticules est insuffisante ( $m\text{Ag}_n^0 \rightarrow \text{Ag}_{n.m}^0$ )<sup>[13,14]</sup>

L'ensemble de ces processus ont lieu en parallèle et dépendent de nombreux paramètres de synthèses (concentration des réactifs, pH, ...) et donc la description de la formation de nanoparticules d'argent est relativement complexe.

De plus, outre son rôle de réducteur et stabilisant, le citrate est aussi un agent complexant fort<sup>[3,15]</sup>. Il complexe à la fois les ions  $\text{Ag}^+$  mais également les différents clusters intermédiaires (comme  $\text{Ag}_2^+$  ou  $\text{Ag}_4^{2+}$ ) selon les équations générales de complexation (1) et (2) :



Le mécanisme de complexation dépend donc de l'état de protonation du citrate et par conséquent du pH du milieu (pKa citrate : 3,1, 4,8 et 6,4). De manière générale, la complexation des ions  $\text{Ag}^+$  diminue la cinétique de réduction et a donc une influence sur la taille des nanoparticules. Elle affecte également la morphologie des nanoparticules ; les clusters complexés peuvent croître par coalescence dans le cas où la charge est insuffisante pour assurer leur stabilisation.

Des travaux récents ont également montré que dans certaines conditions, le citrate pouvait s'adsorber préférentiellement sur certaines faces, favorisant alors une croissance anisotrope<sup>[16]</sup>.

Finalement, les conditions de réaction et en particulier le ratio molaire  $\text{Ag}^+ : \text{citrate}$ , ont une influence directe sur la taille et sur la forme des nanoparticules.

Dans ce travail, nous nous sommes appuyés sur le mode opératoire de Lee et Meisel<sup>[10]</sup> qui s'inspire de la méthode Turkevich et met en jeu des quantités molaires en argent et citrate quasiment équivalente.

*Mode opératoire : 250 ml d'une solution aqueuse de  $\text{AgNO}_3$  ( $5 \cdot 10^{-4}$  mol) sont chauffés sous vive agitation jusqu'à  $100^\circ\text{C}$ . Lorsque l'ébullition commence, 12 ml d'une solution de citrate à 1% (en masse) ( $4,4 \cdot 10^{-4}$  mol) sont ajoutés. Après une heure de réaction à  $100^\circ\text{C}$  sous agitation, la solution est plongée dans un bain d'eau froide pour stopper la réaction.*

La réduction des ions  $\text{Ag}^+$  se traduit par une coloration jaune-orange quelques minutes après l'ajout du réducteur dans la solution d' $\text{AgNO}_3$  incolore (Figure II-3). Sous l'effet du champ électromagnétique (la lumière), les électrons de conduction de la nanoparticule oscillent de manière collective à la surface. Lorsque la fréquence de l'onde incidente est équivalente à celle d'oscillation des électrons, le système entre en résonance ce qui induit une exaltation du champ électrique à l'origine de l'absorption de certaines longueurs d'onde dans le domaine du visible pour l'argent ; c'est le phénomène de résonance plasmon de surface. Au début de la réaction, la solution est totalement translucide ce qui signifie que l'absorption est la contribution qui domine l'extinction. Au fur et à mesure de la réaction, la coloration de la solution évolue mettant ainsi en évidence une relation directe entre la fréquence de résonance plasmon, la taille et la forme des nanoparticules. De plus, la turbidité de la solution s'intensifie, la diffusion devenant la contribution prépondérante.

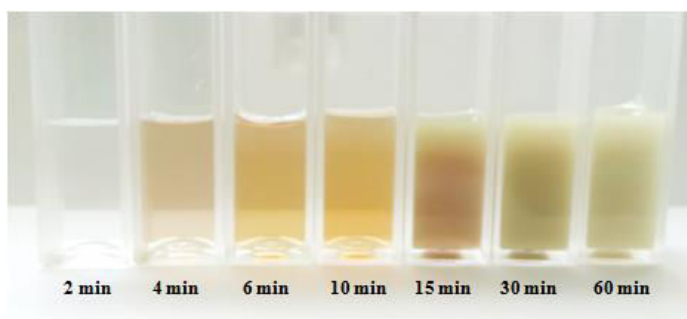


Figure II-3 : Photographie de l'évolution au cours du temps de la couleur du milieu réactionnel après ajout du citrate ( $t = 0$  min)

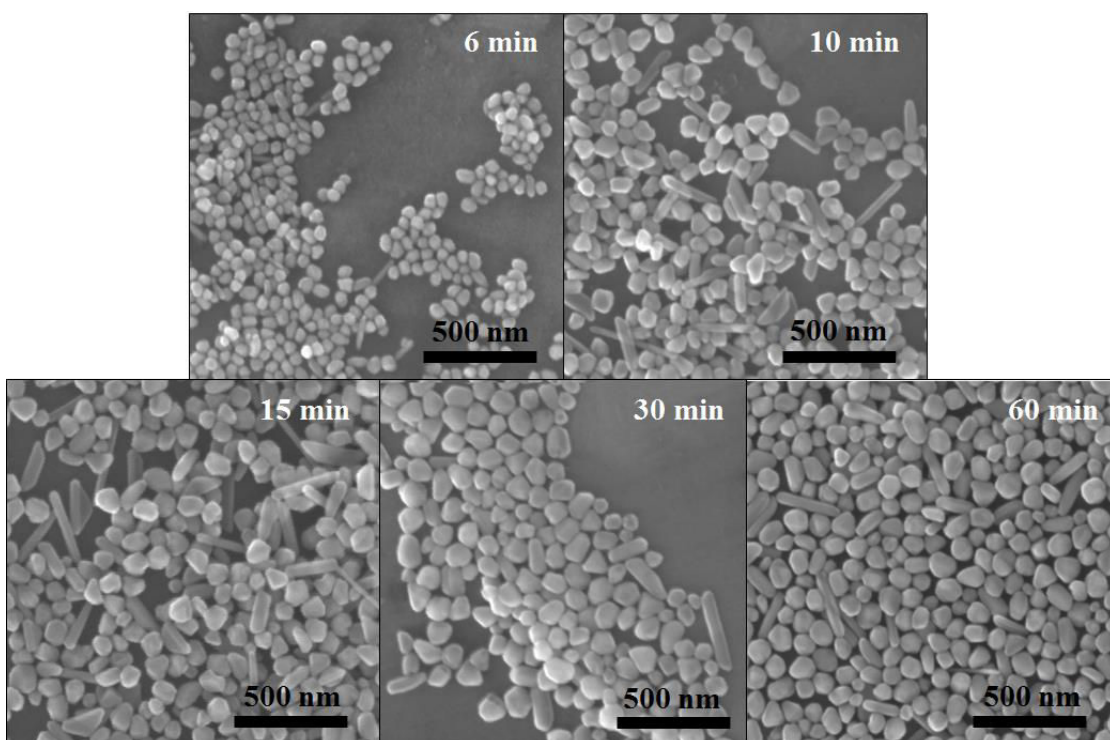


Figure II-4 : Clichés MEB des nanoparticules d'argent obtenues à différents temps de réaction

Après 6 minutes de réaction, les nanoparticules sont facilement observables par MEB (Figure II-4). Les clichés révèlent une majorité de nanoparticules quasi-sphériques caractérisées par un diamètre moyen de  $(55 \pm 10)$  nm (diamètre évalué à l'aide du logiciel Image J© sur la base d'environ 150 nanoparticules). L'étape de nucléation des nano-objets est donc relativement rapide. Nous pouvons également observer la présence de quelques nanoparticules anisotropes (bâtonnets et pyramides). Au cours de la réaction, la distribution en taille et en forme s'élargit, la cinétique de réduction étant ralentie au fur et à mesure de la consommation du citrate. Finalement après 60 minutes, le diamètre moyen des nanoparticules sphériques est de  $(95 \pm 15)$  nm. A noter également qu'en fin de réaction, le pH de la suspension est de 8,1 ; la déprotonation du citrate est donc complète ce qui favorise la stabilité des objets en suspension.

La caractérisation par microscopie électronique en transmission (MET) (réalisée sur le site d'Arkema à Lacq) (Figure II-5) met également en évidence la polycristallinité des nano-objets obtenus.

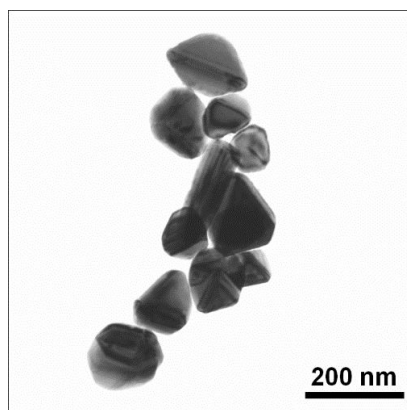


Figure II-5 : Image MET des nanoparticules d'argent à  $t = 60$  min

Les nanoparticules d'argent étant caractérisées par une résonance plasmon directement liée à la taille et à la forme des nanoparticules, des analyses en spectroscopie UV-visible ont été effectuées (Figure II-6).

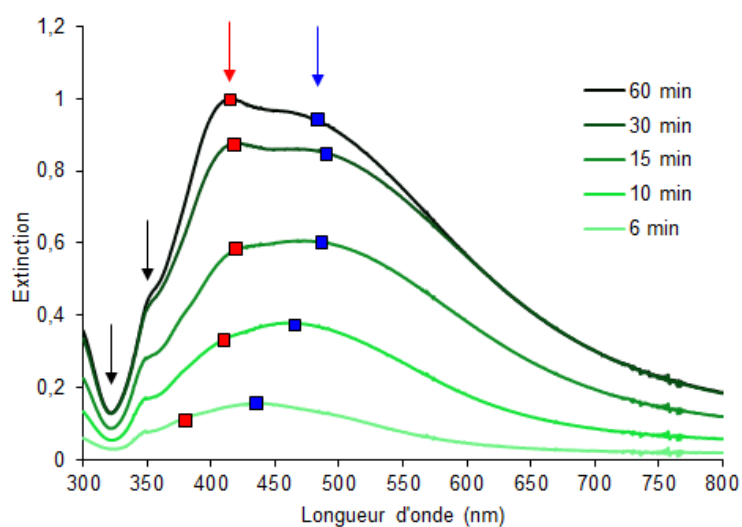


Figure II-6 : Evolution des spectres UV-visible des nanoparticules d'argent au cours de la synthèse



Chaque courbe correspond à un prélèvement réalisé à un instant  $t$  d'une même synthèse. Les spectres ont été normalisés par rapport au dernier prélèvement et traduisent l'évolution relative de l'absorption du milieu réactionnel au cours du temps.

La densité optique mesurée dépend de deux facteurs : la concentration en nanoparticules et la section efficace d'extinction des nanoparticules. Evanoff et *al.*<sup>[17,18]</sup> ont pu montrer qu'il existait une relation quasi-linéaire, pour des petites nanoparticules, entre la section efficace d'extinction et le diamètre des nanoparticules. En effet, pour des nanoparticules d'argent quasi-sphériques de diamètre compris entre 10 et 50 nm, tous les électrons de conduction du métal ressentent la même phase du champ électromagnétique incident conduisant à l'excitation de la résonance dipolaire. Lorsque la taille des nanoparticules augmente (au-delà de 50-60 nm), d'autres modes d'ordres supérieurs peuvent être excités du fait du retard de phase du champ dans la particule.

Dans notre cas, l'évolution est principalement liée à la croissance des nanoparticules. Néanmoins, la gamme de fréquence d'extinction des nanoparticules est d'autant plus grande que le temps de croissance est important. En effet, plus la taille des nanoparticules augmente et plus elles vont diffuser la lumière. De plus, la largeur des pics relativement importante traduit également une certaine dispersité en taille et en forme des nanoparticules (mise en évidence par microscopie) ce qui complique l'attribution.

Le maximum du spectre d'extinction apparaît tout d'abord à 437 nm ( $t = 6$  min) (repéré en bleu sur le spectre de la Figure II-6) et correspond à la composante dipolaire de la résonance plasmon des nanoparticules d'argent. Lorsque la taille des particules augmente, cette résonance s'intensifie et se déplace vers les grandes longueurs d'onde. Quand les nanoparticules atteignent une taille voisine de 100 nm en fin de réaction, la fréquence de résonance se situe à 465 nm en accord avec les données de la littérature pour des objets de taille similaire<sup>[6,17]</sup>. Au cours de la croissance, un deuxième pic d'extinction se développe à plus basse longueur d'onde (repéré en rouge sur le spectre) et peut être associé au mode quadrupolaire de la résonance plasmon des nanosphères d'argent. A la fin de la réaction, ce mode, repéré à 416 nm, domine le spectre d'extinction. Ce résultat, en accord avec les calculs théoriques électrodynamiques réalisés par Kelly et *al.*<sup>[19]</sup>, est caractéristique de nanoparticules sphériques de diamètre supérieur à 80 nm.

En plus de ces deux modes d'excitation de la résonance plasmon, les spectres d'extinction révèlent trois caractéristiques supplémentaires : un minimum à 320 nm qui résulte d'une transition intrabande du métal qui amortit les oscillations plasmoniques dans cette région spectrale et deux épaulements à 350 nm et 380 nm. L'épaulement à 350 nm, dont la nature exacte n'est pas encore bien déterminée, fait partie de la résonance plasmon et sa présence est prédit par les calculs théoriques s'appuyant sur le formalisme de Mie<sup>[20]</sup>. L'autre épaulement, relativement faible, localisé à 380 nm est le résultat d'un mode d'ordre supérieur de la résonance plasmon et/ou la contribution du mode transverse de nanoparticules de formes allongées présentes dans la suspension<sup>[17]</sup>. En effet, les particules anisotropes mises en évidence sur les images MEB et MET participent également à la résonance plasmon observée.

Finalement, des nanoparticules sphériques d'argent d'environ 100 nm de diamètre ont été obtenues par une approche en une seule étape utilisant le citrate comme agent réducteur et stabilisant. Ces objets sont relativement monodisperses en taille et une faible proportion d'objets anisotropes est également observable par microscopie.

## 2. Les nanoshells d'or

Comme nous l'avons vu dans le premier chapitre bibliographique, les différentes méthodes d'élaboration des nanoshells d'or, qui mettent en jeu des nanoparticules d'argent gabarits, se différencient essentiellement par la température de réaction et la nature du précurseur d'or. Nous avons donc décidé d'évaluer l'influence de ces deux paramètres sur la morphologie finale et plus précisément sur l'état de surface des nanoshells d'or.

### a. Optimisation de l'état de surface des nanoshells

Dans cette partie, les nanoparticules d'argent gabarits et le sel d'or ont été mélangés en quantité stœchiométrique, en accord avec les modes opératoires classiquement proposés dans la littérature. La modulation de certains paramètres de synthèse nous a permis de considérer trois approches différentes.

*Mode opératoire :* Globalement, la synthèse consiste à ajouter goutte à goutte la solution de précurseur d'or notée solution A à la suspension de nanoparticules d'argent notée solution B ( $n=1,4 \cdot 10^{-5}$  mol) à une température T. La suspension de nanoparticules est conservée sous agitation pendant plusieurs heures. Pour les synthèses n°1 et 2, le sel d'or utilisé est une solution aqueuse d'acide chloroaurique  $\text{HAuCl}_4$  à 0,2% ( $\text{pH} = 2,9$ ).

La synthèse n°1 est conduite à température ambiante ( $25^\circ\text{C}$ ). Dans le cas de la synthèse n°2, la réaction étant réalisée à  $100^\circ\text{C}$  (Tableau II-1), les solutions A et B sont préalablement portées à  $100^\circ\text{C}$ . Après l'ajout du sel d'or à la solution de nanoparticules d'argent, la solution est conservée à  $100^\circ\text{C}$  quelques minutes jusqu'à ce que la couleur de la solution n'évolue plus.

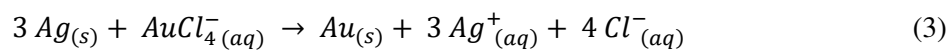
Pour la synthèse n°3, la solution d'acide chloroaurique est modifiée par l'ajout de quelques gouttes d'une solution d'hydroxyde de sodium à 2 mol/l jusqu'à ce que le pH soit environ égal à 5 ( $n(\text{NaOH}) \approx 2,2 \cdot 10^{-4}$  mol pour 15 ml d' $\text{HAuCl}_4$  à 0,2 %). Cet ajout conduit à la formation de complexes du type  $\text{HAuCl}_{4-x}\text{OH}_x$ . Pour préparer la solution A, il suffit de prélever 0,938 ml ( $n = 4,7 \cdot 10^{-6}$  mol) de la solution de précurseur d'or considérée (Tableau II-1) et de compléter avec de l'eau distillée jusqu'à  $V = 7,5$  ml. Cette synthèse a également nécessité l'ajout d'un nouvel agent stabilisant à la suspension de nanoparticules d'argent : le poly(vinylpyrrolidone) (PVP).

**Tableau II-1 : Récapitulatif des protocoles de synthèses des nanoshells d'or pour l'optimisation de la morphologie**

Synthèse	Température de réaction (°C)	Composition solution A	Composition solution B
n°1	25	0,938 ml HAuCl <sub>4</sub> (0,2%, pH = 2,9) + 6,5 ml H <sub>2</sub> O	7,5 ml d'une suspension de NPs d'Ag
n°2	100	0,938 ml HAuCl <sub>4</sub> (0,2%, pH = 2,9) + 6,5 ml H <sub>2</sub> O	7,5 ml d'une suspension de NPs d'Ag
n°3	25	0,938 ml HAuCl <sub>4-x</sub> OH <sub>x</sub> (0,2%, pH ≈ 5)+ 6,5 ml H <sub>2</sub> O	7,5 ml d'une suspension de NPs d'Ag + 2 ml PVP (1% (en masse))

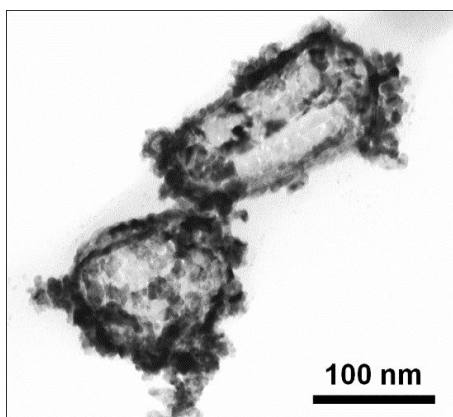
### i. Effet de la température de réaction

Le potentiel standard du couple  $AuCl_4^-/Au$  (0,99 V/ENH) étant supérieur à celui du couple  $Ag^+/Ag$  (0,80 V/ENH), les nanoparticules d'argent peuvent être oxydées en solution lors de l'ajout de la solution d'acide chloraurique selon la réaction (3) :



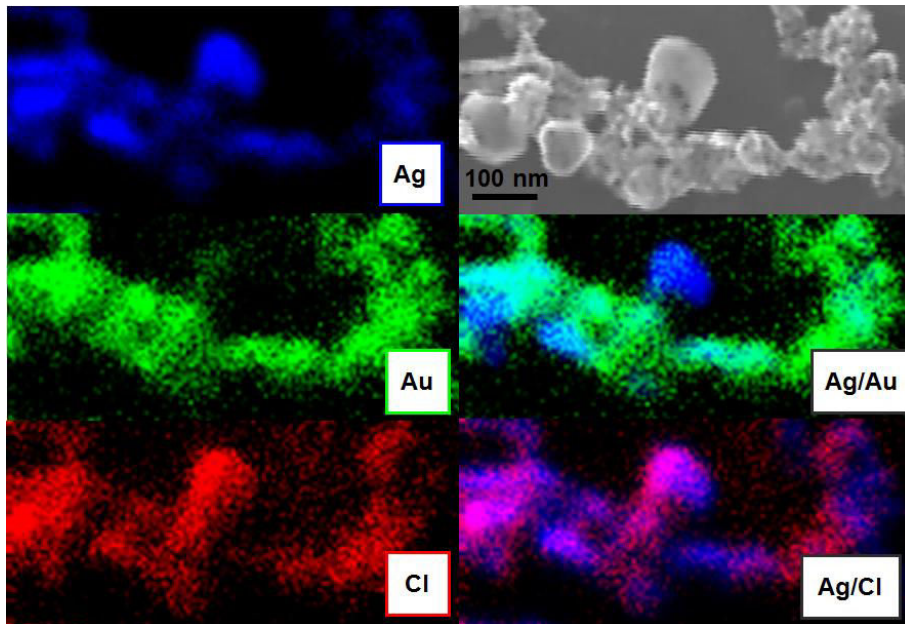
La température de réaction est un paramètre clé dans l'obtention de nanoshells avec une surface et des parois homogènes. En effet, la réaction de remplacement galvanique conduit à la formation d'AgCl dont la constante de solubilité est relativement faible en solution aqueuse à 20°C ( $\approx 1,8 \times 10^{-10}$ )<sup>[21]</sup>. Ainsi, la formation de la coquille d'or peut être impactée par la précipitation simultanée d'AgCl.

En effet, lorsque la réaction d'oxydoréduction est effectuée à température ambiante, les nanoparticules sont très agglomérées et présentent une surface non uniforme (Figure II-7).



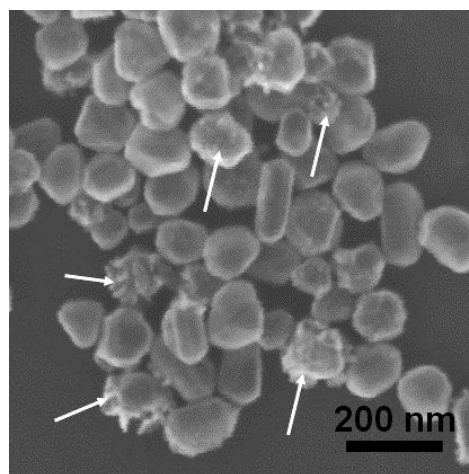
**Figure II-7 : Cliché MET des nanoshells synthétisées à 25°C (synthèse n°1)**

Les analyses en microscopie Auger (SAM Scanning Auger Microscopy) indiquent que la rugosité surface se compose principalement d'Ag, d'Or et de Cl (Figure II-8). La formation simultanée d'AgCl solide et d'Or perturbe le dépôt des atomes d'or à la surface des gabarits d'argent.



**Figure II-8 : Image MEB et cartographies Auger associées d'un agglomérat de nanoshells d'or synthétisées à 25 °C (synthèse n°1) - Superposition en couleurs RGB des éléments Cl (rouge), Au (vert) et Ag (bleu)**

Pour cette raison, la réaction s'effectue généralement à 100°C afin d'augmenter la constante de solubilité de l'AgCl et éviter toute contamination de surface. De plus, une température plus importante permet d'augmenter la diffusion des espèces et favoriserait ainsi la formation de l'alliage d'après Sun et Xia<sup>[22]</sup>. Lorsque la synthèse est réalisée à 100 °C, les clichés MEB (Figure II-9) révèlent la formation de nanostructures creuses individualisées. Cependant, nous pouvons remarquer que la surface de quelques nanoshells présente encore des aspérités de surface (flèches blanches sur la Figure II-9), pouvant être associées à la précipitation d'AgCl à la surface des nanoparticules.

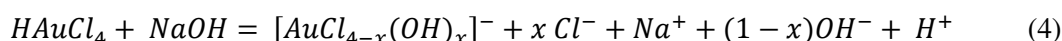


**Figure II-9 : Image MEB des nanoshells d'or synthétisées à 100°C**

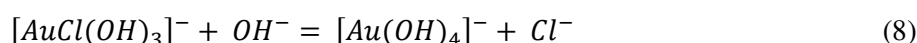
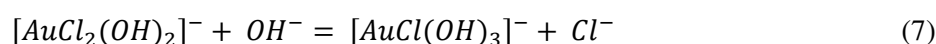
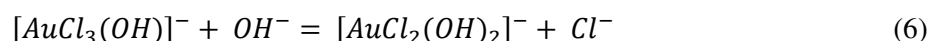
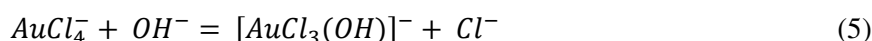
## ii. Effet de la nature du précurseur d'or

Vongsavat et *al.*<sup>[23]</sup> ont montré que le sel d'or du type  $Au(OH)_4^-$  ( $HAuCl_4$ ,  $K_2CO_3$ ) permettait d'obtenir, à température ambiante, des nanostructures partiellement creuses sans contamination de surface apparente. Nous nous sommes donc intéressés à l'influence de la nature du précurseur d'or sur la réaction.

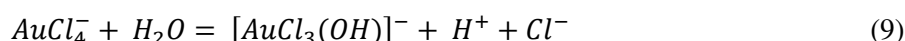
La spéciation du précurseur d'or a été modifiée par addition de soude conduisant à la substitution des ions chlorures par des ions hydroxydes en milieu aqueux selon la réaction :



Lors de l'ajout de soude, le complexe s'hydrolyse en plusieurs étapes selon le pH :

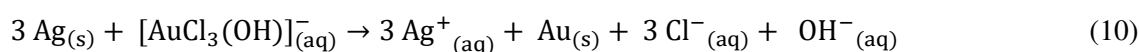


Il est assez délicat de déterminer précisément la nature des différents complexes d'or présents en solution à l'issue de l'ajout d'une solution d'hydroxyde de sodium. En effet, les différentes études menées sur la spéciation du complexe d'or  $AuCl_4^-$  en fonction du pH sont difficilement comparables du fait des concentrations initiales en sel d'or différentes. Murphy et *al.*<sup>[24]</sup> ont pu montrer par spectroscopie Raman que plus la concentration en or est faible, plus l'hydrolyse a lieu à des pH bas. Ils ont également mis en évidence qu'à faible concentration ( $< 0,001$  M), la dilution du sel d'or  $HAuCl_4$  dans l'eau conduit à la formation de l'espèce  $[AuCl_3(OH)]^-$  selon l'équilibre :

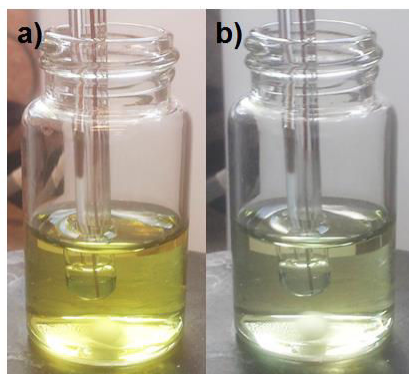


Huang et *al.*<sup>[25]</sup> ont également mis en évidence ce résultat par chromatographie en phase liquide.

Dans les différentes synthèses effectuées, la concentration initiale de la solution d'or utilisée pour la réalisation de la solution A est égale à  $6,25 \cdot 10^{-4}$  mol/l ce qui signifie que dans le cas de la réaction où le sel d'or n'a pas été modifié (synthèses 1 et 2), ce n'est pas l'espèce  $AuCl_4^-$  qui réagit mais le complexe  $[AuCl_3(OH)]^-$ . La réaction s'écrit donc :



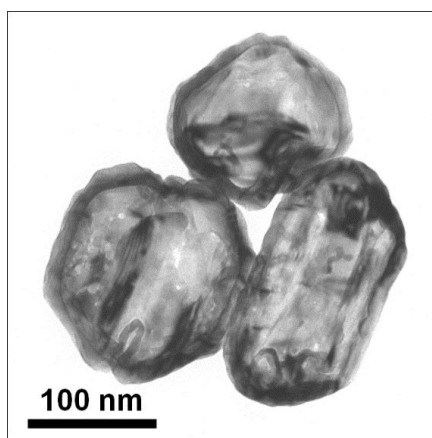
Lors de la modification de la spéciation de ce complexe pour la réalisation de la synthèse n°3, la substitution d'ions chlorures par des ions hydroxydes dans le complexe se traduit par la décoloration de la solution d'acide chloroaurique (jaune) au fur et à mesure de l'ajout de soude (Figure II-10).



**Figure II-10 : Photographies des solutions d'or de concentration  $6,35 \cdot 10^{-4}$  M : a) pH = 2,9 et b) pH = 5**

Cette substitution d'ions chlorures par des ions hydroxydes entraîne une diminution du potentiel d'oxydoréduction et par conséquent une diminution de la réactivité du complexe. La réaction mise en jeu dans la synthèse n°3 est par conséquent plus lente.

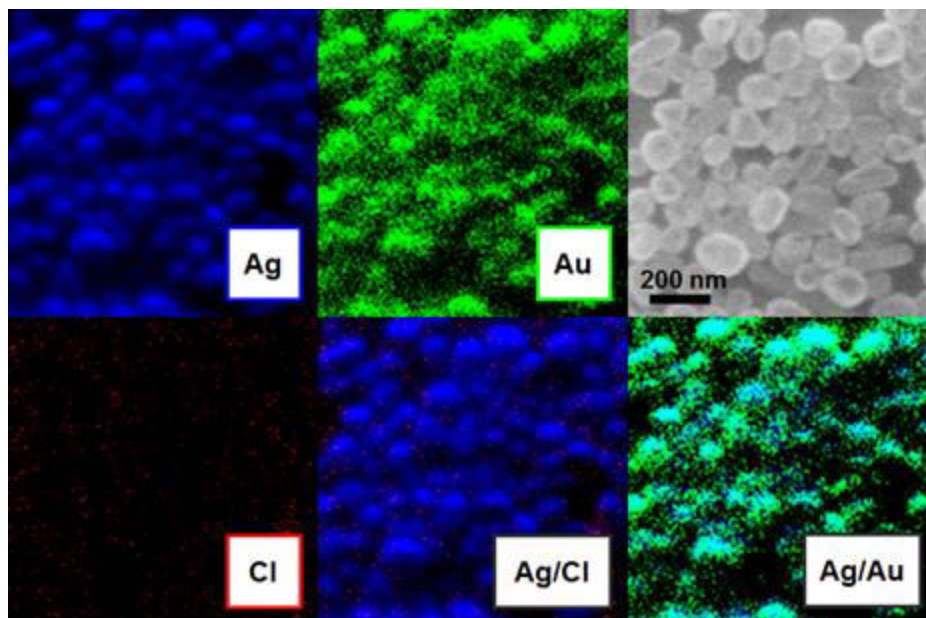
Néanmoins, la modification de la spéciation du complexe d'or conduit, comme le montre les images MET (Figure II-11), à la formation de nanoshells d'or relativement creuse et sans aucune rugosité de surface.



**Figure II-11 : Cliché MET des nanoshells synthétisées à partir du précurseur  $\text{H[AuCl}_{4-x}\text{OH}_x]$  (pH = 5, synthèse n°3)**

En effet, la comparaison avec le cliché MET des nanoshells synthétisées à partir d' $\text{HAuCl}_4$  (synthèse n°1, Figure II-7) permet d'affirmer que la surface est mieux définie et donc de proposer qu'elle n'est pas contaminée par l' $\text{AgCl}$ .

Cette hypothèse est confirmée par les cartographies chimiques enregistrées en SAM (Figure II-12) qui mettent en évidence une surface constituée exclusivement d'argent et d'or. Par conséquent la modification de la spéciation du précurseur d'or a une influence importante sur la non-précipitation d'AgCl à la surface des nanoshells.



**Figure II-12 : Image MEB et cartographies Auger associées d'un agglomérat de nanoshells d'or synthétisées avec le précurseur  $\text{HAuCl}_{4-x}\text{OH}_x$  (pH = 5) (synthèse n°3) - Superposition en couleurs RGB des éléments Cl (rouge), Au (vert) et Ag (bleu)**

Vongsavat et *al.*<sup>[23]</sup> avaient déjà pu remarquer que le pH de la solution jouait un rôle important dans le contrôle de la morphologie des nanoparticules mais sans comprendre réellement le mécanisme. Une seule étude concerne l'influence du pH sur la réaction de remplacement galvanique, où les auteurs justifient la non-précipitation d'AgCl (à la surface ou dans le milieu) par un excès d'ions chlorures en solution conduisant à la formation de l'espèce  $\text{AgCl}_4^-$  soluble dans le milieu ( $\text{AgCl}_{(s)} + 3 \text{Cl}^-_{(aq)} \rightarrow \text{AgCl}_4^-_{(aq)}$ <sup>[26]</sup>).

Dans notre cas, plusieurs heures après la réaction, un dépôt blanc solide correspondant à de l'AgCl est visible au fond du contenant. Afin d'expliquer pourquoi la modification du sel d'or prévient la précipitation d'AgCl à la surface des nanoshells, nous pouvons proposer l'hypothèse que le potentiel d'oxydo-réduction des complexes d'or en solution étant plus faible, la réaction est beaucoup plus lente et donc la formation d'AgCl également, ce qui prévient sa précipitation à la surface des nanoshells.

Par ailleurs, cette synthèse n°3 a nécessité l'utilisation d'un nouvel agent stabilisant polymérique : le polyvinylpyrrolidone (PVP). Sa présence à la surface des nanoparticules doit également minimiser la précipitation d'AgCl à la surface.

Après avoir optimisé l'état de surface des nanoshells d'or, essentiel pour la formation de la coquille de silice, nous nous sommes intéressés à la modulation des propriétés optiques des nanoparticules, directement dépendante de la morphologie.

### b. Modulation des propriétés optiques

Sun et *al.*<sup>[22]</sup> ont montré que la réaction galvanique met en jeu deux processus : l'« alloying » et le « dealloying » qui dictent la morphologie des nanoparticules formées et donc leurs propriétés optiques.

Le contrôle de la réaction se fait directement par la quantité de sel d'or qui réagit avec les nanoparticules d'argent. Pour cela, nous avons décidé de faire varier également le volume de sel d'or ajouté dans la synthèse n°3.

*Mode opératoire :* La synthèse consiste à ajouter goutte à goutte la solution de précurseur d'or notée solution A à la suspension de nanoparticules d'argent notée solution B.

Pour préparer la solution A, il suffit de prélever  $x$  ml (selon la concentration désirée) de la solution de précurseur d'or  $\text{HAuCl}_{4-x}\text{OH}_x$  (~0,2 %,  $\text{pH} \approx 5$ ) et de compléter avec de l'eau distillée jusqu'à  $V = 7,5$  ml (Tableau II-2).

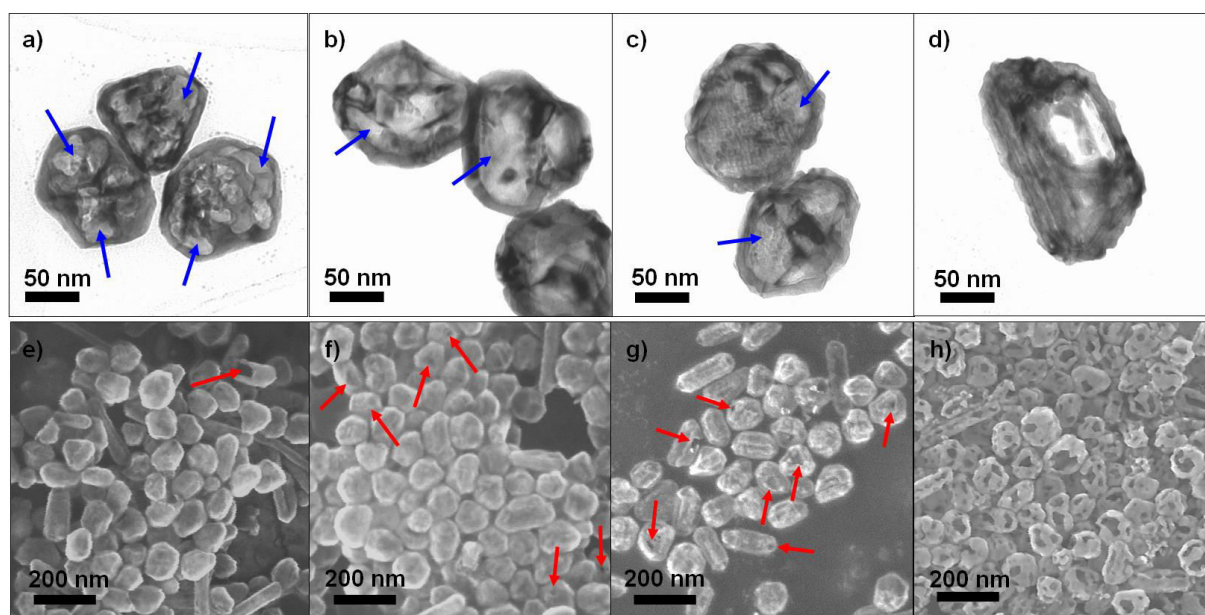
Pour la solution B, 7,5 ml de la suspension de NPs d'argent ( $n = 1,4 \cdot 10^{-5}$  mol) sont soniqués quelques minutes avec 2 ml d'une solution de PVP (1%) Après l'ajout de A dans B, la suspension de nanoparticules est maintenue sous agitation pendant plusieurs heures.

**Tableau II-2 : Récapitulatif des synthèses notées NS(X), X désignant le ratio molaire Ag/Au, pour la modulation des propriétés optiques**

Indexation	Volume solution $\text{HAuCl}_{4-x}\text{OH}_x$ (~0,2 %, $\text{pH} \approx 5$ ) (ml)	Rapport molaire $n_{\text{Ag}}/n_{\text{Au}}$
NS (8)	0,351	8
NS (5)	0,562	5
NS (3)	0,938	3
NS (1)	2,813	1

Dans un premier temps, la microscopie électronique à balayage et la microscopie électronique en transmission nous ont permis de suivre les évolutions morphologiques et structurales à différents stades de la réaction de remplacement galvanique. La Figure II-13 présente les clichés MEB et MET des gabarits d'argent ayant réagi avec différents volumes de précurseur d'or.





**Figure II-13 : Images de microscopie électronique (MET, MEB) des nanoshells NS(8) (a, e), NS(5) (b, f), NS(3) (c, g) et NS(1) (d, h)**

Quel que soit le volume de précurseur d'or ajouté, la structure creuse des nanoshells se différencie de la structure dense des nanoparticules d'argent et le phénomène augmente avec le ratio molaire Ag/Au qui diminue. Pour un rapport Ag/Au de 8, le cœur des nanoparticules est constitué de petites cavités (comme indiqué sur Figure II-13.a par les flèches) indiquant le début de l'oxydation de l'argent caractérisée par l'érosion des nanoparticules gabarits. L'épaisseur des murs est d'environ  $(8 \pm 5)$  nm. Au cours de l'érosion, les vides sont mieux définis en particulier pour les rapports Ag/Au de 5 et 3 (Figure II-13.b, c). Dans ces deux cas, l'épaisseur de la coquille est estimée à  $(12 \pm 5)$  nm. Lorsque la concentration en or devient trop importante (cas de la synthèse NS(1)), plusieurs trous relativement larges sont observés (Figure II-13.d, h) sur les nanoparticules qui rendent compte d'une déstructuration de la coquille métallique.

Les clichés MEB mettent également en évidence la formation de petits trous à la surface des nanoparticules (repérés par les flèches rouges sur les Figure II-13.e-g) en accord avec d'autres travaux de la littérature <sup>[22,23]</sup>. Cependant, ces trous formés lors du processus de remplacement galvanique peuvent correspondre à deux phénomènes.

D'une part, Sun et *al.*<sup>[22]</sup> et Vongsavat et *al.*<sup>[23]</sup> s'accordent pour suggérer qu'au début du processus, un petit trou se forme à la surface de chaque nanoparticule et constitue le seul site de réaction mais également de diffusion des espèces oxydées ( $\text{Ag}^+$ ) puisque l'or se dépose à la surface des gabarits. Au cours de la réaction, la taille de ce trou augmente et dans un même temps les nanoparticules se creusent. Lorsque la concentration en or devient plus importante, le vide au cœur des nanoparticules atteint sa taille maximale et chaque trou à la surface est comblé conduisant à la formation d'une nanostructure avec des murs uniformes et homogènes.

D'autre part, selon Sun et Xia<sup>[22]</sup>, tout au long de la réaction d'oxydo-réduction il se forme également de manière concomitante un alliage Ag-Au (température de synthèse de  $100^\circ\text{C}$ ). Par la suite, lors de l'étape du

« dealloying » (corrosion sélective), de nombreuses vacances se créent qui lorsque la concentration en or devient trop importante coalescent générant des petits trous à la surface des nanoparticules. La taille de ces trous augmente peu à peu pour finalement conduire à la fragmentation des nanoshells<sup>[22]</sup>.

Finalement ces trous apparaissent soit au début de la réaction, soit lors du « dealloying » si initialement il y a formation de l'alliage.

Dans les travaux de Vongsavat et *al.*<sup>[23]</sup> les nanoshells sont synthétisées à température ambiante en utilisant le complexe  $Au(OH)_4^-$  comme précurseur d'or. Leur synthèse conduit à la formation de nanoparticules partiellement creuses, même pour des quantités d'or importante. En effet, des analyses EDX ont mis en évidence qu'au-delà d'un certain volume d'or, le rapport élémentaire Ag/Au n'évolue plus. Dans ces conditions, lorsque le trou généré au début de la réaction disparaît du fait de la croissance du dépôt d'or, la réaction s'arrête. Implicitement cela signifie donc qu'il n'y a plus d'argent disponible pour la réaction d'oxydo-réduction et donc que les nanostructures ne sont pas constituées d'un alliage.

Dans notre cas, d'après les images MET, il semblerait que les nanostructures formées à l'issue de la synthèse NS(5) possèdent des murs uniformes ainsi qu'un cœur relativement creux (Figure II-13-b). Au-delà, des trous sont visibles et tendent à s'élargir lorsque la quantité d'or augmente ce qui est donc caractéristique d'un mécanisme de « dealloying ». Par conséquent, les conditions mises en jeu semblent conduire à la formation d'un alliage.

La réaction de remplacement galvanique peut être également suivie par Spectrophotométrie UV-visible, la fréquence plasmon des nanoparticules étant directement reliée à leur morphologie. Les spectres enregistrés sont présentés dans la Figure II-14.

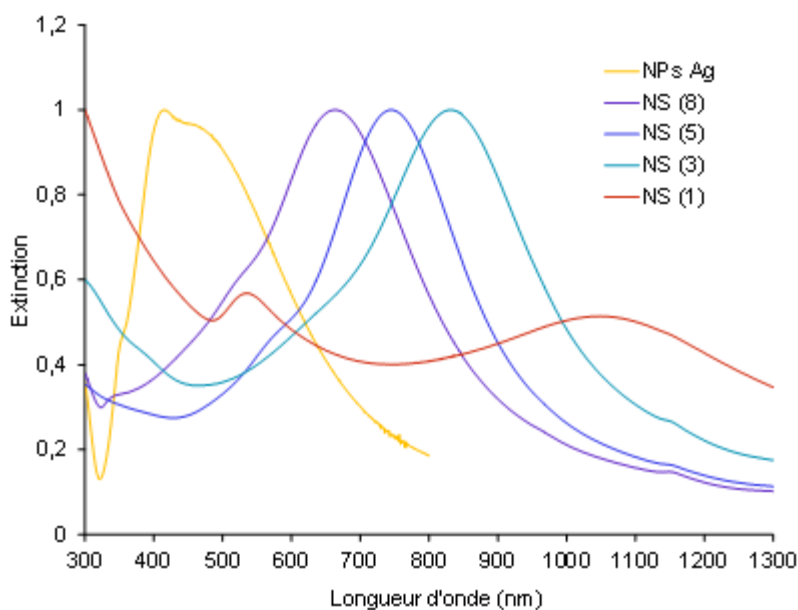


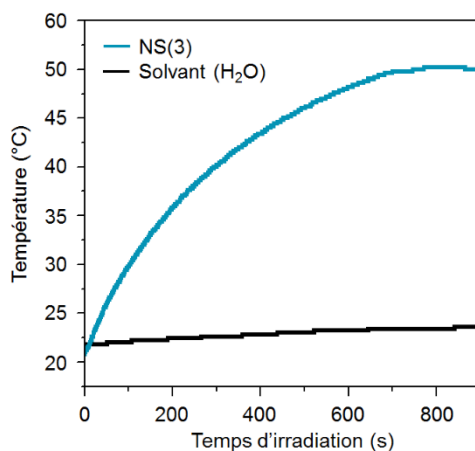
Figure II-14 : Spectres UV-visible des nanoparticules d'argent et des nanoshells synthétisés

Comme discuté précédemment, le mode dipolaire de la résonance plasmon des nanoparticules d'argent est localisé à 465 nm. Dans le cas des nanoshells, pour les rapports Ag/Au allant de 8 à 3, les spectres sont caractérisés par un seul maximum d'absorption situé dans la zone du visible-proche IR. Les longueurs d'onde d'absorption associées à ces trois échantillons sont 667 nm, 748 nm et 836 nm pour respectivement Ag/Au = 8, 5 et 3 indiquant donc un déplacement important de la fréquence de résonance plasmon vers le rouge lorsque la quantité de sel d'or augmente. D'après les travaux d'Halas et *al.*<sup>[27]</sup>, la résonance plasmon de nanoshells d'or synthétisées à partir de nanoparticules de SiO<sub>2</sub> est d'autant plus déplacée vers le rouge que le rapport diamètre du cœur (SiO<sub>2</sub>) : épaisseur de la coquille (Au) est grand. Dans notre cas, le diamètre du cœur et l'épaisseur de la coquille évoluent continuellement lors de la formation des nanoshells du fait de la concomitance de l'érosion progressive du cœur et de la réduction/déposition de l'or. Considérant la stœchiométrie de la réaction d'oxydoréduction, l'érosion du cœur c'est-à-dire l'augmentation du diamètre du cœur (oxydation de l'argent) se fait plus rapidement que l'augmentation de l'épaisseur de la coquille d'or puisqu'un atome d'or est formé au détriment de trois atomes d'argent. De ce fait, le rapport diamètre du cœur (creux) : épaisseur de la coquille (Au) augmente tout au long de la formation des nanoshells conduisant donc à un déplacement de la fréquence plasmon vers le proche infrarouge. De plus, ces résultats sont en accord avec ceux de Vongsavat et *al.*<sup>[23]</sup> et Sun et *al.*<sup>[22]</sup> qui ont montré un déplacement important de la fréquence plasmon vers le proche IR lorsque la quantité d'or utilisé dans la réaction de remplacement galvanique augmente.

Sun et *al.*<sup>[22]</sup> ont également mis en évidence que lorsque la quantité utilisée devient trop importante, le maximum d'absorption se déplace vers l'UV du fait de la déstructuration des nanoshells comme nous pouvons le voir pour le rapport Ag/Au = 1. Pour cette synthèse, deux maxima sont visibles sur le spectre. Le premier est localisé dans la zone du proche IR à 1060 nm est en accord avec la morphologie poreuse des nanoparticules. Le deuxième maximum situé dans la région du visible à 540 nm correspond à la signature de petites nanoparticules d'or résultant de la fragmentation des nanoshells.

Finalement, il est donc possible de moduler, via la concentration en sel d'or, les propriétés optiques mais également la morphologie des nanoshells. L'objectif premier était d'adapter la résonance plasmon des nanoshells à la fenêtre biologique (650-900 nm) dans une perspective d'application biomédicale. Afin de pouvoir exploiter les propriétés photothermiques de ces nanoparticules, le laboratoire s'est équipé d'un laser de longueur d'onde 808 nm. Considérant les fréquences de résonance plasmon des nanoshells synthétisées, la synthèse NS(3) conduisant à des nanoshells présentant un maximum autour de 808 nm a été retenue pour la suite de ce travail.

L'évolution de la température d'une solution de NS(3) soumise à une irradiation laser a été suivie au cours du temps (Figure II-15).



**Figure II-15 : Evolution de la température d'une solution de nanoparticules NS(3) (bleu) et d'une solution aqueuse (noir) sous irradiation laser (808 nm, 7 W/cm<sup>2</sup>)**

Tout d'abord, nous pouvons remarquer que l'irradiation laser ne fait varier que très légèrement la température d'une solution aqueuse, son effet est donc négligeable. Concernant la suspension de nanoshells, l'exposition au laser conduit à une augmentation exponentielle de la température de la solution avec le temps d'irradiation jusqu'à finalement atteindre un plateau autour de 50 °C après 15 minutes d'exposition. Cette température peut être modulée selon la concentration en nanoparticules. Ce résultat met en évidence le potentiel des nanoshells synthétisées pour des applications en photothermie.

Dans la suite de ce travail, la composition chimique de ces nanostructures est discutée. L'utilisation de deux techniques de caractérisation de surface que sont l'XPS et l'AES est susceptible d'apporter des réponses sur la formation ou non d'un alliage dans les conditions de synthèse utilisées.

## II. Caractérisation physico-chimique de surface des nanoparticules

### 1. Spectroscopie Photoélectronique à Rayonnement X

#### a. Principe général

Les principes fondamentaux de la Spectroscopie Photoélectronique à rayonnement X sont détaillés en Annexe (Annexe A.2.i p.210). Les notions essentielles à la discussion de nos résultats sont rappelées ci-après.

La Spectroscopie Photoélectronique à rayonnement X (XPS pour X-Ray Photoelectron Spectroscopy), appelée aussi ESCA (Electron Spectroscopy for Chemical Analysis) est une technique d'analyse d'extrême surface (de 5 à 10 nm) permettant d'explorer la structure chimique et électronique des matériaux. Elle est basée sur l'effet photoélectrique qui consiste en l'éjection d'un électron de cœur ou de valence d'un échantillon soumis à un rayonnement de photons X d'énergie  $h\nu$  (Figure II-16.a). Les photoélectrons émis avec une énergie cinétique spécifique  $E_{\text{cin}}$  sont alors collectés et analysés. L'application de la loi de conservation de l'énergie

permet de relier l'énergie cinétique  $E_{cin}$  à l'énergie de liaison  $E_L$  ou potentiel d'ionisation du photoélectron  $k$  par la relation :

$$h\nu + E_i^k(N) = E_f^k(N-1) + E_{cin}(k) \quad (11)$$

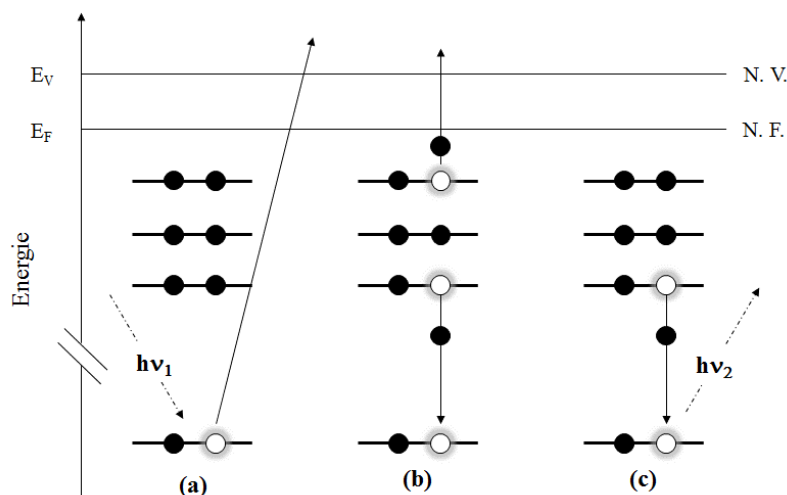
$$E_L(k) = E_f^k(N-1) - E_i^k(N) = h\nu - E_{cin}(k) \quad (12)$$

$E_i$  et  $E_f$  étant les énergies du système dans les états fondamentaux initial (neutre à  $N$  électrons) et final (ionisé à  $N-1$  électrons).

Le principe de la mesure consiste donc à déterminer les énergies cinétiques des photoélectrons émis pour en déduire les énergies de liaison. Généralement, on distingue les potentiels d'ionisation de cœur ( $\approx 30$  à  $1000$  eV) et de valence ( $\approx 0$  à  $30$  eV).

Après la photoionisation, le système final peut se relaxer selon deux processus complémentaires :

- La fluorescence X : un électron d'une orbitale plus externe comble la vacance laissée par le photoélectron et cette désexcitation se traduit par l'émission de rayons X (Figure II-16.c)
- L'effet Auger : un électron d'une orbitale plus externe comble la vacance laissée par le photoélectron et communique l'énergie libérée à un autre électron plus externe, éjecté à son tour de l'ion (Figure II-16.b)



**Figure II-16 : Processus de photoionisation et de désexcitation de l'ion : a) photoionisation, b) désexcitation par effet Auger et c) désexcitation par fluorescence**

Les spectres XPS se présentent sous la forme de raies qui émergent d'un fond continu résultant des collisions inélastiques subies par certains électrons lors de leur trajet dans le solide. On distingue généralement les pics de cœur ( $E_L \approx 30$  à  $1000$  eV) qui témoignent, considérant le libre parcours moyen  $\lambda$  des photoélectrons dans le

solide (Annexe), plutôt de la chimie d'extrême surface, des bandes de valence ( $E_L \approx 0$  à 30 eV) qui sont plus représentatives du volume.

L'intérêt de la détermination des énergies de liaison des pics de cœur réside dans la sensibilité de ces grandeurs à l'environnement chimique des atomes. La notion de déplacement chimique (ou variation de l'énergie de liaison par rapport à une référence donnée) peut être appréhendée sur la base de propriétés liées à l'état initial en utilisant les modèles à potentiel électrostatique.

En effet, dans une première approximation, il est possible de ne considérer que les propriétés de l'état initial, à savoir les variations d'énergie des orbitales entraînées par les transferts des électrons de valence lors de l'établissement des liaisons chimiques. Dans ce cas, les déplacements des niveaux de cœur sont dus aux variations de la population des électrons de valence. Dans ce cadre, l'expression commune pour traduire le déplacement chimique du niveau d'un atome A porteur d'une charge  $q_A \neq 0$  (en interaction avec des atomes B) par rapport à sa position dans un atome A libre de charge nulle est :

$$\Delta E_L = kq_A + e^2 \sum_{B \neq A} \frac{q_B}{r_{AB}} \quad (13)$$

où  $r_{AB}$  est la distance entre l'électron de cœur de l'atome A et celui de l'atome B voisin

- Le premier terme traduit la variation d'énergie potentielle électrostatique ressentie au niveau du cœur suite à une modification de la distribution électronique dans les couches de valence de l'atome A.
- Le deuxième terme représente la différence dans le potentiel extra-atomique créé par les atomes voisins de l'atome A que l'on assimile à des charges ponctuelles

Dans cette approximation, on considère que les orbitales sont gelées c'est-à-dire que la distribution spatiale des orbitales reste inchangée suite à la photoionisation. Ainsi, l'énergie de liaison correspond à la valeur opposée de l'énergie de l'orbitale dans l'état fondamental dont l'électron est extrait et par conséquent :

$$E_L(j) = -\varepsilon_j \quad (14)$$

En réalité, il faut tenir compte de relaxation du système c'est-à-dire la réorganisation des niveaux électroniques qui vise à diminuer l'énergie de l'état ionisé formé suite à la photoionisation. Cet effet d'état final intervient donc dans la détermination du déplacement chimique :

$$E_L(j) = -\varepsilon_j + E_R \quad (15)$$

avec  $E_R$  l'énergie de relaxation

Les deux contributions peuvent varier en sens opposé et se neutraliser dans certains cas avec un déplacement chimique nul ou même inverse par rapport à celui attendu en considérant le modèle à potentiel électrostatique.

De façon globale et sur la base d'échantillons de référence (« standards »), l'analyse en haute résolution des pics de cœur, qui constitue le mode d'exploitation principal de la technique XPS, fournit des informations sur l'environnement chimique des atomes à l'échelle locale, les degrés d'oxydation, les transferts électroniques.

Cependant, l'étude de l'intensité des pics de cœur offre également la possibilité d'une analyse semi-quantitative des éléments constituant la surface analysée. Elle nécessite la prise en compte de deux facteurs qui dépendent

du composé étudié ainsi que de l'appareillage utilisé : la section efficace de photoionisation  $\sigma$  et les énergies cinétiques des photoélectrons associées.

Il convient de souligner que lors du phénomène de photoionisation, des processus multiélectroniques peuvent se produire conduisant à la formation d'états ionisés excités, en plus de l'état fondamental ionisé qui est associé au pic primaire (généralement le plus intense) et donc générer des structures additionnelles. Ces « sondes » complémentaires peuvent fournir des informations supplémentaires dans l'analyse des échantillons.

- Les structures à multiplets de spin que l'on retrouve dans le cas des composés paramagnétiques dans lesquels la photoémission d'un électron peut conduire à plusieurs états finals suite aux couplages entre les électrons non-appariés de valence et l'électron de cœur non-apparié résultant de la photoémission
- Les pics satellites qui sont des pics secondaires de photoionisation qui se révèlent dans certains cas plus pertinents que les déplacements chimiques pour différencier les degrés d'oxydation
- Les pics Auger qui sont associés au processus de désexcitation qui suit la photoionisation primaire. Contrairement aux pics de photoionisation, l'énergie cinétique des raies Auger est indépendante de l'énergie des photons incidents  $h\nu$ . On définit cependant une énergie de liaison apparente  $E_L^{app}$  à partir de la loi de conservation de l'énergie (cf. II.1.a), celle-ci dépendant de l'énergie  $h\nu$  des photons dans le cas des raies Auger. Leur déplacement chimique peut être plus important que celui des raies XPS primaires en raison de la formation d'un état final doublement ionisé, ce dernier pouvant être plus fortement affecté par les phénomènes de relaxation que l'état final simplement ionisé issu de la photoionisation primaire.

### **b. Caractérisation XPS de nanoparticules**

Ce paragraphe a vocation de présenter de façon synthétique quelques exemples issus de la littérature illustrant des spécificités propres à l'analyse XPS des nanoparticules. Même si elle ne présente pas la résolution spatiale pour analyser les nano-objets de façon individuelle, l'XPS donne une perspective d'une collection de particules (dans une monocouche ou sous forme de poudre)<sup>[28-30]</sup>, pour laquelle on peut extraire des informations sur l'environnement chimique, la composition, l'épaisseur de revêtements et l'enrichissement et/ou appauvrissement élémentaire à la surface des particules. Néanmoins, certains aspects, parfois interdépendants, sont à considérer par rapport à une analyse de matériaux plus classique. Même si ces aspects n'ont pas pu être intégralement pris en compte dans le cadre de notre étude, il nous paraît utile d'en exposer quelques-uns :

#### **▪ *Changements d'énergie de liaison et de largeur de pic XPS vs taille des particules***

La taille des particules (et les interactions avec le substrat), dans certaines circonstances, influence l'énergie de liaison des pics de cœur, leur largeur, la forme de la bande de valence (ex : pour des clusters de moins de 100 atomes<sup>[31]</sup>) et altère même le paramètre Auger<sup>[32,33]</sup>. Il est important de garder à l'esprit que tous les déplacements

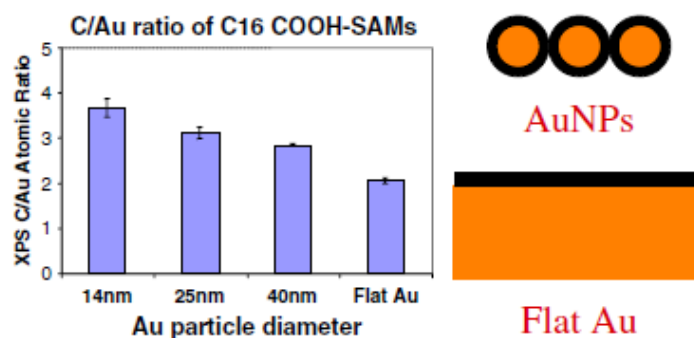
d'énergie de liaison associés aux nanoparticules ne sont pas tous à interpréter comme des changements d'état chimique.

Les travaux de Shukla et *al.*<sup>[34]</sup> sur des nanoclusters d'or révèlent une variation de l'énergie de liaison du pic Au4f de +0,3 eV et une augmentation de la largeur à mi-hauteur (+0,2 eV) entre des clusters de taille inférieure à 12-14 nm et une collection de clusters de taille moyenne comprise entre 40 nm et 60 nm. Ces résultats sont interprétés en terme de changements de la structure électronique due à la taille de cluster fini et à la création d'une charge (+ $\epsilon$  V) à sa surface durant le processus de photoémission (induisant un terme correctif d'énergie de Coulomb à la valeur de l'énergie de liaison)<sup>[35]</sup>. Des déplacements chimiques de pics de cœur XPS avaient déjà été remarquées dans d'autres travaux plus anciens sur des matériaux métalliques, comme ceux de Citrin et *al.*<sup>[36]</sup>, qui soulignaient la densité électronique particulière des atomes de surface. De leur côté, Radnik et *al.*<sup>[37]</sup> ont observé une diminution de l'énergie de liaison Au4f quand les nanoparticules d'or sont déposées sur un support inorganique comme TiO<sub>2</sub>. Des transferts électroniques du support vers les nanoparticules et des effets géométriques semblent être à l'origine des variations enregistrées.

La fonctionnalisation de certains matériaux nanostructurés offre des possibilités de modulation des propriétés et des applications de ces objets. Cette « décoration » désirée (applications nouvelles, stabilisation) ou involontaire (contamination, résidus de solvant), est souvent une donnée supplémentaire à intégrer dans l'analyse de l'échantillon. Même si la proportion de cette couche fonctionnelle est minimale au regard du volume de la particule, des effets induits, plus ou moins significatifs, apparaissent au niveau de la mesure des énergies de liaison et sont différenciés en fonction de la taille de l'objet. Pour des nanoparticules de platine décorées de PVP, un transfert de charge est enregistré des groupements carbonyles du motif polymérique vers la nanoparticule quand son diamètre est inférieur à 7 nm et un effet inverse pour des tailles supérieures à 25 nm<sup>[38]</sup>. Il existerait un caractère donneur-accepteur qui s'inverse dans la gamme de taille intermédiaire.

Pour des nanostructures composites, la force du signal du revêtement relativement au substrat (ou cœur d'une particule) peut aussi varier avec la taille de la particule en considérant les libres parcours moyens électroniques et la courbure de la surface<sup>[28,30]</sup>. Des données collectées sur des nanoparticules d'or de différentes tailles recouvertes avec des thiols arrangés selon une monocouche auto-assemblée (SAM), fournit la démonstration de cet effet (Figure II-17). Bien que l'épaisseur de la monocouche SAM est presque constante, le rapport du signal C de la SAM sur le signal Au du cœur de la particule évolue comme une fonction de la taille de la particule. Lorsque la particule devient plus petite, la collection de particules contient un pourcentage de matériau SAM en augmentation.





**Figure II-17 : Evolution du rapport élémentaire C/Au comme une fonction de la taille de la particule déduite par les mesures XPS pour des nanoparticules d'or greffées de thiols**

Tandis que la plupart des analyses sont menées en supposant que l'échantillon a une surface plane, la forme et la structure des nanoparticules peuvent jouer un rôle important dans l'interprétation précise des données XPS de matériaux nanostructurés<sup>[39]</sup>, notamment lors d'expériences résolues en angle qui permettent de faire varier la profondeur d'analyse. Des modèles théoriques apparaissent depuis quelques années pour adapter le formalisme classique de l'intensité de surfaces planes homogènes à des systèmes nanoparticulaires de forme variable<sup>[40]</sup>. Comme suggéré dans les conditions expérimentales à venir (Figure II-21), de tels matériaux n'ont pas une structure uniforme pour l'analyse. Diverses méthodes analytiques offrent la possibilité d'accéder tout de même à l'information recherchée en dépassant le concept de couche uniforme. L'approche appropriée dépend aussi de la densité des particules et de leur montage.

- La technique de laboratoire nécessite un fonctionnement en ultra-vide (bien que des systèmes synchrotron différenciellement pompés, permettant aux échantillons d'être maintenus à des pressions plus élevées, soient aujourd'hui développés<sup>[41]</sup>). Certains échantillons peuvent être altérés sous ultra-vide et cette contrainte analytique est à considérer. L'une des approches courantes pour lutter contre ces effets indésirables est le refroidissement de l'échantillon par un système intégré d'azote liquide ; la collecte de données se fait alors en fonction du temps pour déterminer s'il y a toujours des changements induits par le vide. Tout aussi important, l'exposition de quelques échantillons à l'air avant l'analyse peut influencer leurs états physique et chimique. Par exemple, pour des nanoparticules cœur-coquille du type Fe@Fe(oxyde), leur exposition à l'air ambiant induit une oxydation supplémentaire et le signal caractéristique des atomes de fer au degré d'oxydation 0 est considérablement diminué (Figure II-18). Il semble donc utile de noter qu'en raison d'un rapport élevé surface / la taille de l'objet considéré, des effets environnementaux<sup>[42]</sup> génèrent tout un pan nouveau de propriétés et comportements, comme une structure superficielle, de possibles transformations de phase, des (in)stabilités chimiques, ...

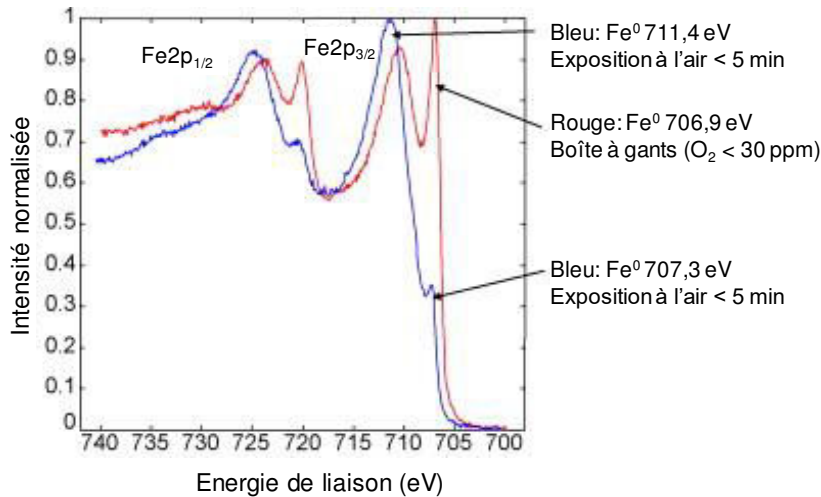


Figure II-18 : Spectre XPS Fe2p de nanoparticules Fe@Fe oxyde selon différentes conditions de conditionnement

▪ *Densité de particules analysées et agglomérats*

L'illustration de l'impact de la densité particulaire sur des données expérimentales est mise en avant dans le travail de Kuchibahtla et *al.*<sup>[43]</sup> à propos de nanoparticules de cérine ( $\text{CeO}_2$ ). Les spectres XPS Ce4d (Figure II-19) de deux zones de densité différentes ont montré des états d'oxydation distincts ( $\text{Ce}(+II)$  et  $\text{Ce}(+IV)$ ) justifiés sur la seule interaction entre nanoparticules (forte densité) ou entre le support  $\text{SiO}_2$  et les nanoparticules individuelles (faible densité).

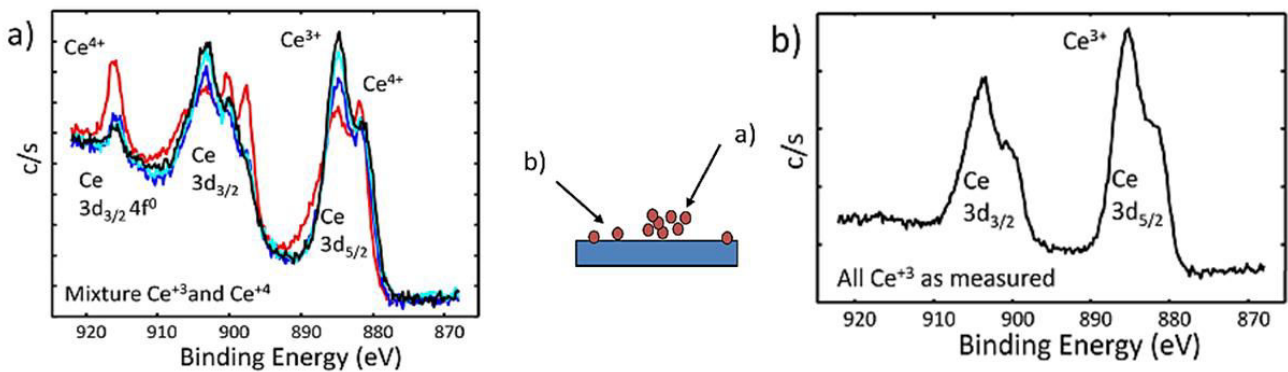


Figure II-19 : Pics de cœur XPS Ce4d de nanoparticules de  $\text{CeO}_2$  : a) zone de forte densité et b) zone de faible densité<sup>[43]</sup>

Il est fréquemment impossible de distribuer des particules à faible densité et dans certains cas, une plus grande collection de particules est nécessaire afin d'obtenir un signal suffisant. Dans une étude bien connue de Fulghum et Linton<sup>[44,45]</sup>, les méthodes d'analyse sont comparées dans la détermination quantitative du dépôt d'adsorbats sur des surfaces de particules dans une collection de particules. Les auteurs montrent que les données XPS sont traitées efficacement pour donner une évaluation du taux de couverture même sur des échantillons sous forme

de poudre. Frydman et *al.*<sup>[29]</sup> ont par ailleurs présenté une méthode détaillée pour l'analyse XPS d'agglomérats de nanoparticules.

Pour les nanoparticules, la connaissance du dépôt de surface et/ou de la contamination devrait être un paramètre central à leur application. L'approche de Shard et *al.* pourrait être dans ce contexte appliquée pour des monocouches de particules ou des agglomérats si la taille des particules est connue<sup>[30]</sup>. Les agglomérats de particules représentent ce qui est effectivement une surface rugueuse pour l'analyse. Le fameux « angle magique » (f(géométrie de l'analyseur)) est un autre paramètre à prendre en considération pour la collecte de données dans l'analyse des couches couvrantes avec la limite de précision qu'elle impose<sup>[46,47]</sup>.

Remarques : La plupart des considérations rapportées pour l'XPS s'appliquent aussi à la spectroscopie d'électrons Auger puisque ces méthodes d'analyse sont identiquement associées aux réflexions menées autour de l'évolution de taille et de distribution des nanoparticules sur la base de la détection d'électrons d'assez basse énergie. Cependant, l'AES induit un faisceau électronique incident avec une résolution spatiale qui certaines fois peut être utilisé pour collecter l'information unique de particules individuelles.

### c. Conditions expérimentales

#### i. Conditions d'analyse XPS

Au cours de cette thèse, les analyses XPS ont été réalisées avec un spectromètre Thermo K-alpha (Figure II-20) couplé à une boîte à gants sous atmosphère d'argon équipée d'un système de régénération puissant (taux de O<sub>2</sub> et H<sub>2</sub>O contrôlés et < 1 ppm).



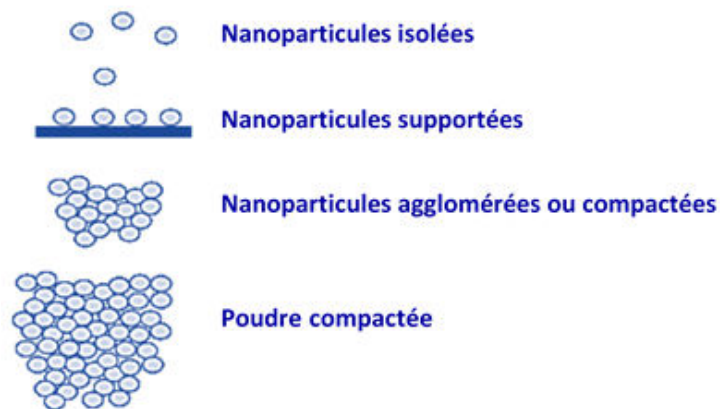
Figure II-20 : Spectromètre XPS K-alpha Thermo Scientific et sa boîte à gants connectée

Cet appareil utilise la radiation de la raie  $K_{\alpha}$  de l'aluminium (1486,6 eV) et ce rayonnement X monochromatique est microfocalisé sur l'échantillon à analyser (spot de 400  $\mu\text{m}$  de diamètre). La pression résiduelle dans la chambre d'analyse est d'environ  $10^{-9}$  mbar. L'utilisation du mode scan avec une *Pass Energy* de 20 eV permet d'obtenir à la fois une bonne résolution en énergie pour l'analyse en haute résolution des pics de cœur et un nombre de coups comptabilisés satisfaisant (rapport signal/bruit). Les effets de charge, résultant de l'analyse d'échantillons isolants, ont été minimisés grâce à l'utilisation d'un système de neutralisation de type double faisceau plus performant qu'un *Flood Gun* classique n'utilisant qu'un flux d'électrons de faible énergie. Ce système de neutralisation combine des électrons et des ions  $\text{Ar}^+$  de faible énergie de manière à compenser plus efficacement les potentiels de surface apparaissant lors de l'analyse. De plus, pour chaque échantillon analysé, des tests visant à déterminer une éventuelle dégradation de certaines phases et/ou de réduction de certains éléments sous l'impact du flux de photons X ont été systématiquement réalisés (spectres de contrôle en début et fin d'analyse).

## ii. Préparation/montage de l'échantillon pour l'analyse

De façon globale, le constat de la contamination, des impuretés et des effets de l'environnement est nécessairement à relier en partie à la manipulation et au montage des spécimens à analyser. Différentes méthodes et procédures permettent a priori (sans certitude d'un test à l'autre) de limiter l'introduction de contamination lors de l'immobilisation des nanoparticules sur le support : certains adhésifs compatibles avec le vide, la croissance directe sur le support ou l'immersion dans la solution colloïdale du support préalablement nettoyé [48,49]. La distribution des particules est souvent contrainte par les méthodes de préparation et d'analyse comme le montre la Figure II-21.

Certaines propriétés des matériaux nanostructurés et les résultats de leurs mesures peuvent être influencés par l'agglomération, l'agrégation ou les interactions des nanoparticules avec le substrat support et/ou avec les autres nanoparticules<sup>[28]</sup>.



**Figure II-21 : Différents degrés de dispersion ou d'agglomération de nanoparticules avant analyse**

De tels effets comprennent : la construction d'un domaine chargé pendant les mesures XPS de clusters métalliques supportés sur substrat isolant<sup>[31,50]</sup>; des couplages de modes plasmon dans des nanoparticules

métalliques proches les unes des autres<sup>[51,52]</sup>; l'influence de l'espacement particulaire sur les propriétés magnétiques et électroniques de composites<sup>[53,54]</sup>, des couplages d'états quantiques<sup>[55]</sup>.

Dans ces travaux de thèse, la préparation des échantillons a été différente selon la forme sous laquelle nous avons pu récupérer les nanoparticules. En particulier dans ce chapitre, la récupération des nanoparticules à l'état solide étant problématique, plusieurs gouttes de chaque suspension de nanoparticules ont été déposées sur la platine porte-échantillon. Celle-ci a ensuite été placée à l'étuve à 120°C afin d'évaporer le solvant. Nous avons en amont pu vérifier que ce traitement thermique n'avait pas d'influence majeure sur les résultats déduits des analyses XPS. Concernant les références, dans le cas de matériaux massifs, les échantillons ont été analysés tels quels et pour ceux sous forme de poudre, ils ont été déposés sur du scotch de cuivre double face.

### iii. Analyse des spectres XPS

Les spectres XPS présentés dans ce chapitre, comme dans les suivants, ont pour la plupart été calibrés à partir de la raie C 1s du carbone de contamination (son énergie de liaison est fixée à 285,0 eV) et normalisés en raison de leur utilisation pour une description qualitative (pas d'échelle d'intensité reportée). Les résultats de quantification élémentaire sont reportés dans des tableaux. La déconvolution des pics de cœur est effectuée de façon systématique en utilisant le logiciel Casa XPS ©, sur la base de composés de référence et de résultats issus de travaux de la littérature, après soustraction du bruit de fond B en tout point  $E_{\text{cin}}(i)$  du spectre<sup>[56]</sup>. En effet, la contribution réelle d'un signal de photoélectrons enregistrés n'est obtenue qu'après élimination des contributions parasites dues aux pertes d'énergie inélastiques des photoélectrons par collision dans le solide qui sont à l'origine de ce bruit de fond. Dans cette étude, la fonction représentative de chaque composante correspond au produit d'une fonction gaussienne (70 %) et d'une fonction lorentzienne (30 %). Le spectre simulé est comparé à la courbe expérimentale en appliquant la méthode des moindres carrés. Pour la représentation des spectres XPS déconvolués, des points noirs (•) sont utilisés pour le tracé du spectre expérimental tandis que le trait noir (—) correspond à l'enveloppe mathématique du spectre simulé à partir des différentes composantes. Enfin, l'analyse quantitative est effectuée en modulant l'intensité de chaque pic de cœur par sa section efficace de photoionisation issue des facteurs de Scofield<sup>[57]</sup>.

La dispersion des valeurs reportées dans la littérature pour les énergies de liaison des niveaux électroniques de composés semblables est souvent importante. Cette observation met en évidence la difficulté de mesurer des énergies de liaison absolues et montre l'intérêt de réaliser l'analyse d'échantillons de référence à partir d'un spectromètre unique et de conditions expérimentales identiques au cours du travail.

De plus, comme nous avons pu le voir, la dimensionnalité et la structuration des nano-objets est également à considérer dans l'interprétation des analyses XPS puisqu'elles peuvent influencer les déplacements chimiques, les largeurs des pics (FWHM, Full Width at Half Maximum) ainsi que les compositions. Ce type de phénomène a déjà été reporté avec l'abaissement de dimensionnalité du système caractérisé<sup>[58]</sup>. Pour cette raison, nous avons

également décidé de comparer des échantillons références à l'état bulk et à l'état nanométrique afin de vérifier l'existence ou non d'un effet « nano » dépendant lors de l'étude XPS de ces nanoparticules.

#### d. Caractérisation XPS du cœur des nanoparticules

##### i. Matériaux de référence

Les références que nous avons choisi d'analyser sont les espèces mises en jeu dans le processus de formation du cœur des nanoparticules. L'analyse haute résolution de l'ensemble des pics de cœur relatif à tous les éléments chimiques des composés de référence est présentée en annexe à la fin du chapitre sous la forme de tableau. Dans ce chapitre, est reportée l'analyse des éléments d'intérêt.

##### i.1. Composés à base d'argent

Dans le cas des composés à base d'argent, une analyse complète des différents pics de cœur et du pic Auger Ag  $M_5N_{4,5}N_{4,5}$  est nécessaire pour discriminer les degrés d'oxydation formels (0) et (+I) de l'argent. En effet, les déplacements chimiques enregistrés pour le pic de cœur  $Ag3d_{5/2}$  sont généralement faibles et parfois assez différents comme le montre les résultats de la littérature. Dans ces conditions, le pic Auger Ag  $M_5N_{4,5}N_{4,5}$  constitue une sonde complémentaire exploitable pour distinguer efficacement les deux degrés d'oxydation de l'argent ainsi que les espèces chimiques associées. Le processus de désexcitation associé à cette raie Auger met en jeu le niveau  $3d_{5/2}$  sur lequel se trouve la vacance et des niveaux de valence  $4d$  de l'argent.

L'étude des pics Auger a conduit à un nouveau concept, introduit en 1975 par Wagner<sup>[30]</sup>, appelé le paramètre Auger  $\alpha$ . C'est une valeur, unique pour chaque composé, qui peut être mesurée plus précisément (pas de calibration spectrale nécessaire) que les positions absolues en énergie. Cette valeur de paramètre Auger correspond à la différence en énergie cinétique entre le pic Auger et le pic de cœur mis en jeu dans le phénomène. Cette différence de position entre ces deux pics permet également d'annuler la contribution des effets de charge éventuels.

Plus généralement, les valeurs reportées dans la littérature sous le nom de paramètre Auger « apparent » correspondent à :

$$\alpha' = \alpha + hv = E_{cin}(Auger) - E_{cin}(pic\ de\ cœur) + hv = E_{cin}(Auger) + E_L(pic\ de\ cœur) \quad (16)$$

Dans le cas de l'argent, il s'exprime selon l'expression :

$$\alpha' = E_{cin}(M_5N_{4,5}N_{4,5}) + E_L(Ag3d_{5/2}) \quad (17)$$

Comme le montrent les valeurs de la littérature (Tableau II-3), ce paramètre permet de différencier plus spécifiquement les différents degrés d'oxydation et environnements de l'argent. De plus, des effets d'état final

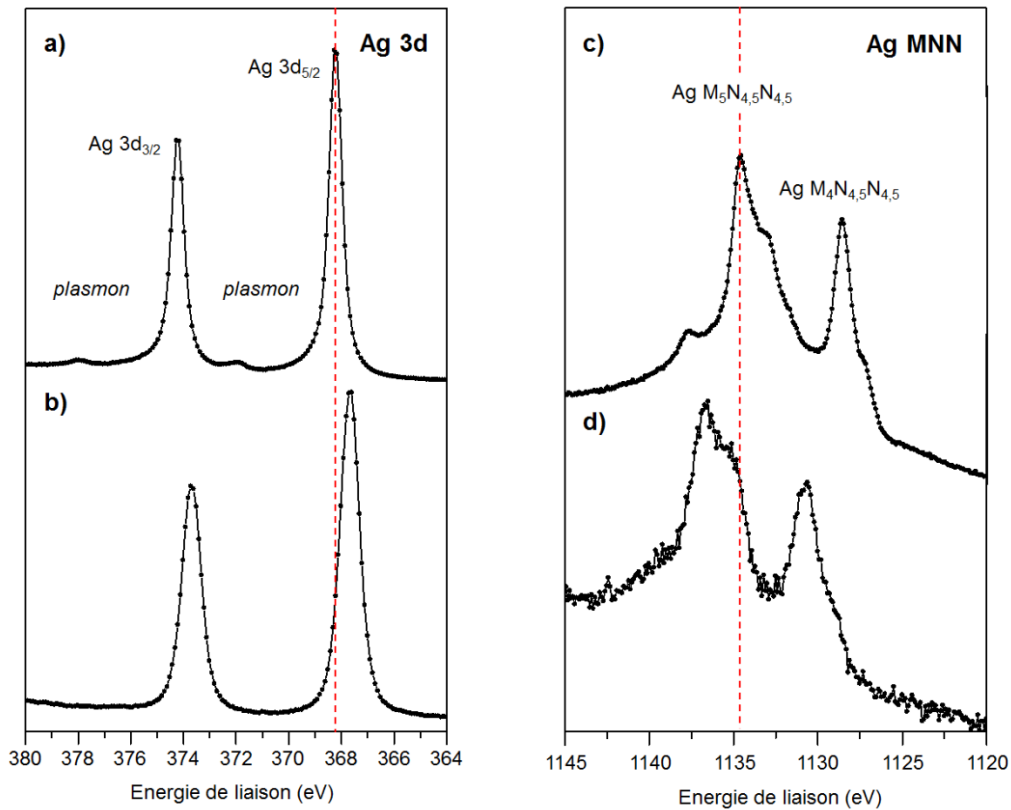
en particulier pour les oxydes d'argent ont été rapportés rendant les identifications et interprétations moins aisées [59].

**Tableau II-3 : Energies de liaison et paramètres Auger apparent  $\alpha'$  issus des principales revues XPS de la littérature pour différents composés à base d'argent**

Réf	Kaushik [60]			Ferraria et al. [61]		Gaarenstroom et al. [59]	
	Calibration $E_L$ [C1s (C-C/C-H)] = 285,0 eV					$E_L$ [Ag3d <sub>5/2</sub> (Ag(0))] = 368,2 eV	
	$E_L$ (Ag3d <sub>5/2</sub> ) (eV)	$\alpha'$ (eV)	Autres $E_L$ (eV)	$E_L$ (Ag3d <sub>5/2</sub> ) (eV)	$\alpha'$ (eV)	$E_L$ (Ag3d <sub>5/2</sub> ) (eV)	$\alpha'$ (eV)
Ag	368,3	720,0	-	368,3	720,5	368,2	719,8
Ag <sub>2</sub> O	367,9	718,3	O1s = 529,5 ; 531,1	368,6	717,9	367,8	718,5
AgO	367,5	718,2	O1s = 528,6 ; 530,7	367,8 ; 368,4	718,4	367,4	718,0
AgCl	368,3	717,5	Cl2p = 198,6-200,2	-	-	-	-
AgNO <sub>3</sub>	368,4	717,8	O1s = 532,5 N1s = 406,8	368,8	717,8	-	-

Nous avons donc choisi d'étudier le pic de cœur Ag3d et le pic Auger AgMNN de l'argent métal et du chlorure d'argent AgCl (produit commercial, Sigma Aldrich, 99,999%) qui est un sous-produit de la réaction d'oxydoréduction mise en jeu dans la synthèse des nanoshells d'or.

Les résultats qualitatifs issus de ces analyses XPS sont présentés dans la Figure II-22 (pics de cœur Ag 3d<sub>5/2</sub> et pics Auger Ag M<sub>5</sub>N<sub>4,5</sub>N<sub>4,5</sub>) et Figure II-23 (pic de cœur Cl2p).



**Figure II-22 : Superposition des spectres Ag3d et AgMNN de l'argent métal (a, c) et de l'AgCl (b, d)**

Du fait du couplage spin-orbite, le spectre Ag 3d se présente sous la forme de deux composantes Ag3d<sub>5/2</sub> et Ag3d<sub>3/2</sub> distantes d'environ 6 eV avec un rapport d'intensité de 3/2.

L'analyse XPS du pic de cœur Ag3d<sub>5/2</sub> de l'argent métal permet d'identifier un pic fin à 368,2 eV (FWHM<sup>1</sup> = 0,7 eV) et légèrement asymétrique en accord avec les résultats de la littérature. Cette asymétrie observée pour les métaux résulte de l'influence de transitions électroniques des électrons de valence vers la bande de conduction lors du phénomène de photoémission. On observe également une structuration de plasmons située à 3,7 eV de chaque composante du côté des hautes énergies de liaison<sup>[62]</sup>.

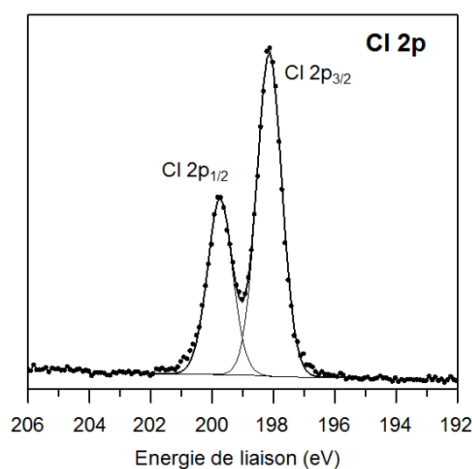
Pour AgCl, le pic de cœur Ag3d<sub>5/2</sub> est plus large (FWHM = 0,9 eV) et localisé à 367,7 eV. Cette valeur de l'énergie de liaison est inférieure à celle de l'argent métal ce qui met en évidence ici un effet d'état final, plutôt reporté dans le cas des oxydes d'argent dans la littérature. En effet, à partir d'un raisonnement au premier ordre basé sur un effet d'état initial, l'énergie de liaison du niveau 3d des atomes d'argent liés à un élément électro-négatif (Cl ou O), devrait être plus importante que pour l'argent métal. Dans notre cas, et comme il est reporté dans la littérature, le sens du déplacement chimique est inversé, en accord avec un effet d'état final (réorganisation du cortège électronique suite à la création du photoélectron) plus conséquent que la stabilisation due à l'effet d'état initial (rappel :  $E_L = E_f(N-1) - E_i(N)$ ).

<sup>1</sup> FWHM (Full Width at Half Maximum) fait référence à largeur à mi-hauteur des pics



Au-delà de l'analyse du pic de cœur, le pic Auger Ag  $M_5N_{4,5}N_{4,5}$  (Figure II-22-c, d) constitue une sonde complémentaire avec une enveloppe expérimentale très spécifique selon le degré d'oxydation du métal. Le paramètre Auger apparent, sensible à l'environnement chimique local, permet de distinguer les deux états d'oxydation. Ainsi, l'énergie cinétique du pic Auger Ag  $M_5N_{4,5}N_{4,5}$  et le paramètre Auger dans le cas de l'argent métal sont respectivement égaux à 352,0 eV et 720,2 eV alors que pour l'AgCl, les valeurs sont de 350,0 eV et 717,7 eV en accord avec les données de la littérature.

L'analyse du pic de cœur Cl2p met en évidence deux composantes Cl2p<sub>3/2</sub> et Cl2p<sub>1/2</sub>, situées respectivement à 198,1 et 199,7 eV<sup>[63]</sup>, avec un rapport d'intensité de 2/1 (Figure II-23).



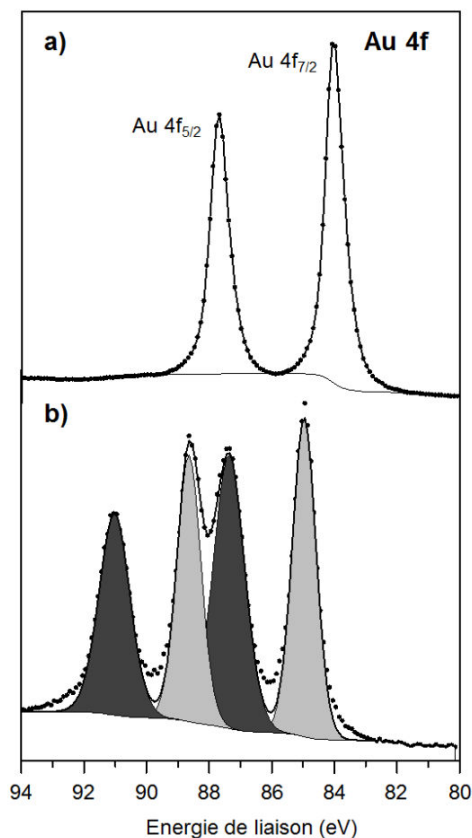
**Figure II-23 : Pic de cœur XPS Cl2p du chlorure d'argent AgCl**

Enfin les analyses quantitatives permettent de confirmer la stœchiométrie AgCl du composé de référence avec un rapport Ag/Cl de 0,9.

### i.2. Composés à base d'or

De la même manière que pour l'argent, une référence d'or métal et le précurseur d'or  $HAuCl_4$  ( $HAuCl_4 \cdot 3H_2O$ , Sigma, >99,9%) utilisé pour la synthèse des nanoshells ont été analysés par XPS. Les pics de cœur Au4f de ces deux composés sont présentés dans la Figure II-24.

L'analyse du pic de cœur Au 4f permet d'interpréter sur la seule base d'effet d'état initial (déplacement chimique) les différents degrés d'oxydation du métal. Du fait du couplage spin-orbite, le spectre Au4f présente deux composantes, Au4f<sub>7/2</sub> et Au4f<sub>5/2</sub> distantes de 3,7 eV et avec un rapport d'intensité 4/3. Le pic de cœur Au4f<sub>7/2</sub> de l'or métal met en évidence un pic fin à 84,0 eV (FWHM = 0,7 eV) et légèrement asymétrique.



**Figure II-24 : Superposition des pics de cœur Au4f de a) l'or métal et b) du précurseur d'or H[AuCl<sub>4</sub>]**

Pour le précurseur H[AuCl<sub>4</sub>], le pic de cœur Au4f met en évidence deux environnements caractérisés par deux doublets à 85,0-88,6 eV et 87,4-91,0 eV qui correspondent respectivement à de l'Au (+I) et de l'Au (+III)<sup>[64,65]</sup>.

La présence d'or à l'état d'oxydation (+I) inattendue met en évidence ici un phénomène de réduction de l'Au(III) en Au (I) sous le faisceau lors de l'analyse confirmée par la comparaison des spectres enregistrés en début et fin d'analyse.

## ii. Caractérisation des nanoparticules

### ii.1. Les nanoparticules d'argent

Dans un premier temps, les nanoparticules d'Ag gabarits ont été analysées en XPS après lavage à l'eau distillée. Le pic de cœur Ag3d<sub>5/2</sub> repéré à une énergie de 368,1 eV est caractéristique de l'état d'oxydation (0) (Figure II-25-a). La forme des composantes du doublet et leurs largeurs à mi-hauteur sont les mêmes que pour l'échantillon référence ce qui exclut tout effet de taille nanométrique. Par ailleurs, l'allure du pic Auger Ag M<sub>5</sub>N<sub>4,5</sub>N<sub>4,5</sub> (Figure II-25.b), est identique à celle de l'argent métal standard. Enfin le calcul du paramètre Auger apparent pour les nanoparticules d'argent donne la valeur de  $\alpha' = 720,2$  eV en accord avec celui du composé de référence.

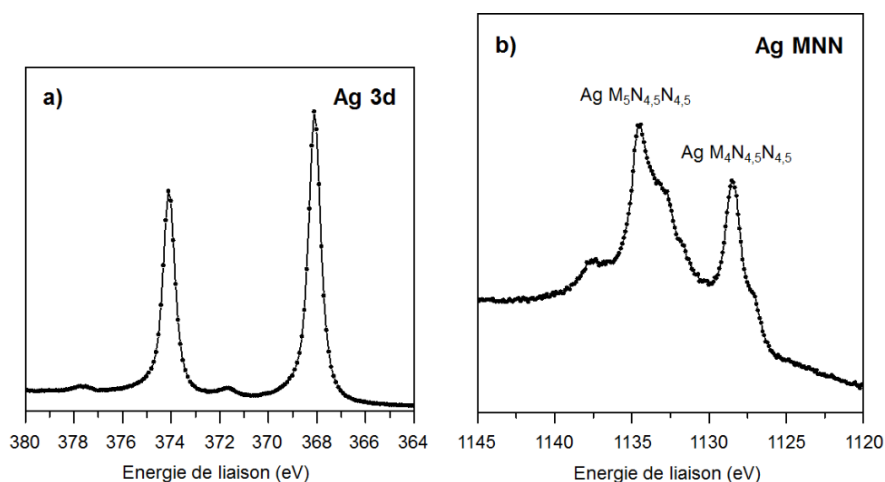


Figure II-25 : a) Pic de cœur XPS Ag3d et b) pic Auger AgMNN des nanoparticules d'argent lavées à l'eau distillée

## ii.2. Nanoshells d'or (NS)

La synthèse des nanoshells ne conduisant pas à un remplacement galvanique total, l'analyse des pics de photoionisation de l'or (Au4f) et de l'argent (Ag3d) a été réalisée de façon simultanée pour chaque échantillon NS(X) (avec X le rapport molaire Ag/Au) (Figure II-26 et Figure II-27).

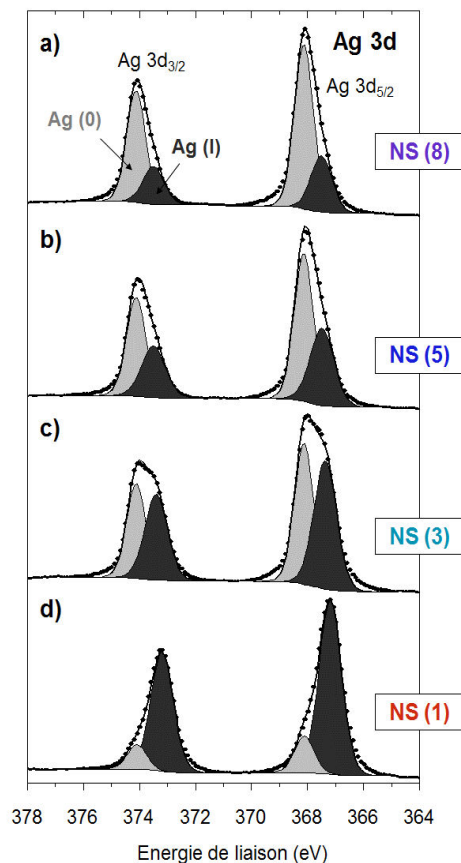
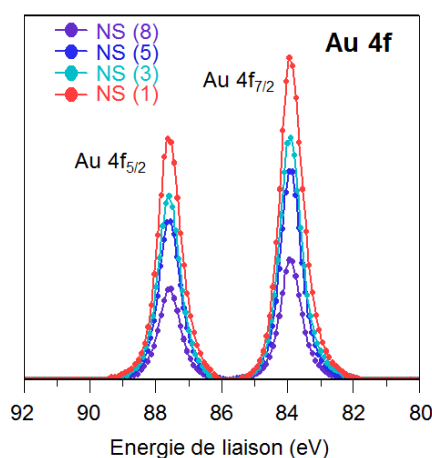


Figure II-26 : Pics de cœur XPS Ag3d des nanoshells a) NS (8), b) NS (5), c) NS (3) et d) NS (1)

Le pic de cœur  $Ag3d_{5/2}$  met en évidence deux environnements chimiques quel que soit l'échantillon NS(X) considéré (Figure II-26). La comparaison avec les échantillons de référence permet d'attribuer la composante à basse énergie de liaison (367,5 eV) à de l'argent à l'état d'oxydation (+I) alors que la composante située à 368,1 eV est caractéristique de l'argent métal. L'évolution de ces deux composantes au cours de la réaction (c'est-à-dire lorsque le volume de précurseur d'or ajouté augmente) est en accord avec le mécanisme d'oxydoréduction. En effet, le balancement d'intensité entre la composante associée à l'argent métal et à l'argent au degré d'oxydation (+I) met en évidence l'oxydation des nanoparticules d'argent tout au long du mécanisme de formation et confirme donc l'attribution des deux composantes. L'analyse XPS révèle également la présence de chlore. Le pic de cœur  $Cl2p_{3/2}$  est repéré à une énergie de liaison de 197,6 eV caractéristique de l'AgCl, sous-produit de la réaction d'oxydoréduction. Par ailleurs, le rapport  $Ag(+I)/Cl$  calculé pour chaque composition est très proche de celui du composé de référence AgCl ( $\approx 0,9$ ), ce qui conforte l'attribution faite sur la base des données XPS.

Concernant le pic de cœur Au4f (Figure II-27), un seul environnement chimique est observé avec un doublet à 84,0-87,7 eV caractéristique de l'or métal. Cette observation met en évidence la réduction complète du précurseur d'or pour l'ensemble des échantillons analysés. De plus, de NS(8) à NS(1), l'intensité du pic devient de plus en plus importante en accord avec la formation d'or d'autant plus importante que le volume de précurseur d'or utilisé est grand.



**Figure II-27 : Superposition des pics de cœur XPS Au4f des nanoshells NS(X)**

D'un autre côté, nous pouvons remarquer que même pour des quantités de sels d'or importantes (au-delà des quantités stœchiométriques), il reste toujours de l'argent métal. Cette divergence par rapport à la théorie a déjà été observée par Sun et Xia<sup>[22]</sup> qui expliquent que le processus de « dealloying » semble nécessiter un sel d'or avec un potentiel redox plus important pour oxyder sélectivement les atomes d'argent. Considérant de plus que le potentiel redox du sel d'or que nous avons utilisé est abaissé du fait des ligands hydroxydes, ce phénomène doit être encore plus significatif dans notre cas.

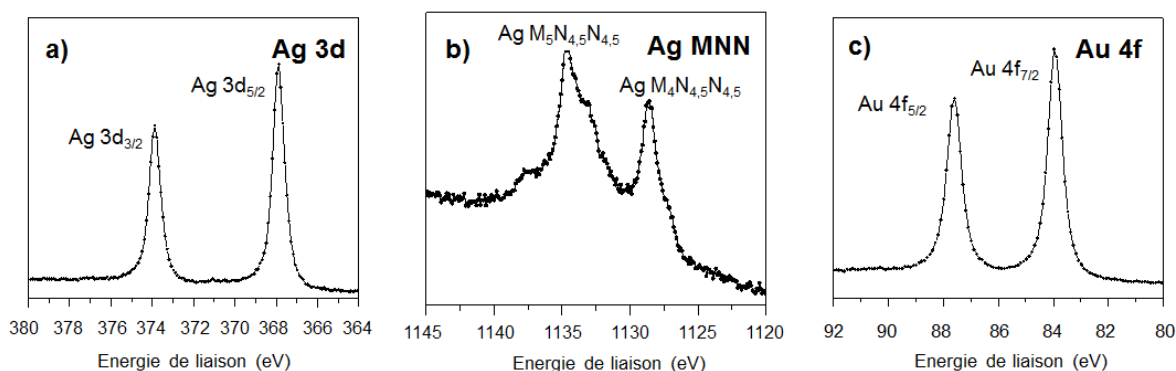
Les analyses quantitatives permettent de calculer le ratio  $\text{Ag}(0)/\text{Ag}(I)$  et  $\text{Ag}(0)/\text{Au}(0)$  pour chaque échantillon (Tableau II-4). Au début de la réaction d'oxydoréduction, c'est-à-dire lorsque la quantité de sels d'or ajoutée au milieu réactionnel est faible, les nanoparticules d'argent gabarits sont très peu oxydées et la couche d'or formée à la surface est relativement fine. De ce fait, la proportion relative d'argent métal par rapport à l'argent (+I) et l'or métal est relativement importante ce qui implique que les rapports  $\text{Ag}(0)/\text{Ag}(I)$  et  $\text{Ag}(0)/\text{Au}(0)$  sont élevés. Lorsque le volume de précurseur d'or augmente, la proportion d' $\text{Ag}(0)$  devient plus faible et donc ces rapports diminuent.

**Tableau II-4 : Rapport  $\text{Ag}(0)/\text{Ag}(I)$  et  $\text{Ag}(0)/\text{Au}(0)$  déduit des analyses quantitatives XPS pour les différentes synthèses de nanoshells NS(X)**

	$\text{Ag}(0)/\text{Ag}(+I)$	$\text{Ag}(0)/\text{Au}(0)$
NS(8)	2,5	4,3
NS(5)	1,1	2,0
NS(3)	0,9	1,3
NS(1)	0,2	0,3

Plusieurs cycles de lavage/centrifugation (à l'eau distillée) des nanoparticules permettent d'éliminer complètement la composante  $\text{Ag}3d_{5/2}$  associée à l' $\text{AgCl}$  confirmant ainsi qu'il est uniquement présent en solution et non à la surface des nanoparticules. Ce résultat a par ailleurs été confirmé par des analyses en spectroscopie d'électrons Auger où les cartographies mettent en évidence l'absence de chlore.

Ainsi, les nanoparticules lavées sont caractérisées par un pic de cœur  $\text{Ag}3d_{5/2}$  repéré à 367,9 eV (FWHM = 0,8 eV) et un pic de cœur  $\text{Au}4f_{7/2}$  à 83,9 eV (FWHM = 0,7 eV). Enfin l'allure du pic  $\text{Ag} M_5N_{4,5}N_{4,5}$  confirme la nature métallique de l'argent avec un paramètre Auger de 719,9 eV (Figure II-28).



**Figure II-28 : Pics de cœur XPS a)  $\text{Ag} 3d$ , b)  $\text{Ag} MNN$  et c)  $\text{Au} 4f$  des nanoshells NS(3) lavées**

Concernant la composition des nanoshells synthétisées, il est difficile de conclure d'après les résultats XPS sur la formation d'un alliage ou non. En effet, les énergies de liaisons des métaux pur Ag et Au et des mêmes métaux dans un alliage  $Ag_xAu_y$  sont relativement proches<sup>[66]</sup>.

Des informations supplémentaires, notamment sur la distribution de l'Ag et de l'Au au sein de la nanoparticule, peuvent être déduites de la comparaison du rapport Ag/Au calculé par XPS et par une analyse en volume. Les nanoparticules NS(3) ont été choisies pour la suite de ce travail du fait de leur absorbance située dans la fenêtre biologique. Après lavage, le rapport Ag(0)/Au(0) est toujours égal à 1,3.

Des analyses par spectrométrie de masse par torche à plasma (ICP-MS Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry) ont été réalisées sur cet échantillon afin de déterminer les concentrations en Ag et Au qui composent les nanoparticules. Le rapport Ag/Au déduit de ces analyses est de 1,7. Dans le cas de la formation d'un alliage homogène, les deux rapports calculés devraient être identiques. Ici, le rapport Ag/Au des nanoshells NS(3) déduit des analyses ICP-MS est supérieur à celui calculé par XPS. Ce résultat suggère donc la formation d'un alliage plutôt hétérogène avec à priori davantage d'or en surface. Afin de discuter ces premières hypothèses et obtenir des informations plus précises sur la composition de ces nanostructures creuses, des analyses en spectroscopie d'électrons Auger ont été effectuées après formation de la coquille de silice mésoporeuse (chapitre 3). Les résultats de cette étude sont présentés dans la suite de ce chapitre puisqu'ils apportent essentiellement des informations concernant la nature chimique du cœur.

## 2. Spectroscopie d'électrons Auger

### a. Principe général

La spectroscopie d'électrons Auger est une technique d'analyse chimique d'extrême surface (2-5 nm) basée sur l'interaction entre un faisceau d'électrons incidents et le cortège électronique de l'atome.

Lorsqu'un faisceau électronique pénètre dans un échantillon solide, il subit un certain nombre d'interactions, élastiques et inélastiques (Figure II-29).

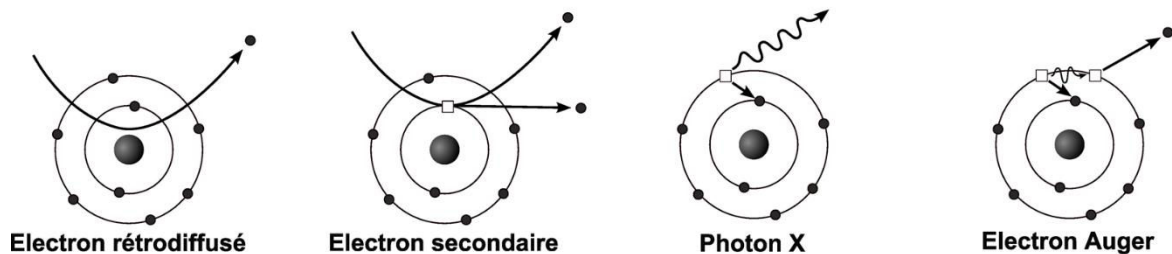


Figure II-29 : Principales interactions électron-matière

Ces interactions conduisent globalement à l'émission :

- d'électrons rétrodiffusés qui sont des électrons primaires ayant subi un certain nombre de chocs élastiques avec les noyaux atomiques et inélastiques avec les électrons et qui sont réémis avec une énergie proche de l'énergie initiale
- d'électrons secondaires qui sont des électrons de faible énergie émis des couches superficielles proches de la surface résultant de l'ionisation des atomes
- de photons X du fait de la relaxation du système après ionisation par les électrons incidents
- d'électrons Auger qui résultent d'un mécanisme de désexcitation après ionisation et possèdent une énergie caractéristique de l'élément

Les diverses émissions électroniques et électromagnétiques proviennent de zones d'interaction plus ou moins profondes et plus ou moins larges (Figure II-30).

Pour la gamme d'énergie cinétique explorée en analyse Auger, la longueur d'atténuation  $\lambda$  des électrons est de  $\sim 1$  nm. Comme en spectroscopie XPS, la probabilité pour que de tels électrons générés à la profondeur  $z$  puissent être détectés sans avoir perdu leur énergie initiale est donnée par une loi d'atténuation de la forme  $\exp(-z/\lambda \cos \theta)$  dans laquelle  $\theta$  est l'angle de détection par rapport à la normale à la surface. Ainsi, pour une détection normale à la surface ( $\theta=0$ ) et une longueur d'atténuation  $\lambda = 1$  nm, 95% des électrons qui s'échappent sans perdre d'énergie proviennent des trois premiers nm. L'AES permet donc d'analyser l'extrême surface des matériaux.

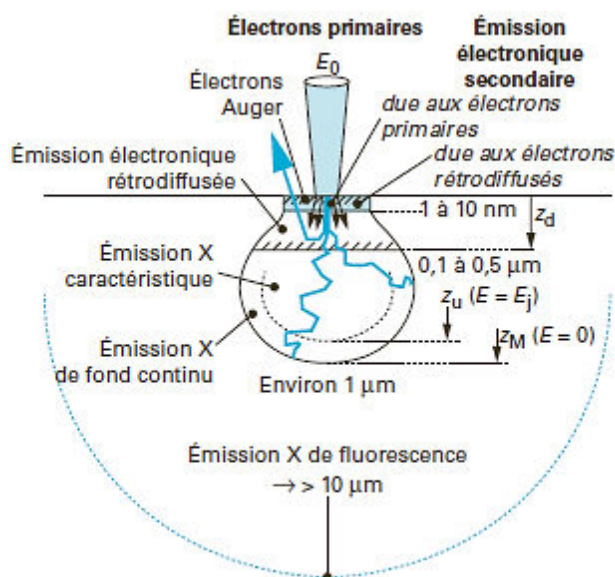


Figure II-30 : Schématisation des différentes zones d'émissions lors de l'interaction électron-matière<sup>[67]</sup>

L'effet Auger correspond donc à un processus de désexcitation non radiatif et se décompose de la manière suivante (Figure II-31) : une particule incidente (électron, photon) éjecte un électron d'un niveau de cœur d'un atome (avec une énergie de liaison  $E_X$ ). La lacune électronique est comblée par un électron moins lié, d'un niveau électronique supérieur (avec une énergie de liaison  $E_Y$ ). L'énergie récupérée est spontanément communiquée à un troisième électron (avec une énergie de liaison  $E_Z$  avant l'éjection) qui est alors éjecté. Cet électron émis est l'électron Auger dont l'énergie cinétique  $E_C$  s'écrit :

$$E_C = E_X - E_Y - E_Z \tag{18}$$

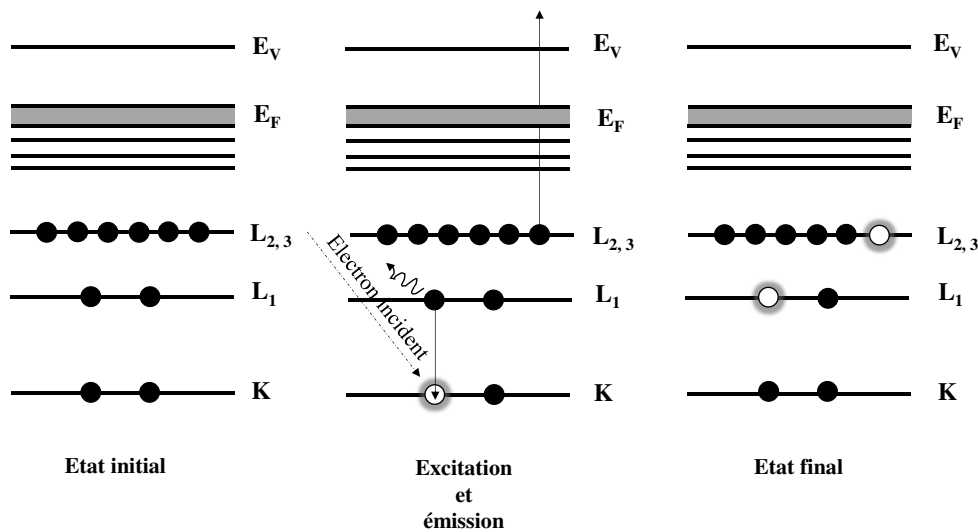


Figure II-31: Processus de désexcitation par effet Auger

Ce processus non radiatif implique donc trois niveaux d'énergie et conduit à un état final doublement ionisé. Dès lors que la lacune électronique est créée, il entre en compétition avec un processus de désexcitation radiatif qui correspond à l'émission d'un photon X n'impliquant que deux niveaux d'énergie et donc l'énergie s'écrit :

$$h\nu = E_X - E_Y \tag{19}$$

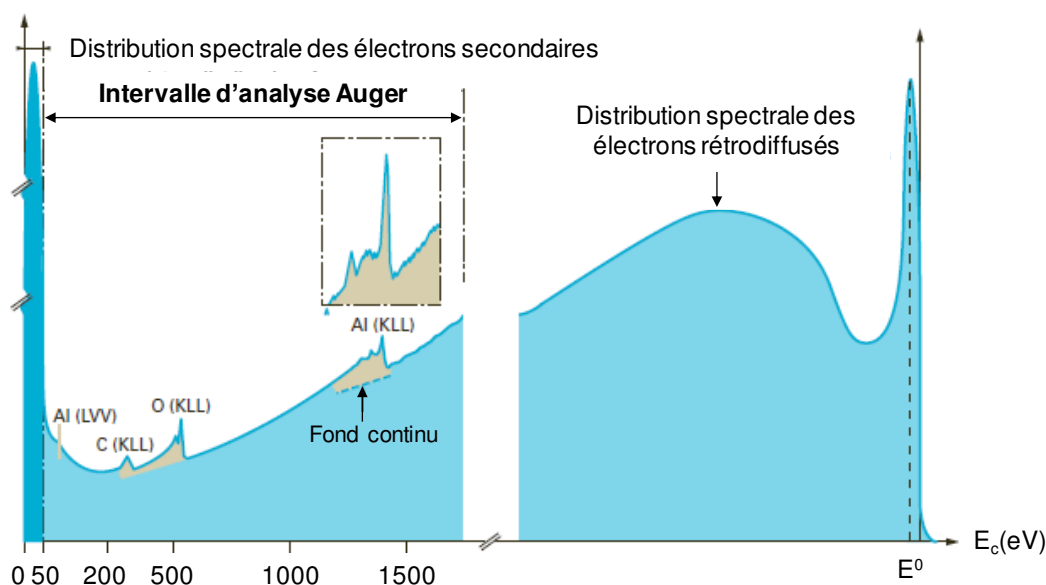
On considère que la probabilité d'éjection d'électrons Auger l'emporte sur la probabilité de désexcitation radiative dès lors que l'énergie de liaison du niveau initial est inférieure à 10 keV (numéro atomique  $Z < 31$ ). De plus, les transitions Auger faisant intervenir trois niveaux d'énergie et deux lacunes, la détection des éléments légers H et He est impossible. Un électron Auger (ou raie Auger) est décrit par les trois niveaux successivement mis en jeu. Dans le cas de la Figure II-31, il y a émission d'un électron  $KL_1L_{2,3}$  :

- la première lettre désigne le niveau de la lacune initiale
- la deuxième lettre, l'origine de l'électron qui comble la lacune
- la troisième lettre, le niveau de l'électron éjecté



En fonction du numéro atomique de l'élément, plusieurs transitions sont possibles et peuvent être induites par cascade jusqu'à des lacunes finales atteignant la bande de valence et impliquant donc un état final multiplement ionisé. Dans ce cas, la lettre V est utilisée pour désigner les niveaux électroniques impliquant la bande de valence.

Le principe de la mesure consiste donc à observer les différentes transitions Auger et mesurer l'énergie cinétique de ces électrons. Les spectres Auger reportent donc l'intensité du signal ( $N(E)$  ou  $EN(E)$ ) en fonction de l'énergie cinétique (généralement reportée de 0 à 2500 eV) où les pics Auger émergent d'un fond continu (Figure II-32). Les raies dont l'énergie cinétique est inférieure à 50 eV, s'inscrivent sur un fond continu décroissant de la distribution spectrale des électrons secondaires. Les raies Auger dont l'énergie cinétique est supérieure à 50 eV s'inscrivent sur un fond continu croissant de la distribution spectrale des électrons rétrodiffusés.



**Figure II-32 : Allure d'un spectre Auger enregistré en mode normal – Contribution du fond continu<sup>[68]</sup>**

L'intervalle d'analyse Auger se situe donc dans le domaine énergétique pour lequel la probabilité d'émission Auger est supérieure à la probabilité d'émission X. L'acquisition des spectres Auger peut s'effectuer en mode dérivé  $dN(E)/dE$  ou  $EdN(E)/dE$  qui permet de s'affranchir du fond continu et faciliter l'exploitation du spectre ou en mode normal  $N(E)$  ou  $EN(E)$  (Figure II-32).

L'identification des éléments s'effectue par comparaison avec des valeurs expérimentales obtenues sur les éléments purs qui sont tabulées et souvent incluses dans les logiciels des appareils. Comme en XPS, l'énergie cinétique est sensible à l'environnement chimique mais étant donné que le phénomène Auger implique trois niveaux d'énergie, l'interprétation est plus complexe. Pour cette raison, la spectroscopie d'électrons Auger est plus généralement utilisée pour l'analyse élémentaire d'échantillon.

Pour un élément A donné, l'intensité du signal Auger  $I_{(i)}$  est proportionnelle à :

$$I_{(i)}^{Auger} \cong I_p \beta_{(i)} FTDR \tag{20}$$

Avec 
$$\beta_{(i)} = N_{(i)} \sigma_{(i)} \gamma_i (1 + r) \lambda \cos \theta \tag{21}$$

Où

- $I_p$  : courant du faisceau d'électron primaire
- $N_{(i)}$  : nombre d'atomes de l'élément i par unité de volume
- $\sigma_{(i)}$  : section efficace d'ionisation du niveau électronique A de l'élément i
- $\gamma_i$  : probabilité de la transition Auger ABC de l'élément i
- $\lambda_A$  : libre parcours moyen
- r : ionisation secondaire pour le niveau A de l'élément i par les électrons diffusés
- $\theta$  : angle d'émission entre l'électron Auger et la normale de la surface
- F : angle solide d'acceptance de l'analyseur
- T : fonction de transmission de l'analyseur
- D : efficacité du détecteur
- R : facteur de rugosité de surface ( $0 < R < 1$ )

La probabilité d'une transition Auger et le libre parcours moyen inélastique des électrons Auger sont indépendants de l'énergie du faisceau incident, l'intensité du pic Auger est principalement gouvernée par la section efficace d'ionisation qui change avec l'énergie d'irradiation<sup>[69]</sup>. La Figure II-33 illustre ce phénomène où deux sources d'énergie différente conduisent à des spectres différents. A 30 keV, la section efficace d'ionisation de l'or (niveau M) est plus importante qu'à 10 keV (pour laquelle la section efficace d'ionisation du niveau N devient prédominante).

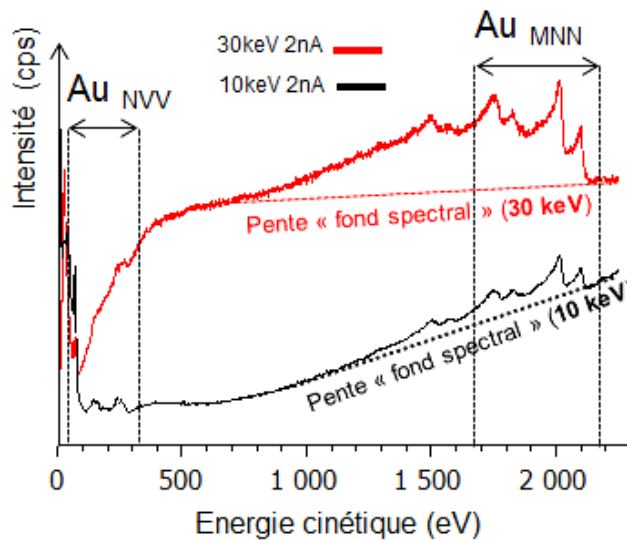


Figure II-33 : Influence des conditions d'excitation pour une référence d'or : spectres AES à 10 et 30 keV

La principale difficulté en Auger réside dans l'optimisation des conditions d'acquisition qui dépendent de chaque échantillon. L'idée est de trouver un compromis entre :

- une bonne sensibilité (d'autant plus grande que  $I_0$  est grand et que  $\sigma(i)$  est optimisé) ;
- une bonne résolution latérale (relié au diamètre de la sonde qui est d'autant plus faible que  $I_0$  est faible et que  $E_0$  est grand) ;
- des effets de charge limités ;
- des effets de dérive contrôlés (mécanique, électronique, thermique ...) ;
- un temps d'acquisition raisonnable ;
- une limitation de la dose reçue (limitation des dégâts d'irradiation).

Les conditions d'excitation qui doivent être optimisées sont<sup>[68,70,71]</sup> :

- la tension  $E_0$  qui influence la section efficace d'ionisation, la pente du fond spectral (Figure II-33) mais également la qualité de l'image MEB (résolution spatiale) ;
- le courant  $I_0$  qui a une influence sur la sensibilité et sur la résolution latérale ;
- la géométrie (angle de tilt), le temps d'acquisition et la vitesse de scan.

La quantification par AES peut naturellement utiliser l'aire des pics Auger obtenus sur le spectre acquis en mode normal (Figure II-32). Néanmoins, la soustraction du fond continu étant délicate en raison de sa nature complexe, la quantification peut également s'appuyer sur les hauteurs pic à pic, ou intensités Auger mesurées sur le spectre dérivé. Pour ces deux approches, le calcul des concentrations des différents éléments présents nécessite alors l'utilisation de facteurs de sensibilité, ou Relative Sensitivity Factors (RSFs). Il existe plusieurs méthodes pour déterminer ces coefficients et en général, il est admis que la quantification par spectroscopie Auger est précise à  $\pm 5\%$ .

## b. Conditions expérimentales d'analyse

Les analyses en spectroscopie d'électrons Auger ont été réalisées avec un spectromètre Auger JEOL JAMP 9500F (JEOL Ltd, Tokyo, Japon) fonctionnant sous ultra-vide ( $P < 2 \times 10^{-7}$  Pa). L'enceinte ultra-vide est équipée d'une source à émission de champ du type Schottky à l'origine d'une très bonne résolution spatiale et d'une excellente brillance. Un analyseur hémisphérique couplé à un détecteur multicanaux (7 channeltrons) offrent des conditions idéales pour des analyses Auger résolues en énergie.

Deux modes sont accessibles pour mesurer l'énergie cinétique des électrons : un mode d'analyse à énergie constante (CAE : Constant Absolute resolution) ou à énergie relative  $\Delta E/E$  constante (CRR : Constant Retarding Resolution). Les expériences classiques AES sont généralement enregistrées dans le mode CRR, pour lequel la résolution en énergie ( $\Delta E$ ) augmente linéairement avec l'énergie de l'électron mesurée (la fenêtre d'énergie passante (liée à la « Pass energy » et donc à la résolution) varie afin de maintenir un rapport  $\Delta E/E$  constant). Les spectres sont présentés en mode normal EN(E) (mode non-dérivé qui s'exprime comme le signal de sortie

du détecteur d'électrons utilisant le comptage que multiplie l'énergie cinétique versus l'énergie cinétique). Les spectres généraux AES ( $E_c$  variant de 0 à 2500 eV) ont été enregistrés en utilisant une source focalisée et le mode CRR avec un  $\Delta E/E = 0,5 \%$  (haute sensibilité).

Les acquisitions Auger en balayage (linescan et/ou images) ont été enregistrées en mode CAE afin de définir la fenêtre d'énergie nécessaire à l'obtention d'une différence pic-fond en intensité significative par rapport aux transitions Auger et à la forme du bruit de fond. Différents paramètres tels que la configuration du porte-échantillon par rapport à la position du détecteur (angle de tilt), les conditions de multi-détection (nombre de channeltrons utilisés), le temps d'acquisition et la vitesse de balayage ont nécessité une phase d'optimisation très importante. Ce travail s'est matérialisé par un article spécifique (*Nanoscale*, **2014**, 6, 11130)<sup>[72]</sup>.

Un léger décapage utilisant des ions  $Ar^+$  de faible énergie a été utilisé afin d'éliminer la contamination de surface de l'échantillon avant analyse. Les paramètres de décapage tels que l'énergie du faisceau d'ions (500 eV), le courant ionique total (0,1  $\mu A$ ), le temps de décapage (60 s) et la rotation compucentrique ont été finement ajustés afin d'éviter un décapage préférentiel, de minimiser la rugosité induite à la surface de l'échantillon et limiter la dégradation chimique de l'échantillon.

Un système de correction de signal intégré du type « probe tracking » a été utilisé afin de contrôler et de compenser les éventuelles dérives dues principalement à l'équilibre des effets de charge de surface de l'échantillon mais aussi aux fluctuations liées à l'instrument (vibrations, variation de champ électrique et électromagnétique, dissipation de chaleur des échantillons, etc...). Les clichés SAM et MEB réalisés sur le même spectromètre ont été enregistrés et systématiquement comparés à l'image référence initiale afin d'évaluer la dérive totale.

### c. Préparation de l'échantillon

Les nanoparticules ont été sectionnées à l'aide d'un appareil de polissage ionique transverse par faisceau ionique du type JEOL Cross-Polisher (JEOL Ltd, Tokyo, Japon). Les nanoparticules ont dans un premier temps été dispersées au sein d'une laque de carbone ; l'ensemble a ensuite été déposé sur un wafer de silicium de 5 mm<sup>2</sup>. La découpe est réalisée via un faisceau ionique d' $Ar^+$  (pression de travail :  $1 \times 10^{-4}$  Pa, énergie du faisceau ionique variant de 1 à 6 keV, courant ionique d'environ 120  $\mu A$ ). Ce procédé de polissage ionique conduit à des surfaces parfaitement planes avec un minimum de dommage à l'échantillon (texture préservée) étant donné l'angle voisin de 90° entre le faisceau et la surface de l'échantillon (Figure II-34.a). Le masque bloque environ 50 % du faisceau primaire protégeant ainsi la partie principale de l'échantillon et conduisant à un coin érodé de l'échantillon. La Figure II-34-b montre une vue large obtenue en MEB de la surface polie (plan X, Y) d'un wafer de silicium. Les dimensions de la surface érodée sont typiquement de l'ordre de 700  $\mu m$  (X) x 400  $\mu m$  (Y) x 40  $\mu m$  (Z). Par comparaison avec un faisceau d'ions  $Ga^+$  utilisé classiquement dans les FIB (Focused Ion Beam), le faisceau d'ions  $Ar^+$  est de faible énergie (1-6 keV au lieu de 10-30 keV pour un FIB) et à incidence rasante (typiquement 2° par rapport à la surface au lieu de 30-45° dans le cas du FIB).

Cette technique est dès lors moins invasive pour l'échantillon (rugosité induite limitée) et l'implantation d'ions  $\text{Ar}^+$  sur la surface érodée est très limitée (pas de mélange atomique)<sup>[71]</sup>.

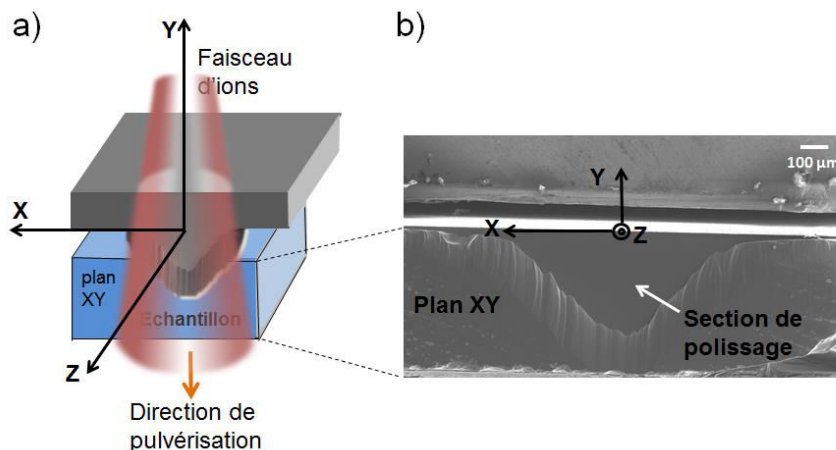


Figure II-34 : a) Vue schématique du procédé de découpe : le côté de l'échantillon non protégé par le masque est poli par le faisceau d'ions  $\text{Ar}^+$  ; b) Image MEB d'un wafer de silicium après découpe ionique (plan XY)

## d. Résultats

### i Morphologie des nanoparticules

Lorsque l'énergie du faisceau incident est importante (30 keV), deux matériaux se distinguent par contraste d'électrons secondaires induit par les électrons rétrodiffusés : un cœur qui apparaît brillant et une coquille plus sombre (Figure II-35.a). Fondamentalement, le contraste en électrons secondaires des nanoparticules se décompose en un signal qui provient directement de la surface (contraste topographique) induit par le faisceau primaire et un signal additionnel indirect en électrons secondaires induit par les électrons primaires rétrodiffusés (Figure II-35.b).

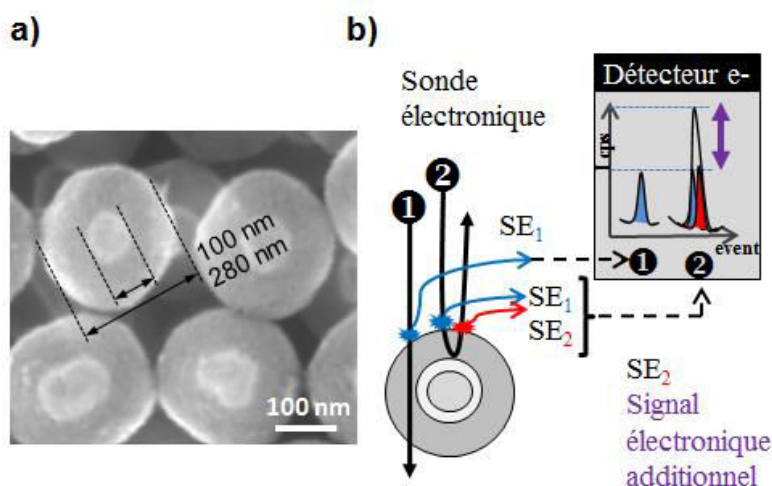
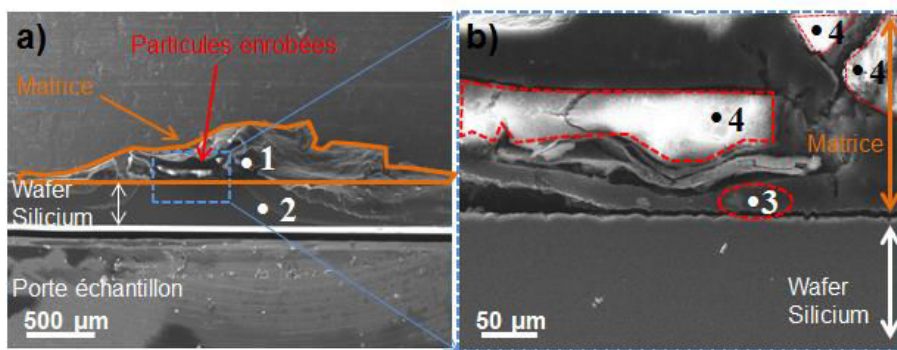


Figure II-35 : a) Image MEB (30 keV) des nanoparticules NS@mSi non sectionnées ; b) Schématisation de l'origine du contraste « Z » du cœur pour une nanoparticule cœur-coquille : électrons secondaires issus du faisceau électronique primaire ( $\text{SE}_1$ ) et électrons secondaires induit par les électrons primaires rétrodiffusés ( $\text{SE}_2$ )

Le contraste montre donc une densité d'électrons plus importante pour le cœur que pour la coquille en accord avec la composition métal@SiO<sub>2</sub> des nanoparticules. De plus, le cœur des nanoparticules étant creux, le centre apparaît plus sombre sur l'image MEB.

Dans le but de caractériser plus précisément la morphologie et la composition du cœur et de l'interface cœur-coquille, les nanoparticules ont ensuite été coupées.

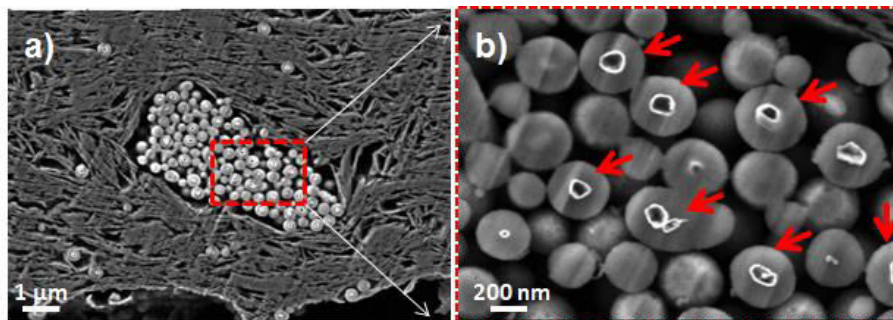
La Figure II-36.a présente une vue large de microscopie MEB de la zone sectionnée avec de façon différenciée la matrice de carbone (point 1) et le wafer de silicium (point 2) sur laquelle cette dernière est déposée. Un zoom de la zone centrale (carré bleu) (Figure II-36.b) révèle une surface plane bien définie près du point 3 qui semble ne pas être affectée par des effets de charge (peu de nanoparticules diluées dans la matrice de carbone) à l'inverse des gros agglomérats près du point 4 (concentration en nanoparticules importante d'où le contraste élevé).



**Figure II-36 : a) Image MEB de l'échantillon de nanoparticules découpé et b) Zoom de la zone centrale (rectangle bleu)**

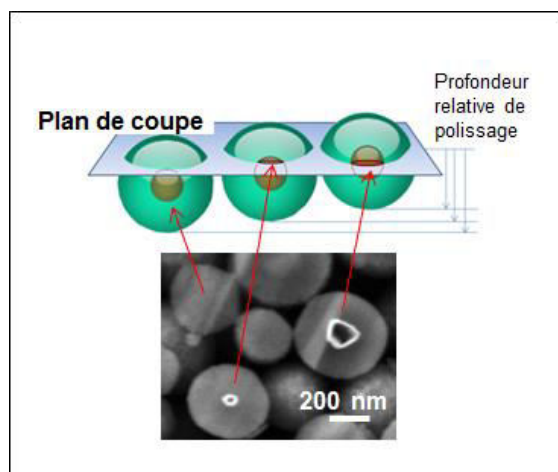
La principale difficulté expérimentale de ce procédé est de créer une coupe qui contient suffisamment de nanoparticules sectionnées. En effet, en fonction du nombre de nanoparticules diluées dans la matrice et de la façon dont le plan de coupe intercepte les particules au hasard dans la résine, le procédé conduit statistiquement à des nanoparticules idéalement coupées en leur milieu ainsi qu'à des nanoparticules coupées aléatoirement à différents niveaux.

L'autre challenge est de définir sur la coupe, une zone d'intérêt appropriée qui contient une densité convenable de nanoparticules « bien » sectionnées (demi-sphères). Les images MEB à plus fort grossissement mettent en évidence l'inclusion de plusieurs nanoparticules près du wafer de Si (Figure II-37). Seulement quelques nano-objets sont idéalement coupés (Figure II-37.b).



**Figure II-37 : a) Image MEB d'une inclusion de nanoparticules coupées dans la matrice carbonée ; b) Zoom sur la zone encadrée en rouge : les flèches montrent des nanoparticules idéalement sectionnées**

La Figure II-38 illustre parfaitement les différents plans de découpes dans le cas d'un petit agrégat de nanoparticules. Les nanoparticules localisées au-dessus ou en dessous du plan de coupe apparaissent comme une simple sphère sans perception possible de la structure du cœur du fait des conditions d'analyse (2,5 keV). De plus selon le plan de coupe, le diamètre du cœur mesuré est modifié en accord avec la géométrie sphérique des nanoshells.



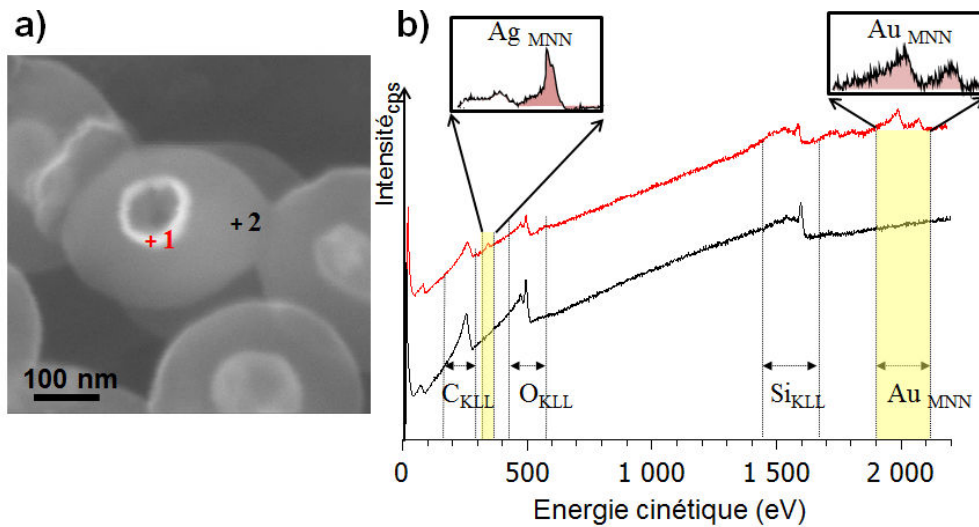
**Figure II-38 : Correspondance entre les vues schématiques de découpe des nanoparticules et les images MEB enregistrées à 2,5 keV**

## ii Composition de surface des nanoparticules

La « découpe » des nanoparticules a par la suite pu être confirmée par des analyses  $\mu$ XPS (spot de  $15\mu\text{m}$  de diamètre). En effet, l'or et l'argent, absent lors de l'analyse initiale des nanoparticules, ont pu dès lors être détectés. De plus, la nature métallique du cœur et silicique de la coquille a été confirmée. L'XPS est bien plus résolue chimiquement mais limitée par la résolution spatiale même avec des faibles diamètres de faisceau incident. De ce fait, les nanoparticules coupées ont été caractérisées en Spectroscopie d'électrons Auger afin de tirer profit de la résolution spatiale de cette technique pour décrire la composition élémentaire du cœur des nanoparticules.

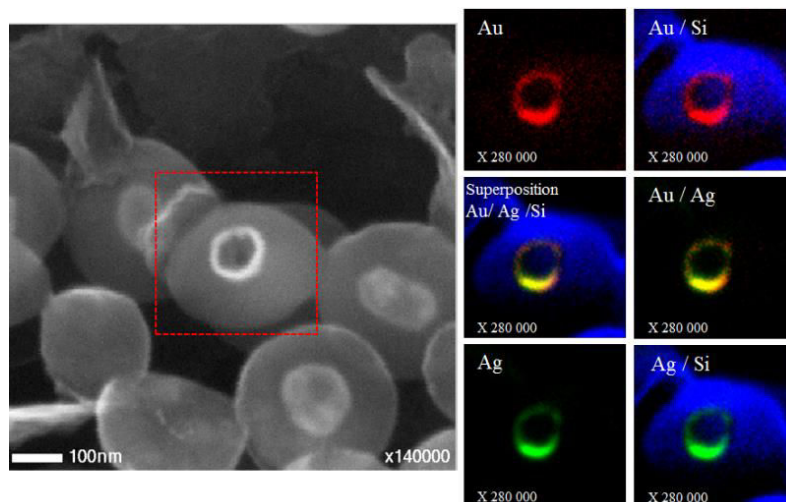
Dans un premier temps, un spectre général Auger a été enregistré en différents points sur une nanoparticule coupée. La Figure II-39 montre le cliché MEB à fort grossissement ainsi que les spectres Auger associés en deux points caractéristiques : le cœur des nanoparticules (point 1) et la coquille (point 2).

L'analyse au point 1 montre sans ambiguïté les transitions  $\text{Ag}_{\text{MNN}}$ ,  $\text{O}_{\text{KLL}}$ ,  $\text{C}_{\text{KLL}}$ ,  $\text{Au}_{\text{MNN}}$  et  $\text{Si}_{\text{KLL}}$  qui mettent en évidence la détection du cœur métallique ainsi que du bord de la coquille de  $\text{SiO}_2$ . Par ailleurs, seuls le silicium, l'oxygène et le carbone sont détectés au point 2 attestant ainsi la composition de la coquille de silice. Pour ces analyses, le diamètre du faisceau d'électrons est estimé à environ 5 nm dans ces conditions d'excitation (30,0 keV, 2nA) avec un diamètre d'émission AES de 12 nm. Ainsi, la résolution spatiale associée à la technique permet d'apprécier la composition chimique à l'échelle nanométrique.



**Figure II-39 : Analyse au point 1 (rouge) et au point 2 (noir) sur la section d’une nanoparticule : a) Image MEB et b) le spectre général AES**

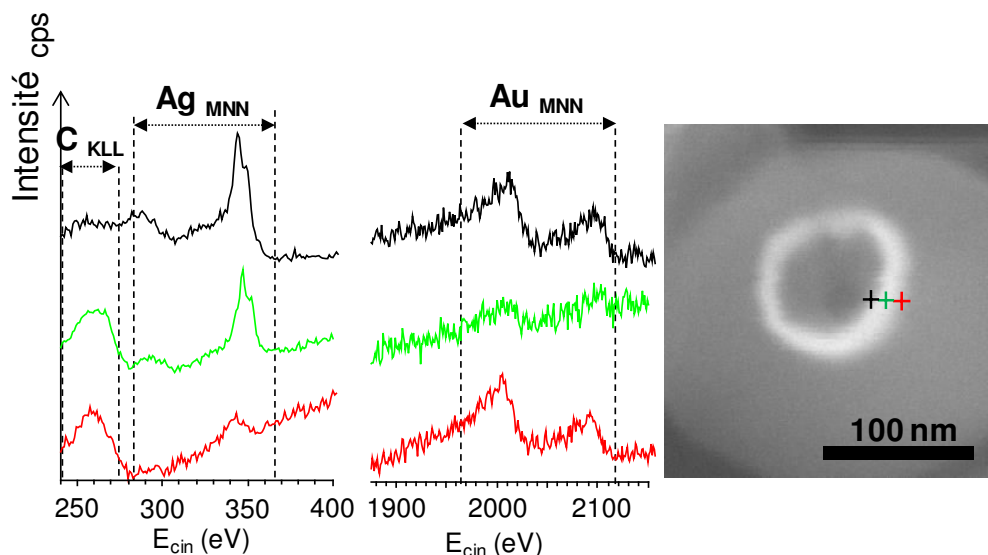
Les cartographies chimiques élémentaires des espèces détectées permettent d’évaluer leur distribution spatiale. La superposition en couleurs RGB (superposition des intensités relatives Auger en fausses couleurs Rouge, Vert, Bleu) est présentée en Figure II-40 pour chaque élément constitutif ainsi que l’image MEB associée. Les résultats obtenus montrent l’association de l’argent (rouge) et de l’or (vert) au niveau du cœur tandis que la coquille est uniquement constituée de silice (bleu) en accord avec les spectres précédents.



**Figure II-40 : Cartographie Auger haute résolution de la section d’une nanoparticule Ag-Au@SiO<sub>2</sub> (zone rouge de l’image MEB)- Superposition en couleurs RGB de l’Au (rouge), de l’Ag (vert) et du Si (bleu)**



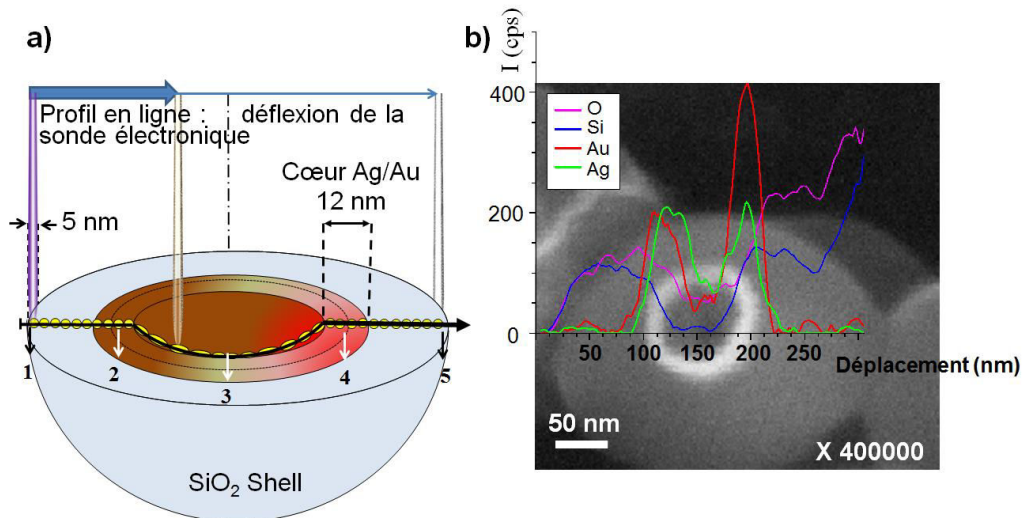
Afin de comprendre davantage la structuration du cœur bimétallique, des spectres Auger en différents points de la nanoshell ont été collectés (sur la surface interne, au milieu et sur la surface externe) (Figure II-41).



**Figure II-41 : Spectres Auger a) Ag<sub>MNN</sub> et b) Au<sub>MNN</sub> enregistrés en trois positions repérées sur c) l'image MEB. Les points noir, vert et rouge sur l'image MEB correspondent respectivement à l'intérieur, au milieu et à l'extérieur des nanoshells.**

La superposition des spectres Ag<sub>MNN</sub> et Au<sub>MNN</sub> aux trois positions sondées montre une distribution hétérogène des éléments. L'or et l'argent sont détectés quelle que soit la position mais il semblerait que la concentration en or soit plus importante sur la surface externe (rouge) tandis que l'argent est détecté de manière plus significative au centre et sur la surface interne. Cette première analyse montre le potentiel analytique de la spectroscopie Auger sur des zones d'intérêt de taille nanométrique. Pour corroborer ces résultats et essayer de mieux appréhender la composition du cœur, une expérience supplémentaire en mode « linescan » a été réalisée. Cette méthode offre la possibilité d'améliorer significativement le rapport signal sur bruit (temps plus grand par point analysé) et de limiter la dégradation sous le faisceau, l'analyse complète étant plus courte qu'une cartographie 2D.

Le profil d'analyse linéaire s'effectue en récupérant en continu l'intensité du pic AES soustraite de celle du bruit de fond le long du diamètre de section (Figure II-42). Le déplacement de la sonde relatif au « linescan » est défini à partir de l'image MEB (flèche horizontale sur la Figure II-42.b). La variation de l'intensité du signal AES pour chaque élément détecté (Si<sub>KLL</sub>, O<sub>KLL</sub>, Au<sub>MNN</sub> et Ag<sub>MNN</sub>) a été enregistrée puis superposée à l'image MEB pour une meilleure visualisation de la répartition quantitative. Dans les conditions d'analyses, la résolution spatiale expérimentale Auger a été évaluée, inférieure à 12 nm.



**Figure II-42: Analyse Auger en mode linescan de la section d'une nanoparticule Ag-Au@SiO<sub>2</sub> : a) Schématisation du déplacement de la sonde pendant l'expérience; b) Superposition des profils AES des éléments le long de la ligne avec l'image MEB correspondante**

La compilation des données collectées le long de la section transverse de la nanoparticule mettent en évidence :

- Une évolution des signaux comparables pour les éléments silicium et oxygène localisés au niveau de la coquille.
- Une variation d'intensité du signal en sortie du linescan pour ces deux mêmes éléments qui peut être due à une participation des particules en dessous ainsi qu'à l'inclinaison de la surface
- L'absence de silicium dans la région creuse des nanoshells
- La similitude de signaux relatifs aux atomes d'or et d'argent au niveau des parois des nanoshells résultant de la formation d'un alliage
- Une variation de l'intensité relative du signal des atomes d'or et d'argent selon la position qui met en évidence l'hétérogénéité de l'alliage avec une surface externe des parois des nanoshells plus concentrée en or.

La « découpe » des nanoparticules couplée à l'analyse en spectroscopie d'électrons Auger nous a donc permis d'étudier la distribution élémentaire de l'argent et de l'or au sein des nanoshells. En effet la résolution spatiale associée à cette technique donne des informations précieuses sur la composition du matériau tandis que l'XPS permet de confirmer l'environnement chimique. Les nanoshells synthétisées à température ambiante seraient donc constituées d'un alliage Ag-Au relativement hétérogène. Ce résultat est en accord avec les précédentes observations de microscopie électronique où les nanoshells présentent des caractéristiques du phénomène de « dealloying » ainsi qu'avec la comparaison des résultats quantitatifs du rapport Ag/Au calculé en XPS et en ICP-MS.

## CONCLUSION

Au cours de ce chapitre, la synthèse et la caractérisation de nanoparticules sphériques d'or creuses ont été étudiées.

Une première phase d'optimisation nous a permis d'évaluer l'influence de plusieurs paramètres de synthèse sur la morphologie et la structure des objets. En particulier, la modification de la spéciation du sel d'or utilisé nous a permis d'obtenir à température ambiante des nanostructures creuses tout en évitant la précipitation d'AgCl à la surface. Dans ces conditions, la résonance plasmon des nanoparticules a pu être directement modulée via le rapport molaire Ag/sel d'or. Nous avons également pu mettre en évidence que la modulation des propriétés optiques était directement reliée à l'évolution de la morphologie des nanoshells au cours du remplacement galvanique. Finalement, les nanoparticules synthétisées sont caractérisées par une fréquence de résonance plasmon spécifique dans la fenêtre biologique et présentent des propriétés photothermiques évidentes qui en font des matériaux de choix pour des applications en nanomédecine.

Par ailleurs, la comparaison avec les travaux de la littérature nous a amené à mieux comprendre la mécanistique au cœur de l'élaboration de ces nanostructures et donc à conclure dans un premier temps sur la nature chimique des nanoparticules synthétisées.

Dans la suite du travail, des analyses XPS ont été réalisées au cours du remplacement galvanique afin d'évaluer la composition chimique des nano-objets. Nous avons ainsi pu mettre en évidence le processus d'oxydation incomplet des nanoparticules d'argent gabarits mais également la réduction du sel d'or à leur surface. Cependant, les informations chimiques déduites de l'XPS traduisant l'extrême surface, la formation d'un alliage n'a pu être discutée. Par conséquent, la coupe transverse des nanoparticules par faisceau ionique s'est finalement révélée être une opportunité déterminante. En effet, les résultats déduits de l'analyse Auger mettent en évidence la formation d'un alliage en accord avec les caractéristiques morphologiques et structurales repérées sur les images de microscopie électronique et qui traduisent le phénomène « dealloying ». Cependant, l'alliage Ag-Au formé est caractérisé par une distribution élémentaire assez hétérogène d'après les spectres AES, certainement dû au fait des synthèses réalisées à température ambiante.

A travers cette étude, nous avons apporté des éléments significatifs du potentiel des spectroscopies d'électrons pour l'analyse de systèmes nanométriques. L'XPS semble idéale pour déterminer précisément l'environnement chimique des atomes composant une collection de nanoparticules. L'AES, dont l'information est plus résolue spatialement, est un outil adapté au sous-dimensionnement des systèmes étudiés, en l'occurrence à l'échelle du nanomètre.

**REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

- [1] Y. Sun, B. T. Mayers, Y. Xia, *Nano Lett.* **2002**, 2, 481.
- [2] H. H. Huang, X. P. Ni, G. L. Loy, C. H. Chew, K. L. Tan, F. C. Loh, J. F. Deng, G. Q. Xu, *Langmuir* **1996**, 12, 909.
- [3] A. Henglein, M. Giersig, *J. Phys. Chem. B* **1999**, 103, 9533.
- [4] L.-P. Jiang, S. Xu, J.-M. Zhu, J.-R. Zhang, J.-J. Zhu, H.-Y. Chen, *Inorg. Chem.* **2004**, 43, 5877.
- [5] A. Pal, S. Shah, S. Devi, *Mater. Chem. Phys.* **2009**, 114, 530.
- [6] N. G. Bastús, F. Merkoçi, J. Piella, V. Puntès, *Chem. Mater.* **2014**, 26, 2836.
- [7] X. Dong, X. Ji, H. Wu, L. Zhao, J. Li, W. Yang, *J. Phys. Chem. C* **2009**, 113, 6573.
- [8] F. Fievet, J. P. Lagier, M. Figlarz, *Mater. Res. Soc. Bull.* **1989**, 14, 29.
- [9] J. Turkevich, P. C. Stevenson, J. Hillier, *Discuss. Faraday Soc.* **1951**, 11, 55.
- [10] P. C. Lee, D. Meisel, *J Phys Chem* **1982**, 86, 3391.
- [11] C. H. Munro, W. E. Smith, M. Garner, J. Clarkson, P. C. White, *Langmuir* **1995**, 11, 3712.
- [12] V. K. LaMer, R. H. Dinegar, *J. Am. Chem. Soc.* **1950**, 72, 4847.
- [13] V. N. Richards, N. P. Rath, W. E. Buhro, *Chem. Mater.* **2010**, 22, 3556.
- [14] D. L. Van Hying, W. G. Klemperer, C. F. Zukoski, *Langmuir* **2001**, 17, 3128.
- [15] Z. S. Pillai, P. V. Kamat, *J. Phys. Chem. B* **2004**, 108, 945.
- [16] D. S. Kilin, O. V. Prezhdo, Y. Xia, *Chem. Phys. Lett.* **2008**, 458, 113.
- [17] D. D. Evanoff, G. Chumanov, *J. Phys. Chem. B* **2004**, 108, 13948.
- [18] D. D. Evanoff, G. Chumanov, *J. Phys. Chem. B* **2004**, 108, 13957.
- [19] K. L. Kelly, E. Coronado, L. L. Zhao, G. C. Schatz, *J. Phys. Chem. B* **2003**, 107, 668.
- [20] G. Mie, *Ann. Phys.* **1908**, 330, 377.

- [21] D. R. Lide, H. P. R. Frederikse, Eds. , *CRC Handbook of Chemistry and Physics*, CRC-Press, **1997**.
- [22] Y. Sun, Y. Xia, *J Am Chem Soc* **2004**, *126*, 3892.
- [23] V. Vongsavat, B. M. Vittur, W. W. Bryan, J.-H. Kim, T. R. Lee, *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2011**, *3*, 3616.
- [24] P. J. Murphy, M. S. LaGrange, *Geochim. Cosmochim. Acta* **1998**, *62*, 3515.
- [25] S. Wang, K. Qian, X. Bi, W. Huang, *J. Phys. Chem. C* **2009**, *113*, 6505.
- [26] I. Lampre, P. Pernot, M. Mostafavi, *J. Phys. Chem. B* **2000**, *104*, 6233.
- [27] S. J. Oldenburg, R. D. Averitt, S. L. Westcott, N. J. Halas, *Chem. Phys. Lett.* **1998**, *288*, 243.
- [28] D. R. Baer, M. H. Engelhard, *J. Electron Spectrosc. Relat. Phenom.* **2010**, *178–179*, 415.
- [29] A. Frydman, D. G. Castner, M. Schmal, C. T. Campbell, *J. Catal.* **1995**, *157*, 133.
- [30] A. G. Shard, J. Wang, S. J. Spencer, *Surf. Interface Anal.* **2009**, *41*, 541.
- [31] S.-T. Lee, G. Apai, M. G. Mason, R. Benbow, Z. Hurych, *Phys. Rev. B* **1981**, *23*, 505.
- [32] A. K. Pradhan, S. N. Nahar, M. Montenegro, Y. Yu, H. L. Zhang, C. Sur, M. Mroziak, R. M. Pitzer, *J. Phys. Chem. A* **2009**, *113*, 12356.
- [33] G. K. Wertheim, S. B. DiCenzo, *Phys. Rev. B* **1988**, *37*, 844.
- [34] S. Shukla, S. Seal, *Nanostructured Mater.* **1999**, *11*, 1181.
- [35] D.-Q. Yang, E. Sacher, *Appl. Surf. Sci.* **2002**, *195*, 187.
- [36] P. H. Citrin, G. K. Wertheim, Y. Baer, *Phys. Rev. Lett.* **1978**, *41*, 1425.
- [37] J. Radnik, C. Mohr, P. Claus, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2003**, *5*, 172.
- [38] L. Qiu, F. Liu, L. Zhao, W. Yang, J. Yao, *Langmuir* **2006**, *22*, 4480.
- [39] S. Myrha, J. C. Riviere, *Handbook of Surface and Interface Analysis: Method for Problem-Solving*, Marcel Dekker, Inc., New York, **1998**.
- [40] D. Q. Yang, J.-N. Gillet, M. Meunier, E. Sacher, *J. Appl. Phys.* **2005**, *97*, 24303.

- [41] R. Phillips, S. Quake, *Phys. Today* **n.d.**, 59, 38.
- [42] M. J. Yacamán, J. A. Ascencio, H. B. Liu, J. Gardea-Torresdey, *J. Vac. Sci. Technol. B* **2001**, 19, 1091.
- [43] S. V. N. T. Kuchibhatla, A. S. Karakoti, D. R. Baer, S. Samudrala, M. H. Engelhard, J. E. Amonette, S. Thevuthasan, S. Seal, *J. Phys. Chem. C* **2012**, 116, 14108.
- [44] J. E. Fulghum, R. W. Linton, *Surf. Interface Anal.* **1988**, 13, 186.
- [45] J. E. Fulghum, R. W. Linton, *J. Electron Spectrosc. Relat. Phenom.* **1989**, 49, 101.
- [46] P. L. J. Gunter, O. L. J. Gijzeman, J. W. Niemantsverdriet, *Appl. Surf. Sci.* **1997**, 115, 342.
- [47] W. S. M. Werner, *Surf. Interface Anal.* **1995**, 23, 737.
- [48] ASTM E1078-44, *Standard Guide for Specimen Preparation and Mounting in Surface Analysis*, West Conshohocken, PA, **2014**.
- [49] ISO 18116: 2005, *Surface Chemical Analysis- Guidelines for Preparation and Mounting of Specimens for Analysis*, International Organization For Standardization, Geneva, Switzerland, **2005**.
- [50] A. Dane, U. K. Demirok, A. Aydinli, S. Suzer, *J. Phys. Chem. B* **2006**, 110, 1137.
- [51] T. J. Norman, C. D. Grant, D. Magana, J. Z. Zhang, J. Liu, D. Cao, F. Bridges, A. Van Buuren, *J. Phys. Chem. B* **2002**, 106, 7005.
- [52] B. M. Reinhard, M. Siu, H. Agarwal, A. P. Alivisatos, J. Liphardt, *Nano Lett.* **2005**, 5, 2246.
- [53] D. A. Schwartz, N. S. Norberg, Q. P. Nguyen, J. M. Parker, D. R. Gamelin, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 13205.
- [54] B. L. Frankamp, A. K. Boal, M. T. Tuominen, V. M. Rotello, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 9731.
- [55] M. Bayer, P. Hawrylak, K. Hinzer, S. Fafard, M. Korkusinski, Z. R. Wasilewski, O. Stern, A. Forchel, *Science* **2001**, 291, 451.
- [56] D. A. Shirley, *Phys. Rev. B* **1972**, 5, 4709.
- [57] J. H. Scofield, *J. Electron Spectrosc. Relat. Phenom.* **1976**, 8, 129.
- [58] P. Zhang, T. K. Sham, *Phys. Rev. Lett.* **2003**, 90, DOI 10.1103/PhysRevLett.90.245502.
- [59] S. W. Gaarenstroom, N. Winograd, *J. Chem. Phys.* **1977**, 67, 3500.

- [60] V. K. Kaushik, *J. Electron Spectrosc. Relat. Phenom.* **1991**, 56, 273.
- [61] A. M. Ferraria, A. P. Carapeto, A. M. Botelho do Rego, *Vacuum* **2012**, 86, 1988.
- [62] A. Barrie, N. E. Christensen, *Phys. Rev. B* **1976**, 14, 2442.
- [63] K. Kishi, S. Ikeda, *J. Phys. Chem.* **1974**, 78, 107.
- [64] G. E. Jean, B. G. Michael, *Geochim. Cosmochim. Acta* **1985**, 49, 979.
- [65] J. R. Mycroft, G. M. Bancroft, N. S. McIntyre, J. W. Lorimer, *Geochim. Cosmochim. Acta* **1995**, 59, 3351.
- [66] A. Bzowski, M. Kuhn, T. K. Sham, J. A. Rodriguez, J. Hrbek, *Phys. Rev. B* **1999**, 59, 13379.
- [67] H. Paqueton, J. RUSTE, *Microscopie électronique à Balayage*, Ed. Techniques Ingénieur, **2004**.
- [68] J. Cazaux, *Tech. Ing. Anal. Caractér.* **2007**.
- [69] C. S. Campos, M. A. Z. Vasconcellos, J. C. Trincavelli, S. Segui, *J. Phys. B At. Mol. Opt. Phys.* **2007**, 40, 3835.
- [70] M. P. Seah, I. S. Gilmore, *Surf. Interface Anal.* **1998**, 26, 723.
- [71] K. Tsutsumi, *JEOL News Electron Opt. Instruments* **2006**, 41, 46.
- [72] J. B. Ledeuil, A. Uhart, S. Soulé, J. Allouche, J. C. Dupin, H. Martinez, *Nanoscale* **2014**, 6, 11130.

**ANNEXES**Annexe II.1 : Résultats des analyses quantitatives XPS

	<b>AgCl</b>	<b>HAuCl<sub>4</sub></b>	<b>NPs Ag</b>	<b>NS(8)</b>	<b>NS(5)</b>	<b>NS(3)</b>	<b>NS(1)</b>
% at. C	32,3	33,0	36,8	32,3	34,8	33,3	33,0
% at. O	7,5	3,4	13,8	17,5	12,8	14,5	9,8
% at. Ag	27,8	-	46,1	29,8	28,0	25,4	21,5
% at. Cl	32,4	45,2	1,8	10,9	11,8	13,2	20,9
% at. Au	-	15,9	-	4,8	6,6	8,6	10,5
% at. N	-	2,5	-	4,1	5,2	4,8	4,1
% at. Na	-	-	1,5	0,6	0,8	0,2	0,2



# CHAPITRE III.

ASSEMBLAGES Au@SiO<sub>2</sub>

HYBRIDES

MULTIFONCTIONNELS



## INTRODUCTION

Ce chapitre concerne l'élaboration de la coquille de silice mésoporeuse autour des cœurs (bi)métalliques et sa fonctionnalisation. Il s'agit *in fine* d'élaborer des nanosystèmes dont l'intérêt principal en termes d'applications en nanomédecine réside dans la combinaison des propriétés photothermiques du cœur, avec la fonction dite « réservoir » du réseau mésoporeux permettant l'encapsulation d'un principe actif. L'efficacité thérapeutique de tels systèmes nécessite par conséquent une activation et un contrôle précis de la libération du principe actif pouvant être obtenus par la fonctionnalisation de la surface des particules par des nanovalves organiques thermosensibles.

L'objectif est de ce travail est donc (i) de construire une coquille offrant un réseau poreux organisé pour l'encapsulation d'un principe actif et (ii) de modifier la surface des nanoparticules par des assemblages supramoléculaires thermo-stimulables du type [2]pseudorotaxanes. Cette modification de surface est basée sur des systèmes mécanisés déjà reportés dans la littérature et dont le fonctionnement est fondé sur des processus de complexation/décomplexation entre une entité moléculaire greffée à la surface des nanoparticules, et une entité macromoléculaire.

Dans ce contexte, la description physico-chimique complète de ces systèmes est nécessaire pour optimiser leur fonctionnement et donc envisager leur utilisation en nanomédecine. C'est pourquoi nous proposons dans ce chapitre une caractérisation morphologique et physico-chimique approfondie de ces architectures hybrides. En particulier, il s'agit d'étudier, de décrire et de mettre en évidence précisément les interactions mises en jeu au niveau des interfaces organiques-inorganiques (greffage) et organiques-organiques (complexation des nanovalves). La démarche analytique a été de combiner deux techniques de caractérisation complémentaires : la spectroscopie photoélectronique à rayonnement X (XPS) et la résonance magnétique nucléaire (RMN) des liquides et des solides (collaboration avec le laboratoire du LPCNO de Toulouse). Comme dans le chapitre II, l'interprétation des spectres XPS a été réalisée sur la base de l'étude de composés de référence. Concernant l'analyse RMN, une première étude du complexe sous sa forme libre a été réalisée en phase liquide pour faciliter par la suite la compréhension et l'interprétation des spectres en RMN des solides.

L'ensemble des résultats présentés dans ce chapitre ont fait l'objet d'une publication dans le journal « *Physical Chemistry Chemical Physics* » (DOI : 10.1039/C5CP04491J)

## I. Synthèse de la coquille silicique hybride

### 1. *Elaboration de la coquille de silice mésoporeuse*

Après avoir synthétisé des nanoparticules creuses avec des propriétés optiques paramétrées, le deuxième objectif à atteindre était la formation d'une coquille silicique du type mésoporeuse autour des nanoshells ; ce réseau minéral jouerait à terme le rôle de réservoir de molécules thérapeutiques.

Dans le premier chapitre bibliographique, un aperçu des différentes voies de synthèse qui permettaient de former une coquille de silice dense et/ou poreuse sur des nanoparticules d'or a été reporté. Nous avons procédé par une structuration de la coquille en deux étapes successives. Dans un premier temps, la formation d'une coquille de silice dense est réalisée par l'intermédiaire du poly(vinylpyrrolidone) (PVP) qui stabilise les nanoshells synthétisées. Le PVP est un polymère amphiphile, non ionique, avec une faible charge négative, qui a la capacité de s'adsorber sur une large gamme de colloïdes. De plus, le PVP permet le transfert direct des nanoparticules en milieu hydro-alcoolique mais surtout la croissance d'une coquille de silice sans agent de couplage<sup>[1]</sup>. Dans un second temps, la coquille de silice mésoporeuse organisée est formée sur la première coquille dense selon la méthode développée par Yoon et al. <sup>[2]</sup>. Cette approche permet un meilleur contrôle de la structuration ainsi que de l'arrangement des pores du réseau silicique.

*Mode opératoire :* 30 ml de la suspension de nanoshells NS(3) sont centrifugés à 12000 tours/min pendant 15 minutes. Après élimination du surnageant, le cycle de centrifugation-élimination (CE) est répété trois fois. 8 ml d'une solution aqueuse de PVP (1 % (en masse)) sont ensuite ajoutés et la solution (NS+PVP) est soniquée. Après deux nouveaux cycles CE, les nanoparticules sont finalement redispersées dans 4 ml d'eau distillée.

L'obtention des nanomatériaux à structure cœur-coquille NS@mSi est ensuite réalisée par un procédé en deux étapes successives :

**Etape1 : formation de la coquille dense :** 4 ml de nanoshells lavées sont dispersés dans 20 ml d'isopropanol sous ultrasons. Par la suite, 0,5 ml d'ammoniaque concentré (30 % (en masse)) et enfin 10 µl de tétraéthoxysilane (TEOS précurseur silicique) sont ajoutés à la suspension de nanoparticules. La solution est maintenue sous agitation pendant deux heures.

**Etape 2 : formation de la coquille mésoporeuse**

A ce stade de la synthèse, trois lots de nanoparticules ont été préparés en modulant les quantités ajoutées de bromure de cetyltriméthylammonium (CTAB) et de TEOS.

Après deux heures d'agitation, une solution aqueuse de CTAB (56 ml) est additionnée à la suspension de nanoshells. Une minute après l'ajout, un volume de TEOS est ajouté au milieu réactionnel (Tableau III-1).

**Tableau III-1 : Quantités de CTAB et TEOS utilisées dans la deuxième étape lors de la formation de la coquille de silice**

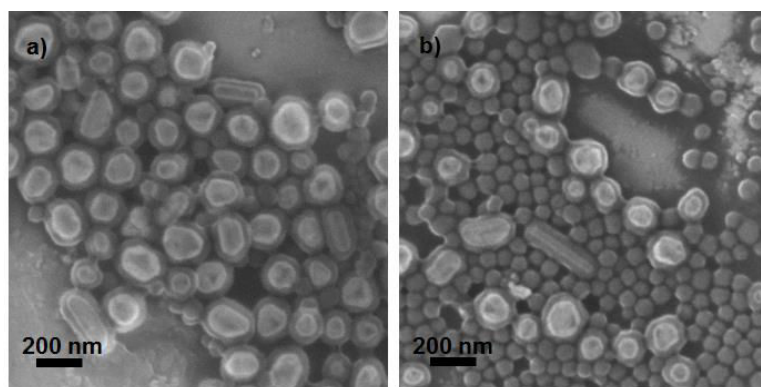
	m (CTAB) (g)	V (TEOS) (µl)
Synthèse n°1	0,030	53
Synthèse n°2	0,042	75
Synthèse n°3	0,060	107

Finale<sup>ment</sup>, les nanoparticules sont récupérées par filtration sur fritté et abondamment lavées à l'eau distillée, à l'éthanol puis à l'acétone, avant d'être séchées à 120°C pendant 24 heures. Les poudres obtenues sont ensuite redispersées dans une solution HCl (1M) / EtOH et maintenues sous agitation pendant 24 heures afin d'éliminer toute trace de tensioactif. Un nouveau cycle de filtration/lavage est réitéré cette fois-ci uniquement avec de l'éthanol et de l'acétone. Enfin les nanoparticules obtenues sont de nouveau placées à l'étuve à 120°C pendant 24 heures.

L'étape de purification des nanoshells, nécessaire à la préparation de la surface pour la croissance de la coquille de silice, a dans un premier temps été optimisée. En particulier, le volume de solution de PVP ajouté a été ajusté afin de stabiliser au maximum les nanoshells lors du transfert dans l'isopropanol.

Dans la première étape de croissance de la coquille dense, la concentration en nanoshells a été optimisée afin de minimiser la nucléation secondaire et que la première couche de silice soit suffisamment homogène, ce dernier point facilitant la croissance de la couche silicique mésoporeuse.

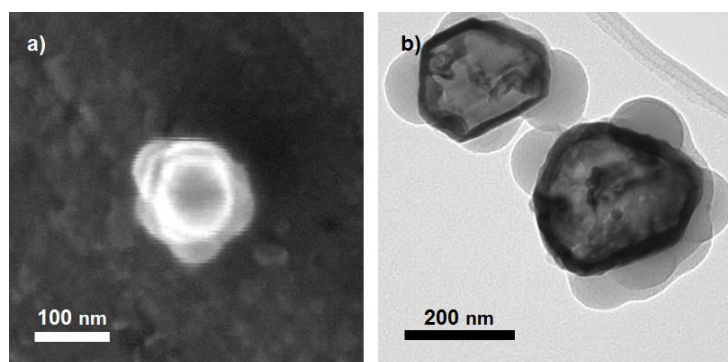
Après l'ajustement de ces paramètres, nous avons décidé d'évaluer la reproductibilité des synthèses, en particulier de cette première étape. Les clichés MEB enregistrés à la fin de la première étape, de deux synthèses réalisées avec deux lots différents de nanoshells sont présentés dans la Figure III-1.

**Figure III-1 : Images MEB enregistrées à la fin de la première étape de deux essais de synthèse de la première coquille de silice dense**

Ces images mettent en évidence la difficulté de contrôler précisément le taux de nucléation secondaire. Dans les deux essais de cette synthèse, la coquille est homogène, son épaisseur est d'environ  $30 \pm 5$  nm

et la taille des nanoparticules de silice secondaires est de  $70 \pm 5$  nm. Les conditions de synthèse étant équivalentes, seule une variation de la concentration initiale en nanoshells pourrait expliquer ce résultat. Une autre hypothèse concerne la présence de PVP libre qui en solution interviendrait comme site de nucléation secondaire.

Au cours de certains essais, nous avons également pu remarquer que la croissance de la silice était hétérogène, plutôt de type nodulaire comme le montre les images de microscopie électronique (Figure III-2).

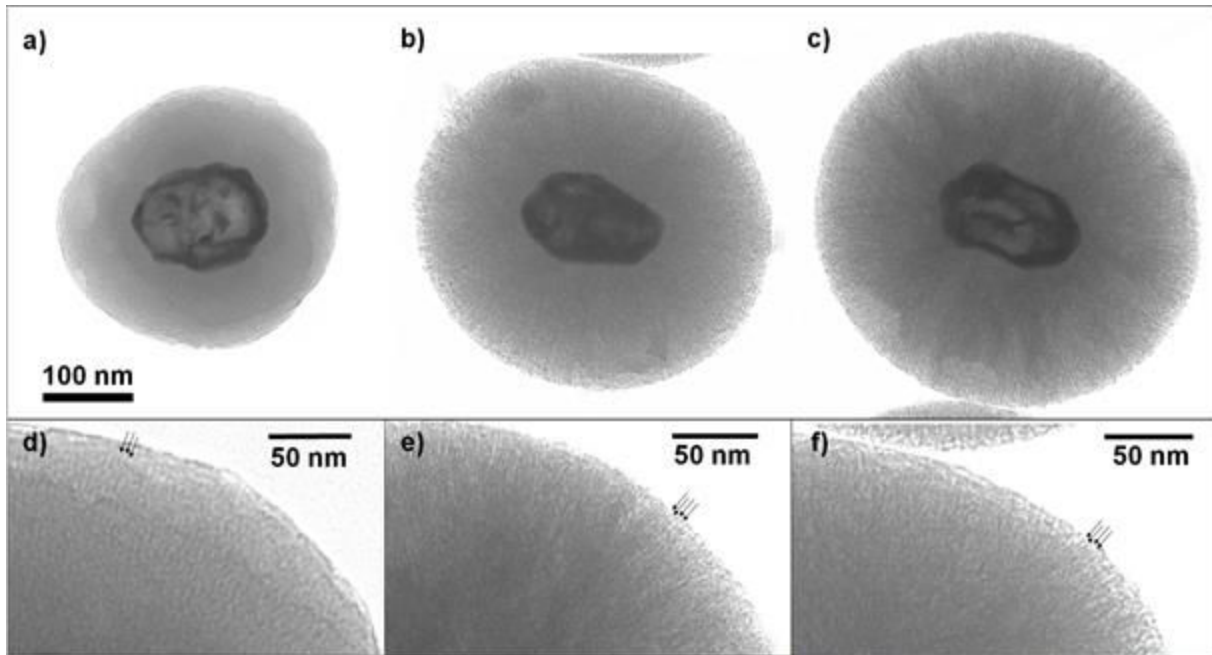


**Figure III-2 : Images a) MEB et b) MET d'une synthèse où la croissance de la coquille de silice est hétérogène**

L'adsorption hétérogène du PVP à la surface des nanoparticules peut expliquer ce phénomène. Du fait de la variabilité de cette première étape, seules les synthèses conduisant à une première coquille de silice dense et homogène ainsi qu'à un taux de nucléation secondaire faible ont été conservées.

La formation préalable d'une coquille de silice dense est une interface idéale pour la construction de la coquille mésoporeuse structurée. En effet, la coquille dense va, lors de la deuxième étape, orienter l'auto-assemblage des micelles de tensioactif du fait de l'interaction électrostatique entre les molécules de CTAB chargées positivement et la surface de silice chargée négativement dans les conditions basiques du milieu réactionnel. L'orientation de la porosité dépend également du rapport molaire CTAB/TEOS. En effet, Yoon *et al.*<sup>[2]</sup> ont montré qu'une orientation des mésopores perpendiculairement à la surface du cœur pouvait être obtenue pour un rapport molaire optimisé CTAB/TEOS de 0,34. Ainsi, les trois synthèses que nous avons réalisées (Tableau III-1) respectent ce rapport, l'orientation des pores étant, dans le cadre de ce travail, un paramètre essentiel pour la fonction de délivrance de médicaments.

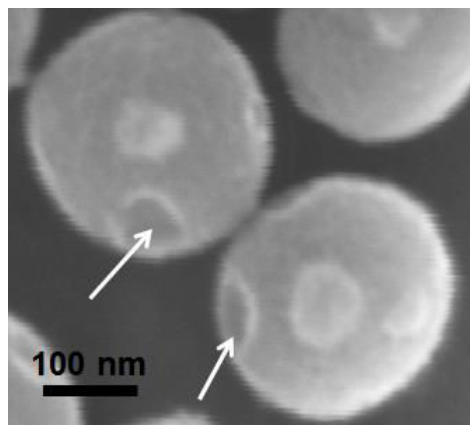
Après l'ajout de CTAB et de TEOS (2<sup>ème</sup> étape de la synthèse), les images MET (Figure III-3.a, b, c) révèlent finalement la formation de nanoparticules du type « core-shell » qui tendent vers une forme sphérique au fur et à mesure que l'épaisseur de la coquille augmente. L'épaisseur de la coquille est mesurée à  $(80 \pm 5)$  nm pour la synthèse n°1,  $(120 \pm 5)$  nm pour la synthèse n°2 et enfin  $(130 \pm 5)$  nm pour la synthèse n°3. Plus la quantité de TEOS utilisée est importante (et donc par conséquent celle de CTAB puisque le rapport molaire CTAB/TEOS reste constant) plus la coquille croît (Figure III-3.a). Néanmoins, nous pouvons remarquer que la structuration de la porosité est mieux définie dans le cas des synthèses n°2 et 3 (Figure III-3.e, f).



**Figure III-3 : Images MET après la deuxième étape de synthèse (a, b, c) – Zoom sur la porosité des nanoparticules (d, e, f) issues des synthèses n°1, n°2 et n°3**

Yoon *at al.*<sup>[2]</sup> ont montré par ailleurs la possibilité de contrôler également l'épaisseur de la coquille de silice mésoporeuse, tout en conservant l'orientation perpendiculaire, via la variation de la longueur de la chaîne aliphatique du tensioactif C<sub>n</sub>-TAB (n =12, 14, 16, 18).

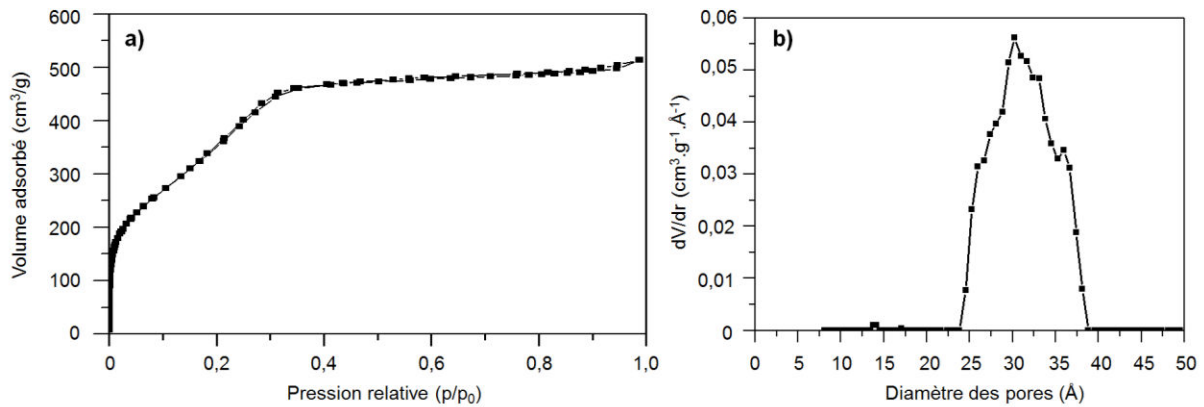
Les images MEB, qui renseignent plutôt sur la topographie, révèlent la présence de cratères à la surface de la coquille de silice (Figure III-4). En effet, dès le premier traitement thermique en étuve, la coquille subit quelques modifications. Le PVP, qui stabilise les nanoshells d'or et permet la croissance de la silice, induit probablement la fragilisation du réseau silicique.



**Figure III-4 : Image MEB des nanoparticules NS@mSi (les flèches indiquent les défauts observés à la surface)**

Pour la finalisation des nanoparticules hybrides et le greffage ultime des nanovalves organiques, seuls les nano-objets issus de la synthèse n°3 sont conservés, la coquille étant la mieux préservée.

La description complète de la porosité des nanoparticules (diamètre des pores ( $d_p$ ), surface spécifique...) a été réalisée à partir d'une analyse en volumétrie d'adsorption/désorption. Les isothermes d'adsorption et de désorption enregistrées pour les nanoparticules NS@mSi élaborées avec les conditions de synthèse n°3 sont présentées ci-après (Figure III-5.a).

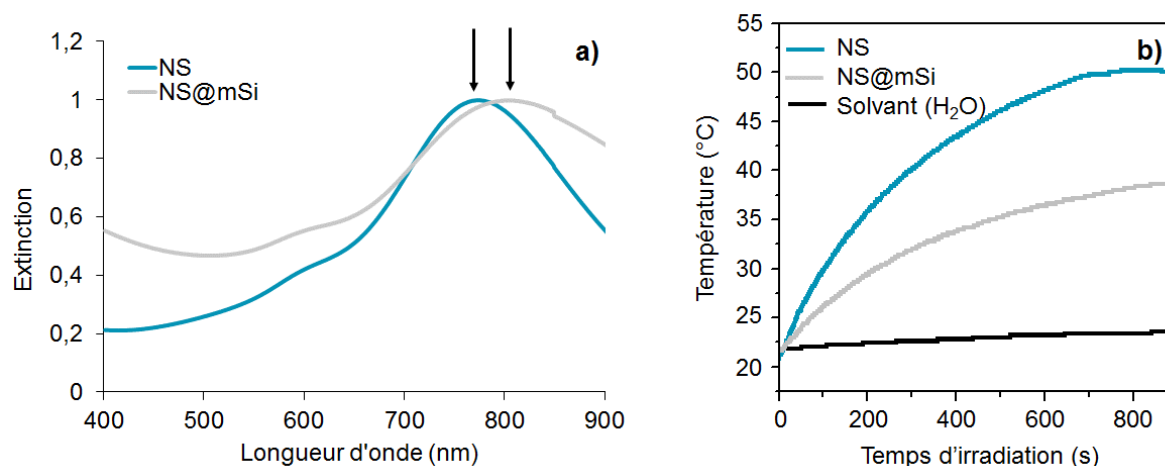


**Figure III-5 : a) Isothermes d'adsorption et de désorption d'azote et b) Distribution du diamètre des pores des nanoparticules cœur-coquille NS@mSi (synthèse n°3)**

Même si son allure se rapproche de celle d'une isotherme du type IV (caractéristique des matériaux mésoporeux,  $2 \text{ nm} \leq d_p < 50 \text{ nm}$ ), il est difficile de classer l'isotherme des nanoparticules NS@mSi selon la nomenclature de l'IUPAC<sup>[3]</sup>. L'évolution du volume de  $\text{N}_2$  adsorbé pour les faibles pressions relatives est plutôt caractéristique d'un échantillon microporeux ( $d_p < 2 \text{ nm}$ ). La surface spécifique, déduite de l'isotherme d'adsorption ( $0,05 < p/p_0 < 0,035$ ) et calculée par la méthode de Brunauer, Emmett et Teller (BET)<sup>[4]</sup> est estimée à  $1463 \pm 25 \text{ m}^2/\text{g}$ . Le diamètre des pores peut être également calculé, généralement selon la théorie de Barrett, Joyner et Halenda<sup>[5]</sup> (BJH) dans le cas des matériaux mésoporeux. Cependant, la mise en évidence d'une éventuelle microporosité de l'échantillon ne nous permet d'utiliser ce modèle. De ce fait, une méthode utilisant la théorie de la fonctionnelle de la densité non locale<sup>[6]</sup> (NLDFT, Non-Local Density Functional Theory) pour calculer des isothermes associées à un système adsorbant-adsorbat en particulier a été utilisée. Ce modèle, plus adapté, conduit à l'observation d'une distribution assez large qui s'étend de 24 à 38 Å, avec un maximum centré à 30 Å (Figure III-5.b). Ces résultats sont en accord avec les valeurs de la littérature pour des nanoparticules de silice mésoporeuse<sup>[7,8]</sup>.



Concernant les propriétés optiques des nanoparticules cœur-coquille, nous nous sommes intéressés à l'évolution de la résonance plasmon des nanoshells. En effet, comme nous l'avons vu dans le chapitre bibliographique, la nature du milieu environnant et plus précisément son indice de réfraction va influencer la fréquence de résonance plasmon. Ainsi la coquille de silice mésoporeuse induit un léger déplacement du maximum d'extinction vers le proche infrarouge (Figure III-6.a) du fait de l'augmentation de l'indice de réfraction autour des nanoshells<sup>[9]</sup>.



**Figure III-6 : a) Spectre d'extinction et b) évolution de la température sous irradiation d'une suspension de nanoparticules NS et NS@mSi**

La coquille de silice a une influence sur l'énergie dissipée par les nano-objets. En effet, pour une même concentration, la température d'une suspension colloïdale de nanoparticules NS@mSi mesurée sous irradiation laser (808 nm, 7 W/cm<sup>2</sup>) est plus faible que celle mesurée avec des nanoshells (Figure III-6.b). Une partie de l'énergie est donc dissipée par la coquille de silice en raison de sa faible conductivité thermique. Après 15 min d'irradiation, la température de la solution atteint 38°C. Le potentiel de ces nanoparticules en tant qu'agents photothermiques est donc conservé.

A ce stade, nous avons donc élaboré des nanoparticules NS@mSi présentant des propriétés optiques et photothermiques adaptées à des applications en photothérapie. De plus, la coquille de silice mésoporeuse possède une surface spécifique importante avec des pores distribués de manière radiale par rapport au cœur. Cette structuration ordonnée des pores offre une grande accessibilité pour les molécules cargos et fait donc de la silice un réservoir adapté à l'encapsulation de principes actifs.

## 2. Fonctionnalisation de la coquille de silice mésoporeuse

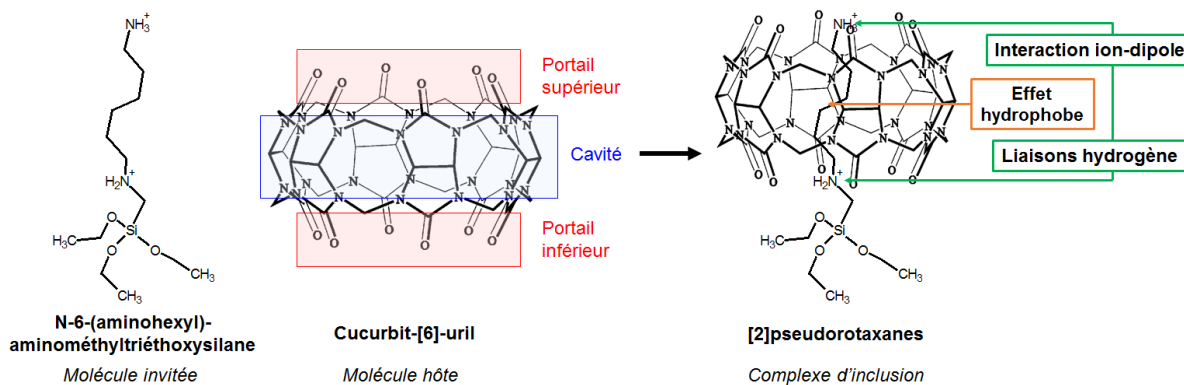
La fonctionnalisation du matériau offre de nouvelles propriétés physico-chimiques qui étendent son domaine d'application.

En particulier, l'utilisation d'assemblages supramoléculaires basés sur des interactions non-covalentes (du type donneur-accepteur, liaisons hydrogènes, métal-ligand, interactions hydrophobes), à la surface

de nanoparticules de silice mésoporeuse a ouvert la voie à un nouveau champ de recherche autour de la délivrance contrôlée de médicaments<sup>[10]</sup>.

Parmi ces assemblages supramoléculaires, les [2]pseudorotaxanes ont montré leur potentiel en tant qu'obturateurs de pores<sup>[8]</sup>. Ils sont constitués d'un macrocycle du type cyclodextrine ou cucurbit[n]uril capable de former des complexes d'inclusion avec une large gamme de molécules dites « invitées » et qui peuvent être dissociés sous l'effet d'un stimulus externe. Dans ces systèmes, les molécules invitées sont initialement greffées à la surface des nanoparticules de silice puis le macrocycle est ajouté conduisant à la formation de nanovalves.

Dans ce travail, nous nous sommes intéressés à des [2]pseudorotaxanes constitués de N-6-(aminohexyl)-aminométhyltriéthoxysilane (molécule invitée) et de cucurbit[6]uril (CB6) (macrocycle) (Figure III-7). La molécule invitée est un diaminoalcoxysilane qui possède trois fonctions éthoxysilane permettant un ancrage facilité sur le réseau silicique de la coquille mésoporeuse. Le CB6 est un macrocycle constitué de 6 unités glycoluril; cette molécule symétrique est caractérisée par deux portails formés par les groupements carbamides et une zone hydrophobe appelée cavité. La formation d'un complexe d'inclusion entre les deux entités est basée sur plusieurs types d'interactions : des interactions du type ion-dipôle et des liaisons hydrogènes entre les sites cationiques (amines protonées) de la molécule invitée et les groupements carbonyles du CB6. Il existe également un effet hydrophobe entre la chaîne aliphatique du diaminoalcoxysilane et la cavité du macrocycle.



**Figure III-7 : Schématisation des interactions mises en jeu dans la formation des nanovalves type [2]pseudorotaxane**

Dans cette conformation, l'ouverture des nanovalves peut être contrôlée de deux manières différentes :

- par le pH : l'augmentation du pH du milieu conduit à la déprotonation des amines du diaminoalcoxysilane et donc à la dissociation du complexe.
- Par la température : l'augmentation de la température du milieu conduit à la rupture des interactions mises en jeu dans la formation du complexe et donc à sa dissociation.

*Mode opératoire:* Pour la fonctionnalisation, nous avons adapté les protocoles de Zink<sup>[11,12]</sup> à nos systèmes. La modification de surface est réalisée en deux étapes (Figure III-8):

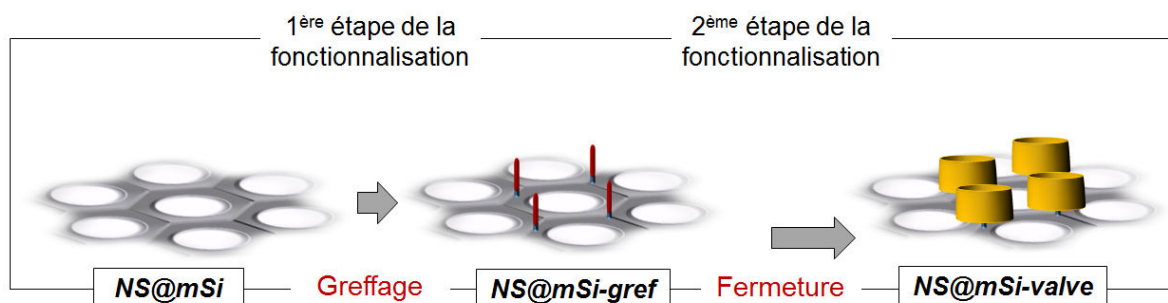
1) **Greffage du diaminoalcoxysilane :** L'ensemble de la verrerie utilisée dans cette synthèse a préalablement été placée à l'étuve à 120 °C puis au dessiccateur afin de minimiser toutes traces d'eau. 30 mg de nanoparticules NS@mSi séchées (120 °C) sont dans un premier temps dispersés dans 20 ml de N,N-diméthylformamide anhydre. A cette suspension sont ajoutés n moles de greffon et le milieu réactionnel est maintenu sous agitation magnétique à 80 °C pendant 14 h. Les nanoparticules sont ensuite lavées plusieurs fois à l'éthanol, filtrées et mises à l'étuve 12 h à 80°C.

Afin d'optimiser le taux de greffage, nous avons réalisé trois synthèses mettant en jeu des quantités de greffon n différentes (Tableau III-2).

**Tableau III-2 : Récapitulatif des quantités molaires de greffon utilisées pour chaque fonctionnalisation**

	n (greffon) (mol)	n(greffon)/m(NS@mSi) (mmol/g)
Greffage n°1	$1,2 \cdot 10^{-4}$	4,0
Greffage n°2	$7,5 \cdot 10^{-5}$	2,5
Greffage n°3	$3,0 \cdot 10^{-5}$	1,0

2) **Fermeture des nanovalves :** 30 mg des nanoparticules greffées NS@mSi-gref sont dispersées dans 5 ml d'eau distillée. Une solution aqueuse de CB6 (75 mg CB6 + 65 mg NaCl dans 7 ml d'eau distillée préalablement agitée pendant 3h) est alors ajoutée à la suspension. La solution est placée sous agitation pendant 3 jours et les nanoparticules sont finalement récupérées par filtration après plusieurs lavages à l'eau distillée.



**Figure III-8 : Schéma de la fonctionnalisation en deux étapes des nanoparticules NS@mSi**

Plusieurs facteurs peuvent affecter le fonctionnement des nanovalves :

- 1- la taille des entités constituant la nanovalve
- 2- la longueur de la chaîne alkyle (dans le cas d'une molécule invitée linéaire)<sup>[13,14]</sup>
- 3- la distance  $r$  entre la surface et la nanovalve (Figure III-9).

Comme son diamètre externe est d'environ 1,4 nm<sup>[15]</sup>, l'encombrement stérique généré par les macrocycles CB6 semble être à priori suffisant pour obturer convenablement les pores dont le diamètre est voisin de 2-3 nm. Les molécules cargos restent ainsi confinées après fermeture. Dans le système choisi, la longueur de la chaîne alkyle est optimale et conduit au complexe le plus stable d'après Mock et *al.*<sup>[13]</sup>. Par ailleurs, le greffon est suffisamment petit (un seul groupement méthyle entre le silicium et la fonction amine) pour que le CB6 soit positionné proche de la surface bloquant ainsi les pores de manière efficace<sup>[9,10,11]</sup>.

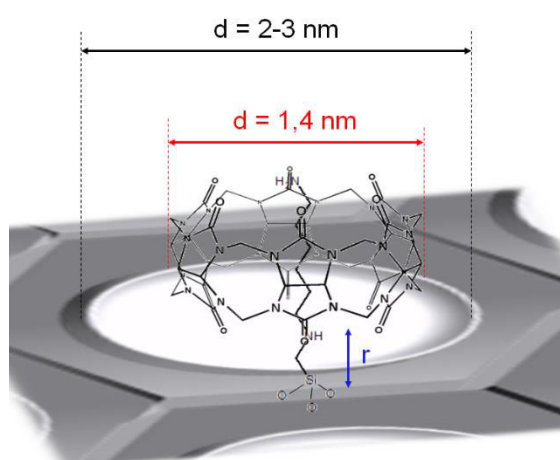


Figure III-9 : Schématisation d'un pore de la surface de silice et d'une nanovalve

Cependant, un facteur plus limitant concerne la répartition des nanovalves à la surface des nanoparticules qui va implicitement dépendre de celle des greffons en surface.

Lors du greffage d'un organosilane sur une surface de silice, l'organosilane va s'hydrolyser selon la réaction :

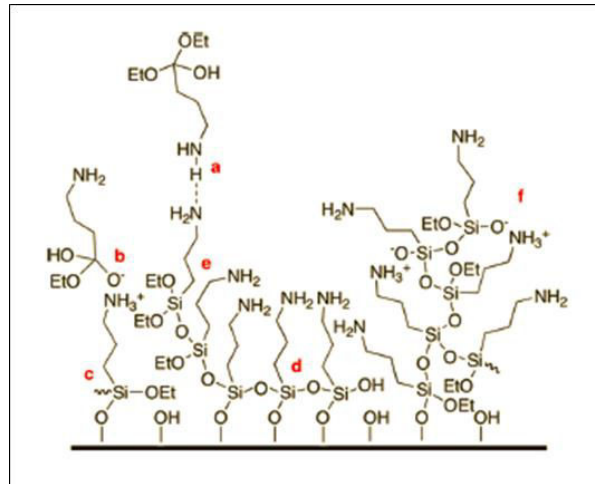


Une fois hydrolysé, il peut ensuite se condenser sur lui-même ou interagir avec la surface de silice via des liaisons hydrogènes. La réaction de condensation peut également se produire entre l'organosilane hydrolysé et les silanols de surface.

Ainsi, les réactions de condensation peuvent également conduire à des structures totalement anarchiques de couches tridimensionnelles sur la surface (Figure III-10). Néanmoins, cette configuration peut être limitée par le choix des conditions expérimentales. En particulier, l'utilisation d'un solvant anhydre

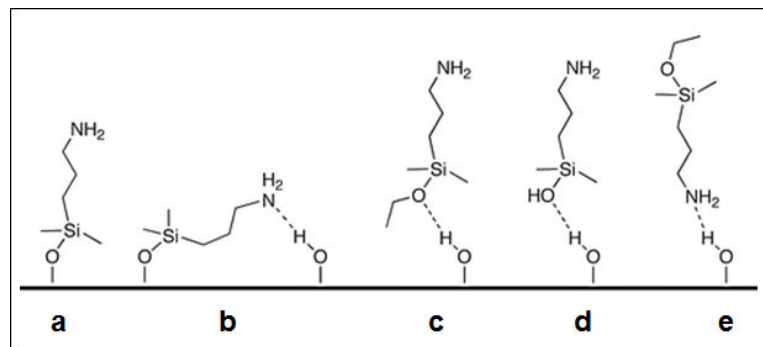
permet généralement la formation d'une monocouche d'organosilane, l'hydrolyse de ce dernier ne s'effectuant qu'au voisinage de la surface de silice grâce à l'eau d'hydratation de celle-ci.

De plus, dans le cas d'un trialkoxysilane, seules une ou deux fonctions alcoxy au maximum peuvent réagir avec les silanols de surface<sup>[16]</sup>.



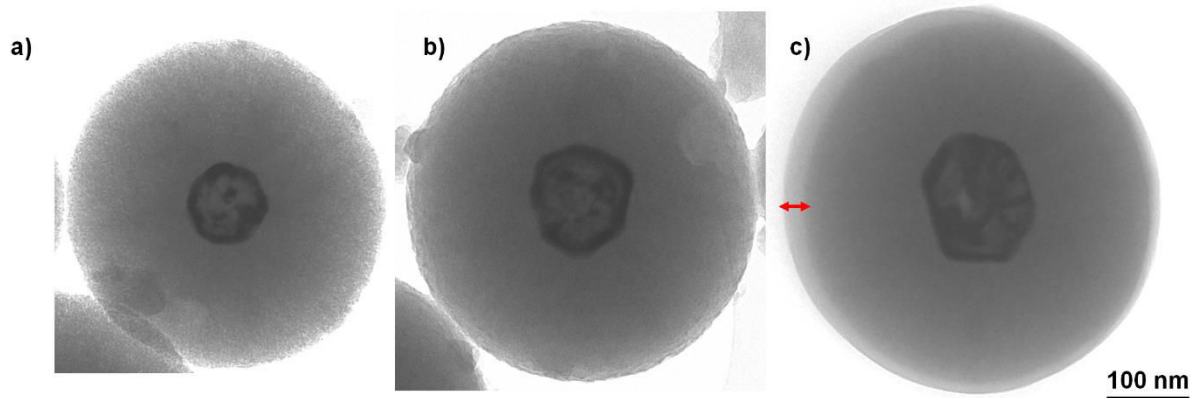
**Figure III-10 : Couche de 3-aminopropyltriéthoxysilane (APTES) avec des irrégularités structurales-**  
 a) Liaison hydrogène, b) interaction électrostatique, c) liaison covalente avec le substrat, d) polymérisation horizontale et e) verticale avec les silanes voisins, f) les silanes oligomériques/polymériques peuvent interagir avec plusieurs fonctions à l'interface<sup>[17]</sup>

Les interactions possibles pouvant s'établir entre les silanes et la surface sont aussi à considérer. Dans le cas particulier des aminoalcoxysilanes, qu'ils soient physisorbés (Figure III-11.c, d, e) ou greffés de manière covalente (Figure III-11.a, b), des liaisons hydrogènes ainsi que des interactions du type électrostatique peuvent être mises en jeu. Certaines conformations en particulier peuvent même être à l'origine d'une faible densité de greffage<sup>[17]</sup> (Figure III-11.b).



**Figure III-11 : Interactions mises en jeu entre un aminoalcoxysilane et une surface de silice : exemple du 3-aminopropyltriéthoxysilane (APTES)-** a) APTES greffé de manière covalente et orienté perpendiculairement à la surface, b) APTES greffé de manière covalente avec le groupement amine qui interagit avec un groupement silanol de la surface, c-e) molécules d'APTES faiblement liées<sup>[18]</sup>

En fonction des quantités de greffon, les clichés de microscopie rendent compte de morphologies réellement différenciées (Figure III-12).



**Figure III-12 : Clichés MET des nanoparticules NS@mSi fonctionnalisées avec des quantités molaires de greffon croissante a) synthèse n°3, b) n°2 et c) n°1**

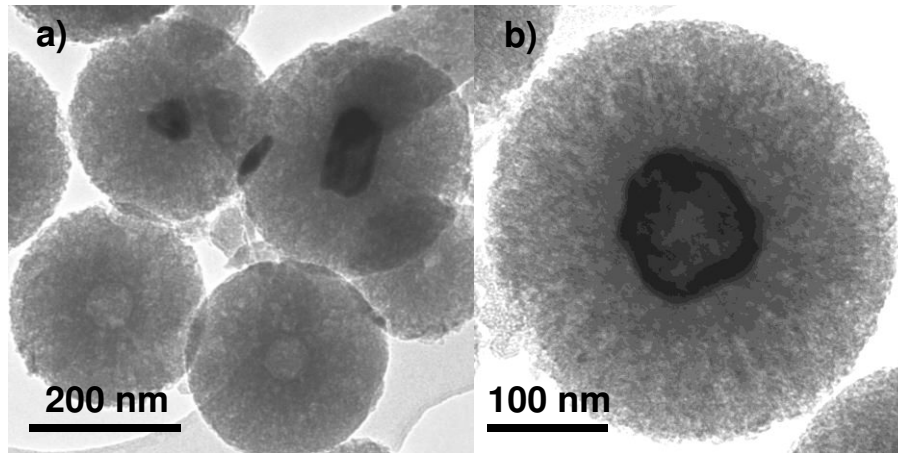
Avec la quantité molaire de greffon qui augmente (de la synthèse n°3 Figure III-12.a à la synthèse n°2 Figure III-12.b), la porosité devient moins visible. La synthèse n°1 conduit à la formation d'une fine couche bien perceptible à la surface des nanoparticules (épaisseur repérée par une double flèche, Figure III-12.c), qui correspond à la condensation du greffon.

Dans la méthode de greffage post-synthèse utilisée ici, le greffage se fait préférentiellement sur les sites les plus accessibles c'est-à-dire la surface externe et l'entrée des pores<sup>[19]</sup>. De ce fait, lorsque la concentration en organosilane devient trop importante, la formation d'un réseau tridimensionnel est favorisée ce qui conduit à l'obturation des pores et rend donc ce nanosystème inexploitable pour l'encapsulation d'un principe actif.

Sur la base de ces observations en microscopie électronique, la synthèse mettant en jeu 2,5 mmol/g de diaminoalcoxysilane a été retenue pour la suite du travail.

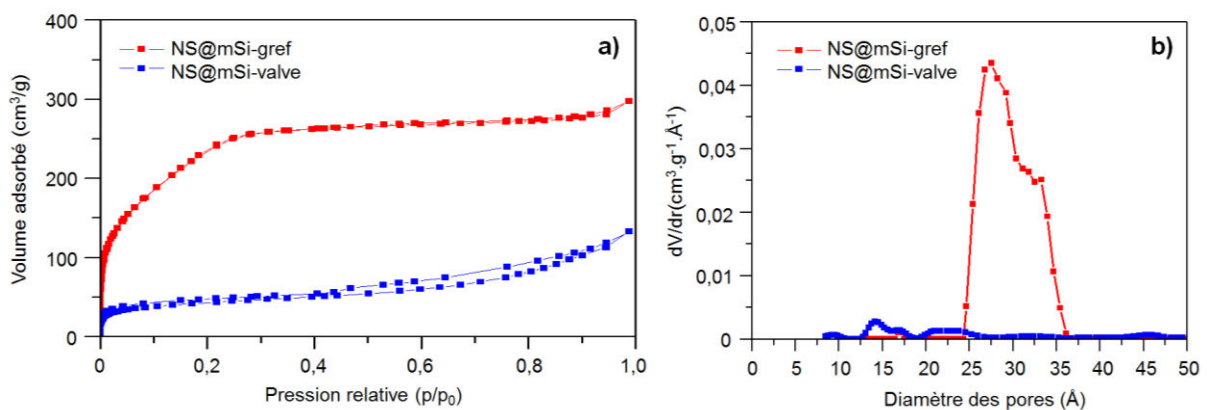
Pour la fermeture des nanovalves, le protocole de Zink<sup>[11]</sup> a été reproduit avec des quantités stœchiométriques de CB6 par rapport au diaminoalcoxysilane. Afin d'augmenter la solubilité du CB6 dans l'eau, l'ajout de NaCl a été effectué lors de la préparation de la solution initiale. Cette étape de fonctionnalisation n'est pas sans effet sur la morphologie des systèmes puisqu'une certaine dégradation de la coquille de silice est mise en évidence sur les clichés MET (Figure III-13). Elle résulte d'une dépolymérisation partielle de la silice accélérée en milieu alcalin<sup>[20]</sup>. De plus, les nanoparticules présentant une surface spécifique importante, la surface de contact avec la solution est élevée et donc la dissolution est favorisée.

La disparition du cœur dans certaines nanostructures est également observée (Figure III-13.a). Des travaux de la littérature ont déjà rapporté la dissolution du cœur de nanoparticules mais dans des conditions oxydantes (en présence de iodures pour un cœur d'argent ou de cyanures pour un cœur d'or)<sup>[21]</sup>.



**Figure III-13 : Clichés MET des nanoparticules NS@mSi-valve- Mise en évidence a) de la dissolution du cœur et b) de la dégradation du réseau silicique**

L'évolution des propriétés texturales des nanoparticules fonctionnalisées a été suivie par des mesures de volumétrie d'adsorption/désorption d'azote. Les isothermes ainsi que la distribution du diamètre des pores sont présentées dans la Figure III-14.



**Figure III-14 : a) Isothermes d'adsorption et de désorption d'azote et b) Distribution du diamètre des pores des nanoparticules cœur-coquille NS@mSi-gref (rouge) et NS@mSi-valve (bleu)**

L'allure de l'isotherme des nanoparticules greffées NS@mSi-gref (Figure III-14) est très semblable à celle des nanoparticules NS@mSi (Figure III-5). La fonctionnalisation des nanoparticules s'accompagne d'une diminution significative de la surface spécifique et du volume poreux (Tableau III-3).

Lors du greffage du diaminoalcoxysilane sur la surface de silice, le greffon réagit majoritairement avec les silanols localisés sur la surface externe et ceux situés à l'entrée des pores. Dans ce dernier cas, l'entrée de certains pores est en partie obturée. Cette hypothèse est en accord avec les résultats obtenus qui montrent que la surface spécifique et le volume poreux diminuent sensiblement alors que le diamètre des pores n'évolue pas.

Enfin, la fermeture des nanovalves par le CB6 conduit à l'obstruction complète des pores des nanoparticules puisque la surface spécifique n'est plus que de 150 m<sup>2</sup>/g et quasiment aucun signal de distribution de taille de pores n'est enregistré.

**Tableau III-3 : Surface spécifique, volume poreux et distribution en taille des pores des nanomatériaux NS@mSi, NS@mSi-gref et NS@mSi-valve**

	<b>Surface spécifique (m<sup>2</sup>/g)</b>	<b>Volume poreux (cm<sup>3</sup>/g)</b>	<b>Distribution du diamètre des pores (Å)</b>
NS@mSi	1463 ± 25	0,72	24-38
NS@mSi-gref	860 ± 15	0,40	24-36
NS@mSi-valve	150 ± 2	0,14	-

L'évolution de ces caractéristiques au cours de la fonctionnalisation est en accord avec les données de la littérature pour des nanoparticules de silice mésoporeuse <sup>[8]</sup>. Afin de mieux appréhender la physico-chimie de surface et d'interface lors de l'assemblage de la structure hybride hiérarchisée, une étude spectroscopique a été menée à chaque étape de l'élaboration. Les attributions sont données sur la base de l'analyse préalable de systèmes références pouvant être les produits intermédiaires de synthèse ou des standards commerciaux.

## II. Caractérisation physico-chimique des nano-systèmes cœur-coquille

### 1. Analyse XPS des nanoparticules

#### a. Matériaux références

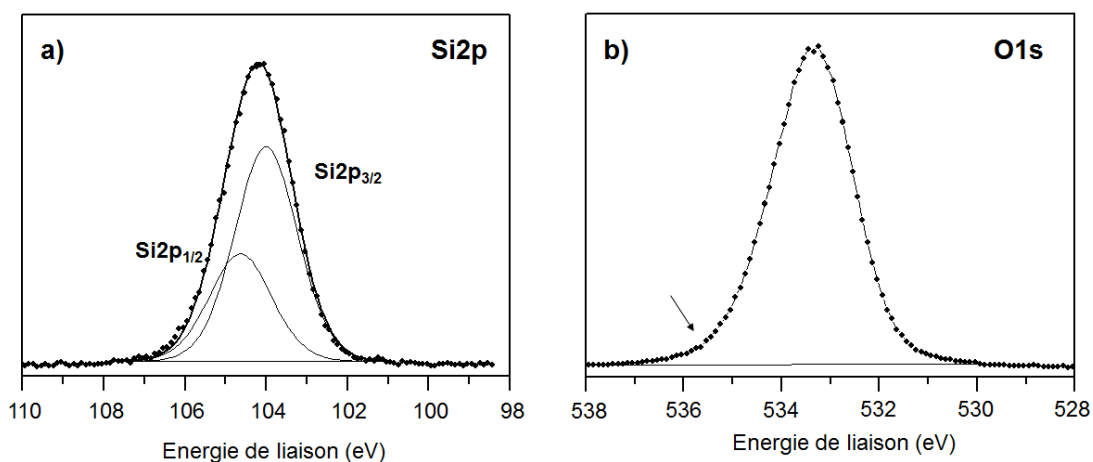
Les références que nous avons choisi d'analyser sont les espèces mises en jeu dans le processus de formation et de fonctionnalisation de la coquille des nanoparticules. Dans cette partie, n'est reportée que l'analyse des éléments d'intérêt. Ainsi, l'analyse haute résolution de l'ensemble des pics de cœur relatif à tous les éléments chimiques des composés de référence est reportée en Annexe à la fin du chapitre (p.159) sous la forme de tableau dans les cas où elle n'est pas présentée dans le texte.



## i. Silice mésoporeuse de synthèse

Le pic de cœur Si2p se présente sous la forme de deux composantes Si2p<sub>3/2</sub> (E<sub>L</sub>= 104,1 eV) et Si2p<sub>1/2</sub> (E<sub>L</sub>= 104,7 eV), avec un rapport d'intensité 2/1. Ces deux composantes sont proches en énergie de liaison compte tenu du faible couplage spin-orbite de 0,6 eV et de la largeur significative des composantes (FWHM = 1,8 eV) qui implique un recouvrement (Figure III-15.a).

Le pic de cœur O1s (Figure III-15.b) repéré à 533,3 eV est caractéristique des liaisons siloxanes Si-O-Si. L'asymétrie observée vers les hautes énergies de liaison rend compte de la présence de groupements silanols Si-OH d'extrême surface<sup>[22]</sup>.



**Figure III-15 : Pics de cœur XPS a) Si2p et b) O1s d'une silice mésoporeuse de référence**

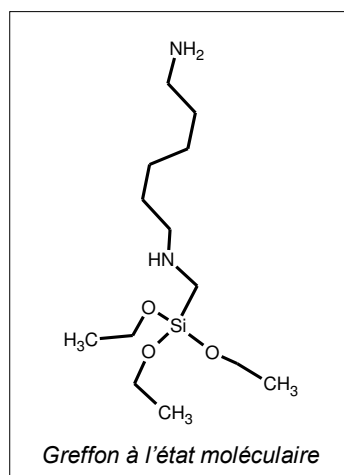
D'un point de vue quantitatif, le rapport O/Si déduit de l'analyse XPS ne respecte pas la stœchiométrie (1,7). Cependant, la silice pouvant être décrite comme un enchaînement plus ou moins régulier de tétraèdres SiO<sub>4</sub> avec des groupements pendants du type Si-OH, ce rapport O/Si devrait théoriquement être égal ou supérieur à 2. L'analyse d'un échantillon de référence (couche d'oxyde sur wafer de silicium) conduit de la même manière à un rapport inférieur à 2 (Annexe, p.159). Cette différence entre la valeur théorique et la valeur déduite de l'analyse quantitative XPS soulève ici un problème de section efficace. En effet, les facteurs de Scofield<sup>[23]</sup> utilisés ne permettent pas de rendre compte de la stœchiométrie du matériau. Ces valeurs peuvent être corrigées afin de s'approcher au mieux du rapport théorique. Néanmoins, nous avons pris le parti de conserver les valeurs initiales et donc de considérer que ce rapport voisin de 1,7 était caractéristique en XPS d'un environnement du type SiO<sub>2</sub>.

## ii. Les nanovalves

### ii.1. Le greffon

Le complexe [2]pseudorotaxane ainsi que ses deux entités constitutives (greffon et macrocycle) ont été préalablement analysés afin de disposer d'une base de données susceptible de faciliter

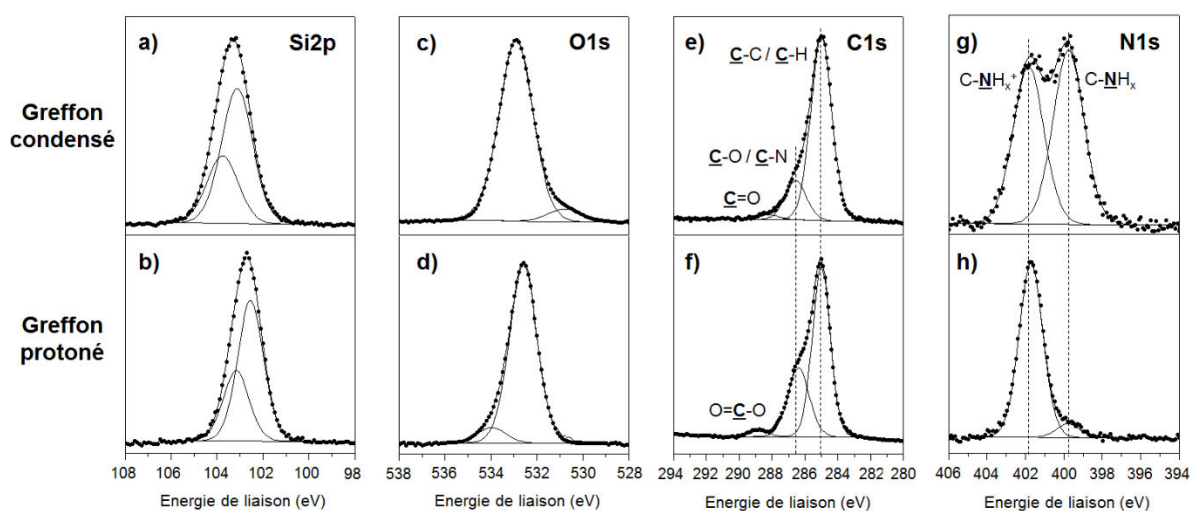
l'interprétation des interactions mises en jeu lors de la fonctionnalisation du système cœur@coquille. La formule du greffon à l'état moléculaire est rappelée dans la Figure III-16.



**Figure III-16 : Structure chimique du greffon à l'état moléculaire**

En considérant les formes chimiques possibles du greffon une fois stabilisé à la surface de la silice, nous avons réalisé l'analyse XPS d'un système auto-condensé et d'une forme protonée, synthétisés au laboratoire à partir du produit commercial (ABCR, 15129-36-9, 95%)(Annexe, p.158). Ces variantes chimiques peuvent à priori être observées au cours de la synthèse.

La Figure III-17 présente les spectres Si2p, O1s, C1s et N1s des deux formes préparées.



**Figure III-17 : Pics de cœur XPS Si2p, O1s, C1s et N1s du greffon condensé (a, c, e, g) et du greffon protoné (b, d, f, h)**

Un déplacement chimique significatif est observé entre le pic de cœur Si2p des formes condensée et protonée du greffon (Figure III-17.a, b). En effet, la composante Si2p<sub>3/2</sub> est enregistrée à 103,1 eV dans le cas du greffon condensé alors que cette valeur est beaucoup plus basse (102,5 eV) pour la molécule protonée.

De la même manière, le pic de cœur O1s (Figure III-17.c, d) traduit la même tendance avec un maximum à 532,9 eV pour le greffon condensé et 532,6 eV pour le greffon protoné. La desommission des spectres met également en évidence des environnements supplémentaires à 530,8 eV pour la forme condensée qui peut éventuellement être attribué à des atomes d'oxygène avec une charge négative importante du type Si-O<sup>-</sup> et à 534,0 eV pour le greffon protoné qui peut correspondre à quelques groupements alcoxy hydrolysés C-Si-OH<sup>[22]</sup>.

Considérant les valeurs des énergies de liaison mesurées pour les nanoparticules de silice mésoporeuse, le greffon condensé et le greffon protoné, il semblerait donc possible de distinguer par l'étude XPS des pics Si2p et O1s, une surface de silice d'une surface de silice fonctionnalisée mais également de mettre en évidence la polymérisation du greffon si tel était le cas (Tableau III-4).

**Tableau III-4 : Energies de liaison des pics de cœur Si2p et O1s de la silice mésoporeuse, du greffon condensé et protoné**

	<b>E<sub>L</sub> (Si2p<sub>3/2</sub>-Si2p<sub>1/2</sub>) (<i>fwhm</i>) (eV)</b>	<b>E<sub>L</sub> (O1s (SiO<sub>2</sub>)) (eV)</b>	<b>ΔE<sub>L</sub> (O1s-Si2p<sub>3/2</sub>) (eV)</b>
Silice mésoporeuse	104,1-104,7 (1,8)	533,4	429,3
Greffon condensé	103,1-103,8 (1,6)	532,9	429,8
Greffon protoné	102,5-103,2 (1,3)	532,6	430,1

Les pics de cœur C1s (Figure III-17.e, f) mettent en évidence une composante majoritaire à 285,0 eV qui correspond aux carbones aliphatiques du type C-C/C-H du greffon mais également certainement à des résidus de contamination. La composante à 286,4 eV peut correspondre à plusieurs environnements : aux atomes de carbone en alpha des amines/ammonium (C-NH<sub>x</sub> / C-NH<sub>x</sub><sup>+</sup>), à des groupements alcoxy non hydrolysés (-O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>). Enfin les composantes minoritaires à plus haute énergie de liaisons (288,2 eV pour la forme condensée et 288,9 eV pour la forme protonée) sont associées à des fonctions de carbone oxydé, du type C=O et O=C-O, non désirables.

Quelle que soit la forme chimique du greffon, le profil expérimental N1s (Figure III-17.g, h) est traduit par deux composantes situées à 399,9 eV et 401,7 eV. Le pic à basse énergie de liaison est caractéristique de groupements amines C-NH<sub>x</sub> (-CH<sub>2</sub>-NH-CH<sub>2</sub>-/-CH<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>) tandis que le pic à plus haute énergie de liaison correspond à un environnement du type ammonium C-NH<sub>x</sub><sup>+</sup> (-CH<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub><sup>+</sup>-CH<sub>2</sub>-/-CH<sub>2</sub>-NH<sub>3</sub><sup>+</sup>). Par ailleurs, les spectres mettent en évidence la prépondérance des groupements ammoniums dans le cas du greffon protoné confirmant ainsi sa configuration. Dans le cas du greffon auto-condensé en milieu hydro-alcoolique basique, les deux formes sont présentes dans les mêmes proportions.

Enfin, la présence de chlore détectée au cours de l'analyse XPS est en accord avec le processus de synthèse qui implique l'utilisation d'HCl/Et<sub>2</sub>O pour la protonation (cf. Annexe, p.158). Le chlore joue

le rôle de contre-ion des groupements ammoniums comme le confirment les pourcentages atomiques identiques (Tableau III-5). Finalement, le silicium et l'azote semblent être les sondes les plus fiables au cours de l'analyse XPS pour mettre en évidence la forme chimique du greffon.

## ii.2. Le macrocycle

Le cucurbit-6-uril ( $\text{CB6} \cdot x\text{H}_2\text{O}$ , Sigma Aldrich > 95 %), rappelons-le, est un macrocycle qui peut être décrit comme un enchaînement cyclique de 6 monomères glycoluril caractérisés par une fonction carbamide ( $-\text{N}-(\text{C}=\text{O})-\text{N}-$ ) et deux groupements alkylamines ( $-\text{N}-\text{CH}_2-\text{N}-$  /  $-\text{N}-(\text{CH})-\text{N}-$ ) (Figure III-18).

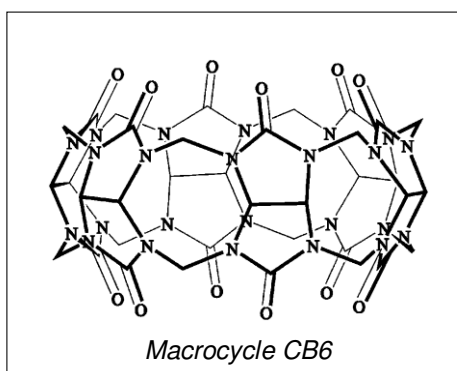


Figure III-18 : Structure chimique du macrocycle CB6

Les pics de cœur XPS C1s, N1s et O1s du macrocycle CB6 sont présentés sur la Figure III-19.

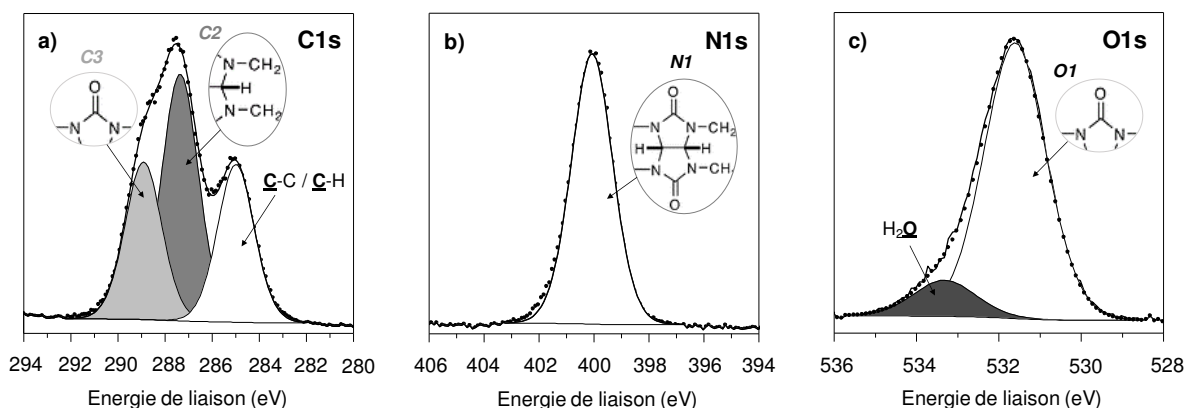


Figure III-19 : Pics de cœur XPS a) C1s, b) N1s et c) O1s du macrocycle CB6

L'analyse XPS du pic de cœur C1s (Figure III-19.a) permet d'identifier ces différents environnements associés à trois composantes distinctes. La première à 285,0 eV (C1) correspond à du carbone de contamination en partie attribuable à des résidus du produit commercial de synthèse. Les deux autres composantes, repérées à 287,4 eV (C2) et 289,1 eV (C3), permettent respectivement d'identifier les fonctions alkylamine ( $-\text{N}-\underline{\text{C}}\text{H}_2-\text{N}-$  /  $-\text{N}-(\underline{\text{C}}\text{H})-\text{N}-$ ) et carbamide ( $-\text{N}-(\underline{\text{C}}=\text{O})-\text{N}-$ ) du CB6. Pour ces

environnements azotés, le pic de cœur N1s (Figure III-19-b) rend compte de la composante unique à 400,0 eV (N1) de l'environnement carbamide (24,6 % at.). Au niveau de l'oxygène (Figure III-19.c), une composante O1s majoritaire à 531,6 eV (O1) est attribuée aux groupements carbamide du CB6 (-N-(C=O)-N-) tandis que celle plus haute en énergie à 533,2 eV (O2) signale la présence de molécules d'eau du macrocycle hydrate commercial.

L'analyse quantitative (Tableau III-5) est en bon accord avec la formule stœchiométrique du macrocycle avec un rapport expérimental de composition C2/C3/N1/O1 de 1/0,6/0,9/0,4 proche de 1/0,5/1/0,5 théoriquement.

### ii.3. Le [2]pseudorotaxane (greffon<sup>+</sup>/CB6)

Afin de préciser les possibles modifications d'environnements chimiques, le [2]pseudorotaxane complet a été analysé (Figure III-20).

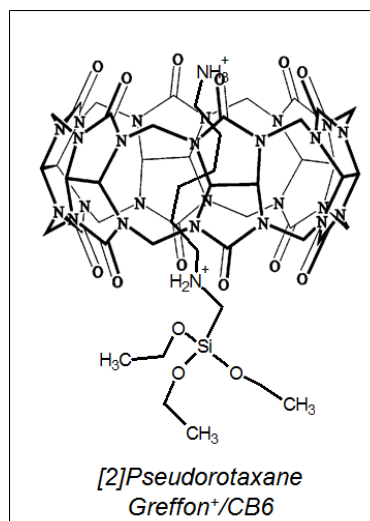
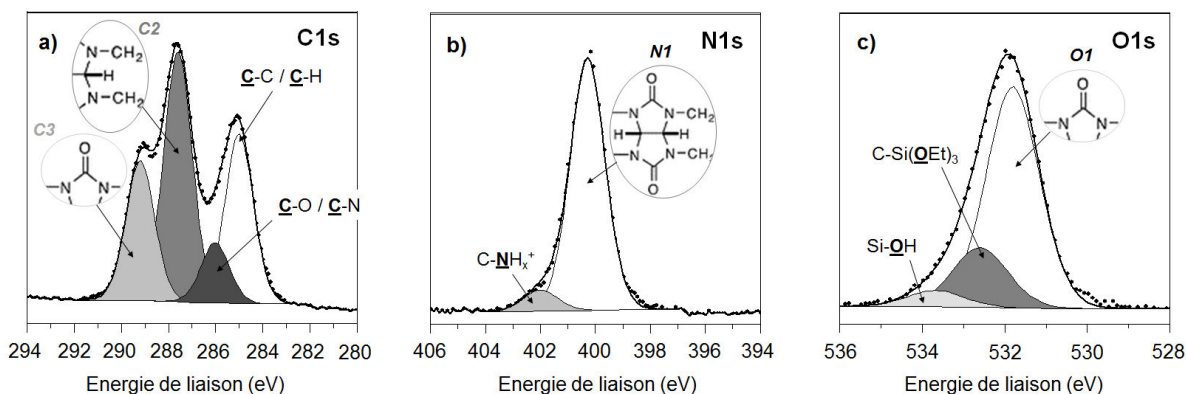


Figure III-20 : Structure chimique du [2]pseudorotaxane (greffon<sup>+</sup>/CB6)

La déconvolution des pics de cœur C1s, N1s et O1s a été réalisée sur la base des composantes déterminées lors de l'analyse de chacune des deux entités organiques en accord avec les profils expérimentaux. Le pic de cœur C1s met en évidence quatre composantes (Figure III-21.a). La première à 285,0 eV est attribuable aux groupements alkyles C-C/C-H du greffon ainsi qu'à du carbone de contamination. La deuxième composante à 286,0 eV peut être attribuée à la fois aux atomes de carbone en alpha des groupements amines du greffon (Si-CH<sub>2</sub>-NH/-NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>/-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>) mais également à des groupements du type C-O qui pourraient provenir d'une contamination ou correspondre à des groupements du type Si-O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub> non hydrolysés. La déconvolution montre également la

présence de deux autres composantes à plus haute énergie de liaison, 287,6 eV et 289,2 eV, comme précédemment, associées au CB6.



**Figure III-21 : Pics de cœur XPS a) C1s, b) N1s et c) O1s du [2]pseudototaxane (greffon<sup>+</sup>/CB6)**

L'analyse du pic N1s est conforme à la formation du complexe de pseudorotaxane avec une composante majoritaire à 400,4 eV des groupements carbamides (Figure III-21.b). Elle pourrait également se confondre avec la participation minoritaire du signal des groupements amines du greffon ( $-\text{CH}_2-\underline{\text{N}}\text{H}-\text{CH}_2/-\text{CH}_2-\underline{\text{N}}\text{H}_2$ ) dont l'énergie de liaison se situe proche de 400 eV. Néanmoins, la majorité des groupements amines existent sous la forme ammonium ( $-\text{CH}_2-\underline{\text{N}}\text{H}_2^+/-\text{CH}_2/-\text{CH}_2-\underline{\text{N}}\text{H}_3^+$ ) dont la composante apparaît à 402,0 eV.

Enfin, le pic de cœur O1s (Figure III-21.c) permet de distinguer à la fois l'environnement carbamide du CB6 (531,8 eV) ainsi que les fonctions Si-OEt (532,6 eV) et Si-OH (533,7 eV) du greffon<sup>+</sup>.

Globalement, la signature XPS du CB6 impose l'allure des pics de cœur C1s et N1s du fait du nombre d'atomes de carbone (36) et d'azote (24) présents dans la molécule de CB6 plus important que pour le greffon (7 atomes de carbone et 2 atomes d'azote). L'analyse quantitative (Tableau III-5) révèle des pourcentages atomiques importants de carbone (58,6 % at.) et d'azote (23,9 % at.) alors que le silicium n'est que faiblement détecté (1,5 % at.).

**Tableau III-5 : Energies de liaisons et pourcentages atomiques des pics de cœur XPS C1s, Cl2p, N1s, O1s et Si2p du greffon<sup>+</sup>, du macrocycle CB6 et du complexe greffon<sup>+</sup>/CB6**

Pics de cœur	Greffon <sup>+</sup>		CB6		Greffon <sup>+</sup> /CB6	
	EL (eV) (fwhm (eV))	% at.	EL (eV) (fwhm (eV))	% at.	EL (eV) (fwhm (eV))	% at.
C1s	285,0 (1,3)	42,4	285,0 (1,8)	17,7	285,0 (1,4)	16,0
	286,4 (1,5)	20,4			286,0 (1,4)	5,7
	288,9 (1,4)	1,7	287,4 (1,8)	27,9	287,6 (1,4)	23,6
			289,0 (1,8)	16,1	289,2 (1,4)	13,3
<b>% at total</b>		<b>64,5</b>		<b>61,7</b>		<b>58,6</b>
Cl 2p <sub>3/2</sub>	197,7 (1,2)	5,5	-		197,4 (1,4)	1,0
Cl 2p <sub>1/2</sub>	199,3 (1,2)	2,7	-		199,1 (1,4)	0,5
<b>% at total</b>		<b>8,2</b>				<b>1,5</b>
N1s	399,8 (1,5)	0,5				
			400,1 (1,8)	24,6	400,3 (1,5)	22,1
	401,7 (1,5)	6,8			402,0 (1,5)	1,8
<b>% at total</b>		<b>7,3</b>		<b>24,6</b>		<b>23,9</b>
O1s			531,6 (1,8)	12,1	531,8 (1,5)	10,7
	532,6 (1,4)	12,3	533,3 (1,8)	1,6	532,6 (1,6)	3,0
	533,9 (1,4)	1,1			533,7 (1,6)	0,8
<b>% at total</b>		<b>13,4</b>		<b>13,7</b>		<b>14,5</b>
Si 2p <sub>3/2</sub>	102,5 (1,3)	4,4	-		102,5 (1,7)	1,0
Si 2p <sub>1/2</sub>	103,2 (1,3)	2,2	-		103,1 (1,7)	0,5
<b>% at total</b>		<b>6,6</b>				<b>1,5</b>

Avec ces résultats, l'évaluation du nombre de molécules de CB6 par rapport au nombre de molécules de greffon n'est pas envisageable. En effet, seul le pic de cœur N1s nous permettrait de calculer ce rapport, mais les environnements amine du greffon et carbamide du CB6 sont difficilement dissociables en énergie.

De façon générale, nous pouvons remarquer une diminution significative de la largeur à mi-hauteur des composantes du CB6 dans le cas du complexe. Cette observation peut être le résultat d'une organisation à l'échelle locale issue éventuellement d'une interaction entre le greffon et le macrocycle.

A ce stade de la caractérisation XPS, nous avons pu dans un premier temps identifier les environnements caractéristiques de la silice, du greffon et du CB6. Par la suite, nous avons pu mettre en évidence ces différentes composantes sur les spectres XPS du complexe. Les interactions supramoléculaires mises en jeu dans la formation de ce complexe sont des interactions du type ion-dipôle trop faibles pour induire un déplacement chimique significatif sur les spectres XPS C1s et N1s. Seule la diminution de la largeur des composantes associées au CB6 pourrait être une indication de la complexation. Ainsi, dans la suite de ce travail, l'XPS nous permettra d'identifier la présence des deux

entités organiques à la surface des nanoparticules même si les spectres C1s et le N1s restent ici difficiles à interpréter. Pour identifier les interactions intervenant au sein du [2]pseudorotaxane, d'autres techniques de caractérisation devront être mises en œuvre comme la résonance magnétique nucléaire (RMN).

## b. Les nanoparticules cœur-coquille fonctionnalisées

### i. La coquille de SiO<sub>2</sub> mésoporeuse des NS@mSi

Les nanoparticules NS@mSi ont été caractérisées avant la fonctionnalisation pour rendre compte de la composition de surface. Les énergies de liaisons des pics de cœur Si2p<sub>3/2</sub> et O1s (Tableau III-6) sont identiques à celles du matériau de référence SiO<sub>2</sub> analysé.

### ii. Les nanoparticules NS@mSi fonctionnalisées

#### ii.1. Greffage (NS@mSi-gref)- Analyse des pics de cœur Si2p et O1s

Concernant la fonctionnalisation de surface des nanoparticules par le greffon, les nanoparticules conservées pour la suite du travail (synthèse n°2) ont été caractérisées par XPS. Les pics de cœur Si2p et O1s sont présentés dans la Figure III-22. Il est relativement complexe de distinguer les atomes de silicium de la coquille de silice, de ceux du greffon. Le spectre Si2p correspond donc à un signal moyen. De la même manière, la difficulté à traduire l'ensemble des environnements chimiques du spectre O1s de ces systèmes complexes nous a amené à considérer une réflexion sur la seule base des profils expérimentaux des pics.

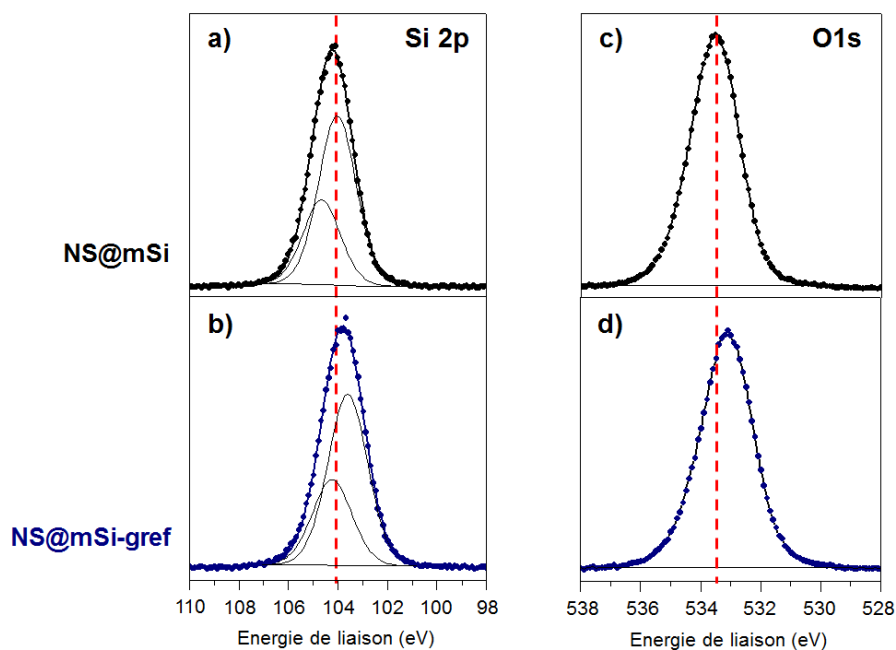


Figure III-22 : Pics de cœur XPS Si2p et O1s avant (a, c) et après greffage (b, d)



Avec le greffage, les pics de cœur XPS Si2p<sub>3/2</sub> et O1s se déplacent vers les basses énergies de liaison (Tableau III-6). Cet effet traduit la modification de l'environnement d'une partie des atomes de silicium et d'oxygène de surface. Le  $\Delta E_L$  (O1s-Si2p<sub>3/2</sub>) (= 429,5 eV) correspond à une valeur intermédiaire entre celui de la silice mésoporeuse (= 429,3 eV) et celui du greffon condensé (= 429,8 eV). Devant la difficulté à maîtriser l'homogénéité de la répartition spatiale des greffons, ce greffage offre un bon compromis entre un greffage effectif et une disponibilité relative sans la contrainte à priori d'une possible auto-condensation.

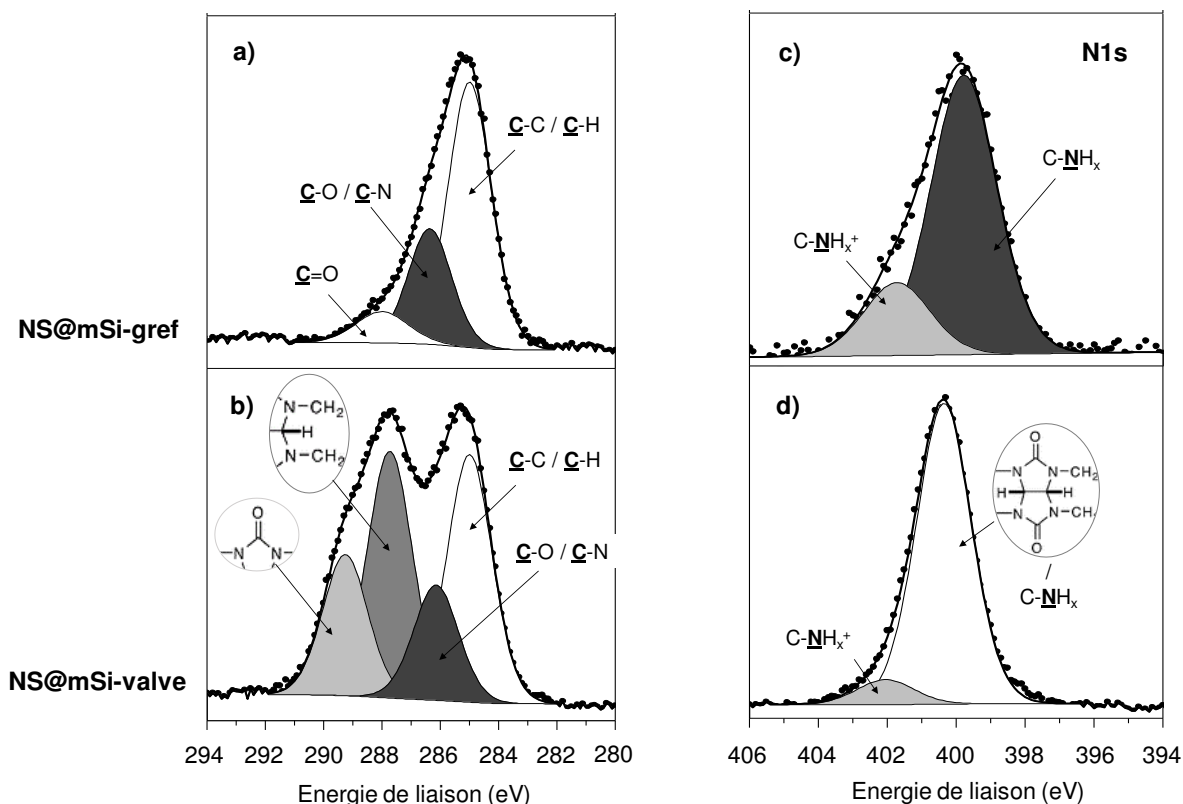
## ii.2. Nano-systèmes complets (NS@mSi-valve)

La fonctionnalisation complète, réalisée après interaction des greffons avec le macrocycle CB6, est mise en évidence par l'évolution des pourcentages atomiques (Tableau III-6). En effet, les quantités de silicium et d'oxygène détectées diminuent respectivement de 31,9 % at. à 24,0 % at. et de 53,6 % at. à 42,6 % at. alors que celle en carbone augmente de 14,5% at. à 24,9 % at. De plus, l'azote initialement détecté en faible quantité dès la première étape de la fonctionnalisation, voit son pourcentage atomique augmenter significativement après ajout du macrocycle. L'analyse quantitative confirme donc un recouvrement de surface.

**Tableau III-6 : Energies de liaisons et pourcentages atomiques des pics de cœur XPS C1s, N1s, O1s et Si2p des nanoparticules NS@mSi, NS@mSi-gref et NS@mSi-valve**

Pics de cœur	NS@mSi		NS@mSi-gref		NS@mSi-valve	
	EL (eV) (fwhm (eV)) <sup>a</sup>	% at.	EL (eV) (fwhm (eV)) <sup>a</sup>	% at.	EL (eV) (fwhm (eV)) <sup>a</sup>	% at.
C1s	285,0 (1,5)	9,3	285,0 (1,7)	10,8	285,0 (1,8)	7,9
	286,1 (1,5)	3,3	286,4 (1,7)	4,9	286,0 (1,8)	3,8
	287,4 (1,5)	1,4	288,2 (1,7)	1,4	287,7 (1,8)	8,5
	289,1 (1,5)	0,5			289,3 (1,8)	4,7
<b>% at total</b>		<b>14,5</b>		<b>17,1</b>		<b>24,9</b>
N1s	-	-	399,9 (2,2)	1,5		
	-	-			400,4 (2,0)	7,8
	-	-	401,7 (2,2)	0,5	402,1 (2,0)	0,7
<b>% at total</b>			<b>2,0</b>		<b>8,5</b>	
O1s	533,5 (1,8)	49,4	533,1 (1,8)	47,9	532,9 (2,1)	42,6
	534,8 (1,8)	4,2	534,3 (1,8)	3,6		
<b>% at total</b>		<b>53,6</b>		<b>51,5</b>		<b>42,6</b>
Si 2p <sub>3/2</sub>	104,0 (1,7)	21,3	103,5 (1,7)	19,6	103,4 (1,8)	16,0
Si 2p <sub>1/2</sub>	104,7 (1,7)	10,6	104,1 (1,7)	9,8	104,0 (1,8)	8,0
<b>% at total</b>		<b>31,9</b>		<b>29,4</b>		<b>24,0</b>

L'analyse qualitative permet par ailleurs de mieux apprécier la physico-chimie de surface de la fonctionnalisation (Figure III-23).



**Figure III-23 : Pics de cœur XPS C1s et N1s des nanoparticules NS@mSi-gref (a, c) et NS@mSi-valve (b, d)**

Le greffage reste cependant difficile à mettre en évidence par l'étude du pic de cœur C1s (Figure III-23.a). La composante à 285,0 eV associée aux carbones aliphatiques  $\underline{\text{C}}\text{-C}/\underline{\text{C}}\text{-H}$  augmente légèrement après greffage (Tableau III-6) et une nouvelle composante apparaît à 286,4 eV assimilable à des groupements type  $\underline{\text{C}}\text{-N}/\underline{\text{C}}\text{-O}$  mais elles ne témoignent pas clairement de la présence du diaminoalcoxysilane. A l'inverse, la détection d'un signal N1s après greffage avec deux composantes à 399,9 eV et 401,7 eV correspondant respectivement aux groupements amines ( $-\text{CH}_2\text{-}\underline{\text{N}}\text{H}-\text{CH}_2\text{-}/-\text{CH}_2\text{-}\underline{\text{N}}\text{H}_2$ ) et ammoniums ( $-\text{CH}_2\text{-}\underline{\text{N}}\text{H}_2^+-\text{CH}_2\text{-}/-\text{CH}_2\text{-}\underline{\text{N}}\text{H}_3^+$ ) du greffon en accord avec la référence de greffon protoné, confirme la première étape de la fonctionnalisation (Figure III-23.c). Nous pouvons remarquer que la majorité des groupements amines du greffon est présente à la surface des nanoparticules sous la forme basique non protoné du fait de la réalisation de la synthèse en milieu anhydre.

Après fermeture des nanovalves, le pic de cœur Si2p est repéré à la même énergie de liaison (Tableau III-6) attestant de la conservation du greffage. Les pics de cœur C1s et N1s des nanoparticules NS@mSi-valve sont très similaires à ceux obtenus pour l'échantillon référence greffon<sup>+</sup>/CB6. Tout d'abord, le spectre C1s présente les quatre mêmes composantes à 285,0 eV, 286,0 eV, 287,7 eV, 289,3 eV, les deux dernières à haute énergie de liaison étant caractéristiques du CB6 (Figure III-23.b). Le pic de cœur N1s

met en évidence deux environnements (Figure III-23.d). Comme pour la référence, la composante majoritaire à 400,4 eV correspond en grande partie aux groupements carbamides du CB6 mais également aux groupements amines du greffon dans le cas où ils ne sont pas protonés. Celle à plus haute énergie de liaison (402,1 eV) est significative de la présence de groupements ammoniums du greffon ( $-\text{CH}_2-\underline{\text{N}}\text{H}_2^+-\text{CH}_2-/-\text{CH}_2-\underline{\text{N}}\text{H}_3^+$ ). D'un point de vue quantitatif, la stœchiométrie  $C2/C3/N1$  du CB6 est conservée (Tableau III-6).

Ces résultats confirment donc la présence du greffon et du CB6 à la surface des nanoparticules. Dans la suite de ce travail, nous avons décidé de caractériser les nanoparticules fonctionnalisées en RMN des solides afin d'essayer d'obtenir des informations plus précises sur la formation du complexe ou non à la surface des nanoparticules. Une première étude en RMN des liquides des matériaux références sera présentée initialement, afin de mettre en évidence des modifications spectrales spécifiques du greffon et du macrocycle lors de la formation du complexe. L'analyse de ces systèmes sera également réalisée en RMN des solides, et enfin les nanoparticules fonctionnalisées seront caractérisées.

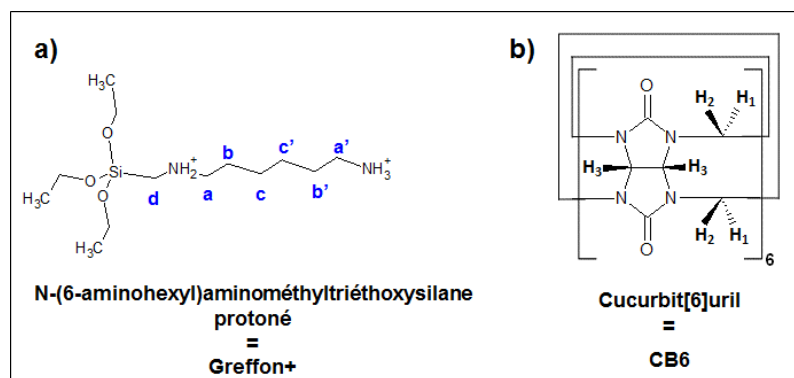
Les principes fondamentaux de la RMN sont détaillés en Annexe (Annexe A.2.ii, p.221).

## 2. Analyse par RMN des liquides et des solides des nanoparticules

### a. Etude préliminaire des matériaux de référence par RMN des liquides

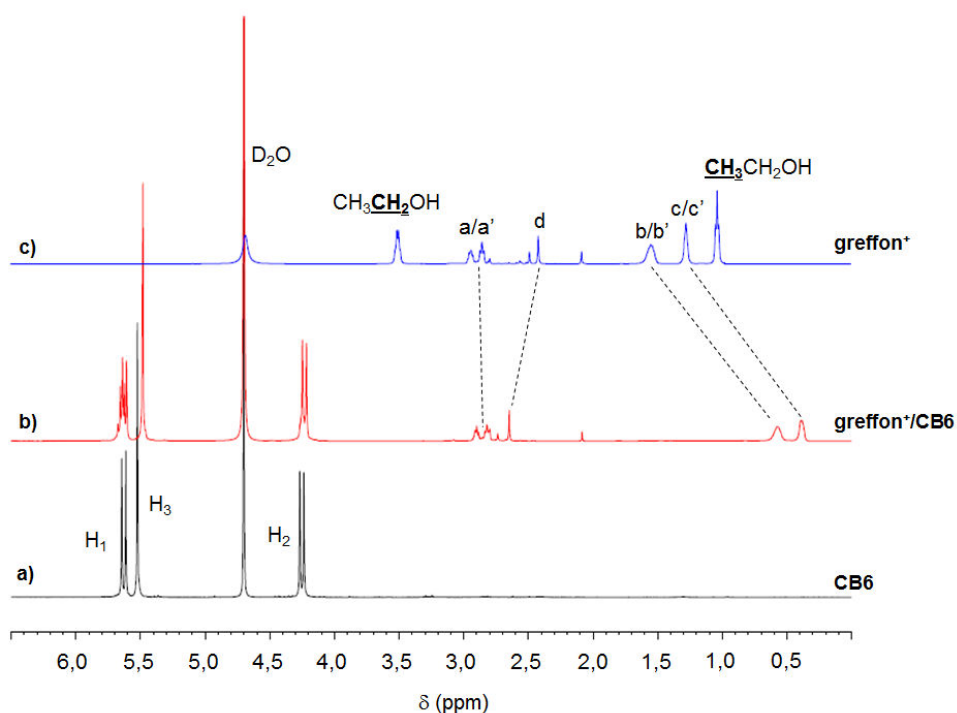
Dans la littérature, les interactions à l'origine des assemblages supramoléculaires, entre une molécule « invitée » organique chargée positivement et un macrocycle « hôte », sont généralement mises en évidence par des expériences de RMN des liquides 1D  $^1\text{H}$ <sup>[24-27]</sup> et 2D  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  ROESY<sup>[24,26]</sup> ou NOESY<sup>[25]</sup>, ces deux dernières permettant de sonder la proximité spatiale ( $\leq 5 \text{ \AA}$ ) entre molécules. Concernant la famille des cucurbit[n]urils, la cavité interne constitue une région de blindage des protons. Les déplacements chimiques des atomes d'hydrogène des molécules invitées résidant à l'intérieur de cette cavité sont généralement décalés d'environ 1 ppm vers les hauts champs magnétiques<sup>[28]</sup>. Les atomes d'hydrogène situés plus proche des portails mais dans la cavité du CB sont plus faiblement impactés (décalage de -0,1 à -0,8 ppm). Enfin, les protons situés hors de la cavité sont légèrement déblindés (déplacement vers les bas champs, jusqu'à 0,7 ppm), et ce déplacement devient d'autant plus faible que la distance entre l'atome d'hydrogène et le portail augmente<sup>[13]</sup>. D'après la littérature<sup>[26]</sup>, les formes « libre » et « complexée » de la molécule invitée peuvent être simultanément observées sur le spectre RMN  $^1\text{H}$  des liquides ; ainsi le processus d'échange entre ces deux formes est relativement lent à l'échelle de temps de la RMN.

Pour plus de clarté lors de la présentation des résultats, les protons du greffon/greffon<sup>+</sup> et du CB6 seront identifiés comme indiqué dans la Figure III-24.



**Figure III-24 : Identification des protons des molécules : a) greffon/greffon<sup>+</sup> et b) CB6**

Les spectres RMN <sup>1</sup>H du greffon<sup>+</sup> et du CB6 obtenus en solution dans le D<sub>2</sub>O sont présentés dans la figure suivante (Figure III-25).



**Figure III-25 : Superposition des spectres RMN <sup>1</sup>H en solution dans le D<sub>2</sub>O de a) CB6, b) greffon<sup>+</sup>/CB6 et c) greffon<sup>+</sup>**

L'attribution des signaux du spectre <sup>1</sup>H du greffon<sup>+</sup> a été réalisée sur la base de l'étude de plusieurs spectres RMN des liquides : 1D <sup>13</sup>C, 2D <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HSQC (constante de couplage de type <sup>1</sup>J), 2D <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HMBC (<sup>2</sup>J, <sup>3</sup>J), 2D <sup>1</sup>H-<sup>29</sup>Si HMQC (<sup>1</sup>J) (Annexe, p.160-165). Ainsi, sur le spectre <sup>1</sup>H du greffon<sup>+</sup> (Figure III-25.c), le pic qui se présente sous la forme d'un triplet à 1,03 ppm est attribuable au groupement CH<sub>3</sub> de l'éthanol qui résulte de l'hydrolyse du greffon. Le quadruplet autour de 3,50 ppm correspond lui au groupement CH<sub>2</sub> de l'éthanol. Les signaux à 1,30 ppm et 1,50 ppm correspondent

respectivement aux protons aliphatiques  $c/c'$  et  $b/b'$ . Le singulet repéré à 2,42 ppm est caractéristique du proton  $d$ . Enfin, les résonances centrées autour de 2,85 ppm et 2,94 ppm sont attribuables aux protons  $a'$  et  $a$  respectivement. L'ensemble des autres pics visibles sur le spectre correspondent à des impuretés présentes dans le produit de commercial de départ.

L'attribution du spectre  $^1\text{H}$  du CB6 est plus facile du fait de la symétrie de la molécule. En effet, le plan de symétrie équatorial du macrocycle implique seulement trois protons à identifier sur le spectre RMN  $^1\text{H}$  (Figure III-24). Les protons notés  $H_1$  et  $H_2$  correspondent respectivement au proton interne (dirigé vers l'intérieur du macrocycle) et externe (dirigé vers l'extérieur du macrocycle) du groupement  $\text{CH}_2$  liant deux unités glycoluril tandis que le proton  $H_3$  correspond au proton du groupement  $\text{CH}$  de l'unité elle-même. Les deux protons du groupement  $\text{CH}_2$  étant non équivalents, leur signal RMN se présente sous la forme d'un doublet autour de 5,6 ppm pour  $H_1$  et 4,2 ppm pour  $H_2$ . Le proton  $H_3$  est caractérisé par un singulet à 5,5 ppm (Figure III-25.a).

La formation du complexe greffon<sup>+</sup>/CB6 en solution a dans un premier temps pu être démontrée par RMN des liquides  $^1\text{H}$ . En effet, le spectre (Figure III-25-b) met en évidence un faible blindage des protons  $a$  et  $a'$  (-0,04 ppm) tandis que le proton  $d$  est légèrement déblindé (+0,25 ppm). D'un autre côté, les protons  $b$ ,  $b'$ ,  $c$  et  $c'$ , situés dans la cavité, sont fortement blindés (-0,90 ppm), ce qui est en accord avec la littérature<sup>[28]</sup>.

La complexation a également une incidence sur les résonances du CB6. En effet, le singulet correspondant à  $H_3$  se blinde légèrement (-0,04 ppm) tandis que les doublets associés aux protons  $H_1$  et  $H_2$  se démultiplient avec l'interaction (Figure III-26).

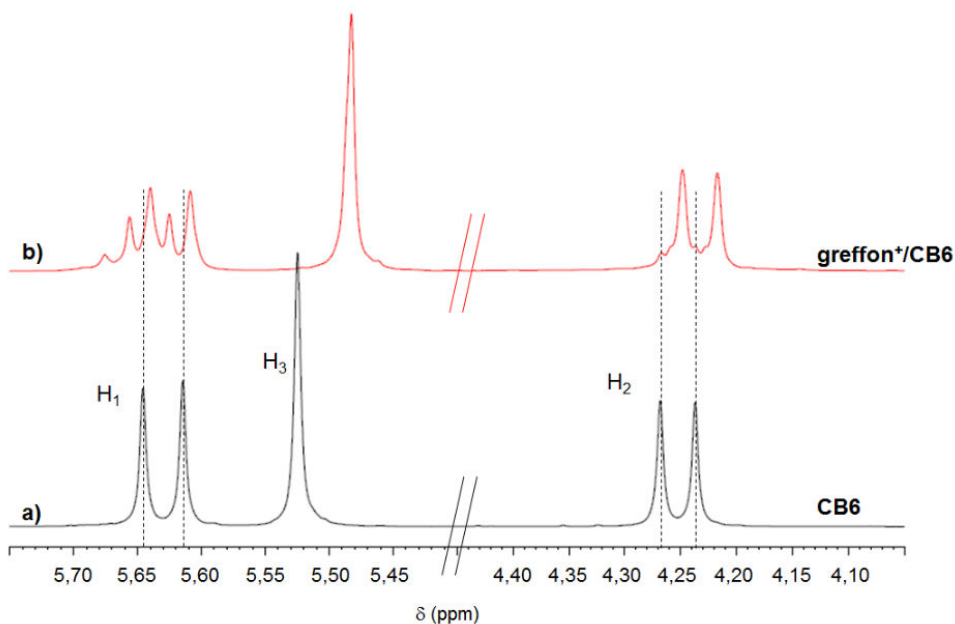


Figure III-26 : Spectres RMN  $^1\text{H}$  en solution dans le  $\text{D}_2\text{O}$  de a) CB6 et b) greffon<sup>+</sup>/CB6 - Zoom

L'inclusion d'une molécule dans la cavité du CB6 provoque la perte du plan de symétrie équatorial et donc les protons  $H_1$  et  $H_2$  de chaque portail ne sont plus équivalents ce qui est à l'origine d'une démultiplication des signaux (Figure III-26-b).

Enfin, nous pouvons affirmer que le greffon en solution est uniquement présent sous sa forme complexée. En effet, la complexation étant relativement lente par rapport à l'échelle de temps de la RMN, si les deux formes étaient présentes nous aurions observé deux pics pour les protons  $b/b'$  et  $c/c'$  respectivement. Il en est de même pour le CB6 car dans le cas où il resterait une part de forme libre, un pic associé à  $H_3$  serait observé à 5,5 ppm comme démontré par Masson et al.<sup>[27]</sup>

Afin d'appuyer ces premiers résultats, nous avons réalisé une expérience 2D  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  ROESY qui permet la mise en évidence de la proximité spatiale entre molécules ( $\leq 5 \text{ \AA}$ ). Rappelons que le CB6 possède une cavité d'environ 5,8  $\text{\AA}$  de diamètre interne et deux portails de 3,9  $\text{\AA}$  de diamètre. Par conséquent lors de l'inclusion de la molécule invitée, la distance entre les protons du CB6 et ceux de l'invité devrait permettre l'observation de signaux par effet NOE.

Le spectre 2D  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  ROESY présenté en Figure III-27 met en évidence plusieurs pics de corrélation hors diagonale : entre les protons  $a, a', b, b', c, c', d$  du greffon et les protons  $H_1$  du CB6. Nous pouvons également observer des pics de corrélation entre les protons  $H_3$  du CB6 et les protons aliphatiques  $b, b', c, c'$  du greffon suggérant une distance dans l'espace inférieure à 5  $\text{\AA}$  (résultat déjà reporté dans la littérature<sup>[26]</sup>). A l'inverse, aucun pic de corrélation n'apparaît entre le proton  $H_2$  du CB6 (dirigé vers l'extérieur) et les résonances du greffon. Ces résultats confirment la formation du complexe c'est-à-dire l'inclusion du greffon dans la cavité du CB6.

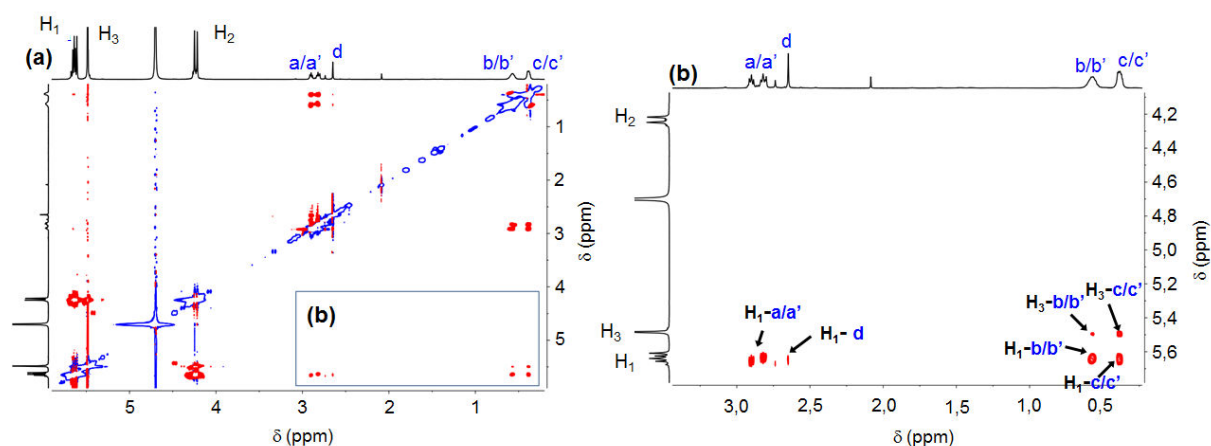


Figure III-27 : Spectre RMN 2D  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  ROESY du complexe greffon<sup>+</sup>/CB6 dans  $\text{D}_2\text{O}$ - a) Spectre complet et b) Zoom de la zone encadrée

Nous avons également effectué une expérience de type <sup>1</sup>H DOSY qui permet de mesurer les coefficients de diffusion d'un mélange de plusieurs espèces en solution et donc de mettre en évidence des phénomènes d'association. Le spectre présenté dans la Figure III-28 montre que l'ensemble des résonances du greffon<sup>+</sup> et du CB6 est associé à un seul coefficient de diffusion ( $2,2 \cdot 10^{-10}$  m<sup>2</sup>/s), significativement plus faible que celui de chaque entité sous sa forme libre (coefficient de diffusion mesurés par DOSY pour le greffon<sup>+</sup>:  $3,7 \cdot 10^{-10}$  m<sup>2</sup>/s, pour le CB6 :  $2,5 \cdot 10^{-10}$  m<sup>2</sup>/s).

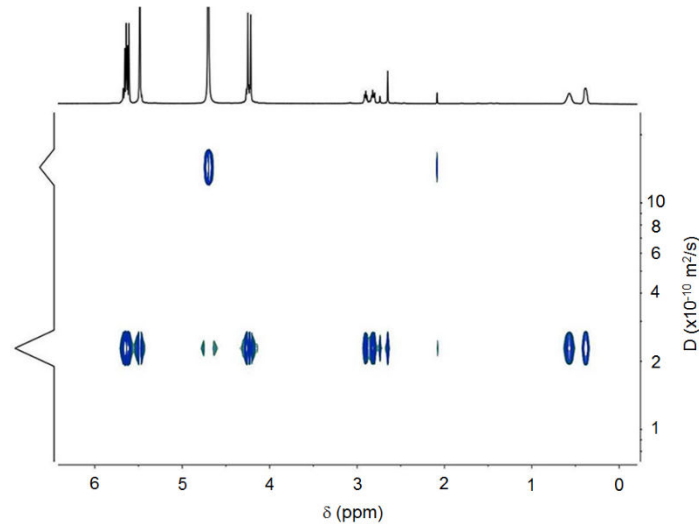


Figure III-28 : Spectre DOSY <sup>1</sup>H du complexe greffon<sup>+</sup>/CB6 dans D<sub>2</sub>O

A travers cette étude préliminaire par RMN des liquides <sup>1</sup>H nous avons pu tout d'abord identifier les résonances de chacun des sous-systèmes constituant les nanovalves. Par la suite, nous avons pu mettre en évidence les principales modifications spectrales caractéristiques de la formation du complexe soit :

- le blindage des protons aliphatiques *b*, *b'*, *c* et *c'* du greffon lors de son inclusion dans la cavité du CB6
- la démultiplication des doublets des protons *H*<sub>1</sub> et *H*<sub>2</sub> du CB6 du fait de la perte du plan de symétrie équatorial avec la complexation.

Enfin, la proximité spatiale entre les protons du greffon et essentiellement le proton *H*<sub>1</sub> du CB6 a pu être démontrée par effet NOE.

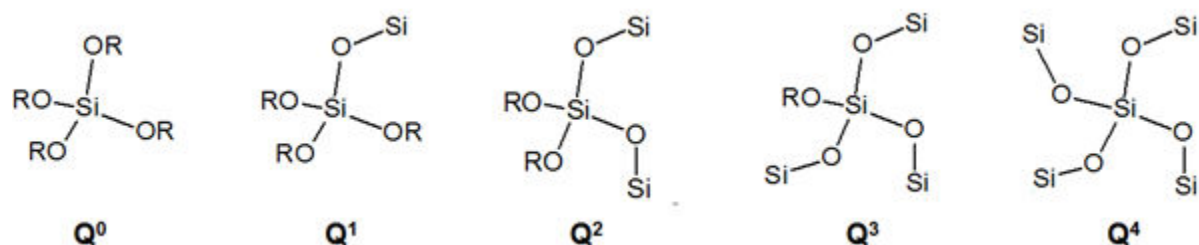
La suite logique de cette étude est de prouver la formation du complexe greffon<sup>+</sup>/CB6 à la surface des nanoparticules fonctionnalisées ce qui fait appel à la RMN des solides, l'échantillon se trouvant sous forme de poudre (non soluble dans l'eau).

## b. Caractérisation par RMN des solides <sup>29</sup>Si, <sup>13</sup>C et <sup>1</sup>H

### i. Analyse par RMN des solides <sup>29</sup>Si

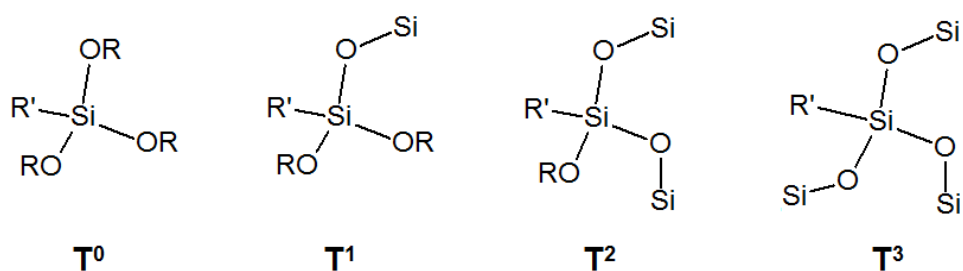
Afin de moyennner les interactions anisotropes prédominant en RMN des solides, nous avons utilisé la technique de rotation rapide (10 kHz) de l'échantillon à l'angle magique  $\beta = 54,74^\circ$  (Magic Angle Spinning, MAS) (Annexe A.2.ii, p.226).

Dans un premier temps, nous avons étudié le noyau  $^{29}\text{Si}$  afin de confirmer le greffage du diaminoalcoxysilane à la surface des nanoparticules, déjà mis en évidence par XPS. En effet, la RMN du  $^{29}\text{Si}$  est particulièrement intéressante puisqu'elle permet de caractériser le taux de polycondensation des atomes de silicium dans la silice ou dans les matériaux hybrides organiques-inorganiques siliciés. Le noyau  $^{29}\text{Si}$  est peu abondant (4,7%) et possède un temps de relaxation assez long ce qui en fait un noyau difficile à exploiter. Pour cette raison, on a généralement recours à des séquences d'acquisition avec transfert de polarisation (Cross Polarization CP) entre les atomes d'hydrogène et l'atome de silicium. Il devient alors possible de différencier les différents types d'atomes de silicium présents dans le système. Par exemple, dans le cas de l'hydrolyse-condensation du tétraalcoxysilane ( $\text{Si}(\text{OR})_4$  avec  $\text{R}=\text{H}$  ou  $\text{C}_n\text{H}_{2n+1}$ ), il est possible d'obtenir 5 types d'atomes de silicium différents (notés  $\text{Q}^n$  avec  $n$  le nombre de liaison  $\text{Si-O-Si}$ ) selon le taux de polycondensation (Figure III-29).



**Figure III-29 : Identification des structures des cinq types d'atomes de silicium ( $\text{Si}(\text{OR})_4$ ) différents en fonction du taux de polycondensation**

Dans le cas d'un précurseur du type  $\text{R}'\text{Si}(\text{OR})_3$ , il existe quatre types d'atomes de silicium (noté  $\text{T}^n$  avec  $n$  le nombre de liaison  $\text{Si-O-Si}$ ) possible selon le taux de polycondensation (Figure III-30).



**Figure III-30 : Identification des structures des quatre types d'atomes de silicium ( $\text{R}'\text{Si}(\text{OR})_3$ ) différents en fonction du taux de polycondensation**

De la même manière, on associera les signaux  $\text{D}^0$ ,  $\text{D}^1$  et  $\text{D}^2$  pour un précurseur du type  $\text{R}_1\text{R}_2\text{Si}(\text{OR})_2$  et les signaux  $\text{M}^0$  et  $\text{M}^1$  pour un précurseur  $\text{R}_1\text{R}_2\text{R}_3\text{Si}(\text{OR})$ .



Ainsi, l'ensemble de ces signaux correspondent à des déplacements chimiques distincts en RMN du <sup>29</sup>Si (Figure III-31).

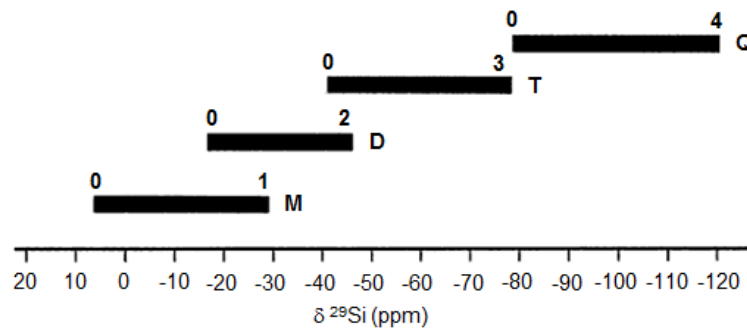


Figure III-31: Les déplacements chimiques en RMN <sup>29</sup>Si

Le spectre RMN CP-MAS <sup>1</sup>H-<sup>29</sup>Si des nanoparticules NS@mSi est présenté dans la Figure III-32.a. Des résonances intenses à -91, -101 et -110 ppm, qui correspondent respectivement aux atomes de silicium du type Q<sup>2</sup>, Q<sup>3</sup> et Q<sup>4</sup>, peuvent être observées.

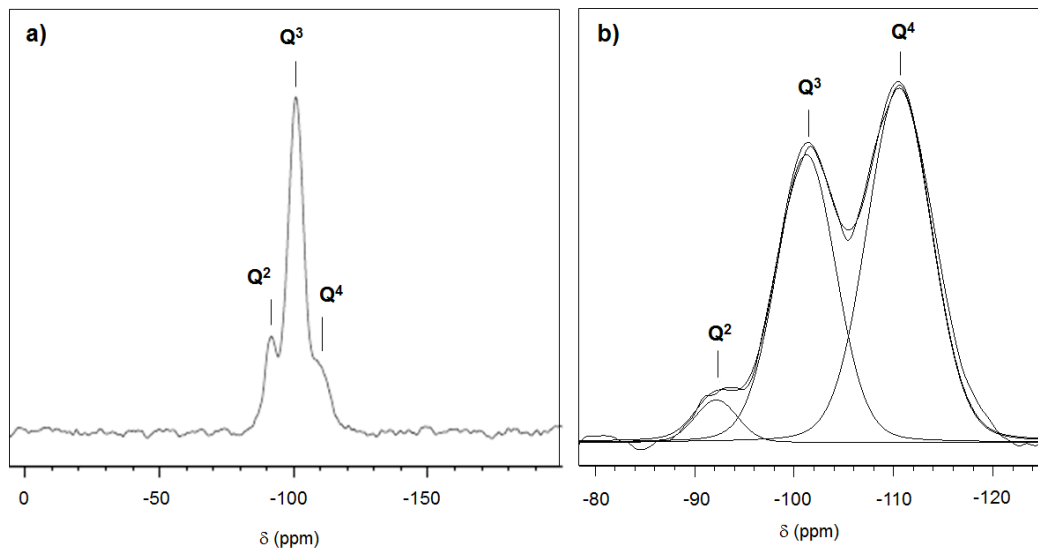
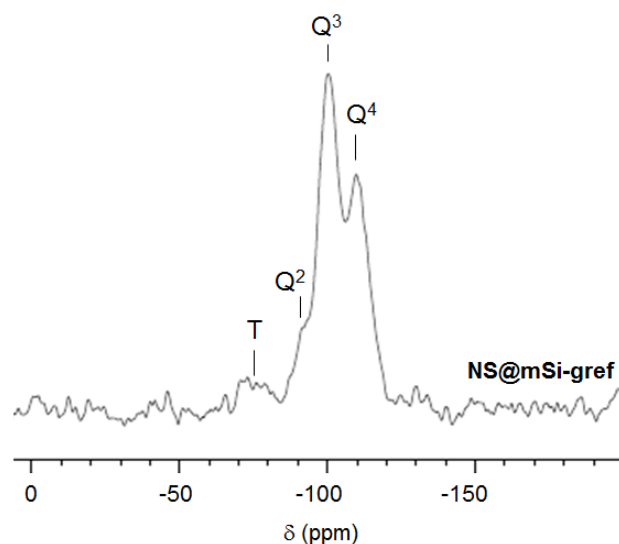


Figure III-32 : Spectres RMN des nanoparticules NS@mSi: a) CP-MAS <sup>1</sup>H-<sup>29</sup>Si et b) <sup>29</sup>Si déconvolué

L'évaluation quantitative du degré de polycondensation ne peut être réalisée via les spectres CP-MAS car le transfert de polarisation utilisé afin d'amplifier le signal n'est pas quantitatif. Il faut donc utiliser les spectres <sup>29</sup>Si obtenus sans transfert de polarisation. Après déconvolution du signal (Figure III-32.b) (à l'aide du logiciel MestRe-C®), une estimation correcte des taux de polycondensation du silicium peut être obtenue. Le ratio Q<sup>2</sup>:Q<sup>3</sup>:Q<sup>4</sup> est égal à 4:43:53 pour les nanoparticules NS@mSi démontrant ainsi que la silice est relativement bien condensée (87% des fonctions Si-OR de départ ont donné lieu à un pont siloxane Si-O-Si) mais également que les groupes Si-OH simples sont les espèces silanols qui

dominant dans le matériau (signaux  $Q^3 > Q^2$ ). Ces résultats sont en accord avec les données de la littérature pour des matériaux mésoporeux<sup>[29-31]</sup>.

Sur le spectre RMN CP-MAS  $^1\text{H}$ - $^{29}\text{Si}$  (Figure III-33) des nanoparticules greffées NS@mSi-gref, on retrouve les résonances à -91 ppm ( $Q^2$ ), -101 ppm ( $Q^3$ ) et -110 ppm ( $Q^4$ ). Les signaux de type T se distinguent à peine du bruit de fond ce qui démontre que la quantité d'atomes de silicium de type T est très faible par rapport aux atomes de type Q.



**Figure III-33 : Spectre RMN  $^{29}\text{Si}$  CP-MAS des nanoparticules NS@mSi-gref**

Deux hypothèses peuvent être avancées pour justifier l'absence des signaux T :

- soit le nombre d'atomes de silicium en volume est très important par rapport à ceux en surface impliquant donc que le nombre d'atomes de silicium pouvant participer au greffage est relativement faible.
- soit le taux de greffage est très faible.

Néanmoins, d'après les analyses BET, le greffage conduit à une diminution significative de la surface spécifique et du volume poreux. La première hypothèse semble donc plus probable. Des analyses thermogravimétriques permettraient de répondre à cette question.

## ii. Analyse par RMN des solides $^{13}\text{C}$ (CP-MAS)

Pour les matériaux hybrides organiques-inorganiques, la RMN du  $^{13}\text{C}$  devient également un outil intéressant pour caractériser la partie organique de l'hybride. Afin d'étudier plus précisément les nanovalves, nous avons réalisé des expériences RMN  $^{13}\text{C}$  CP-MAS. Dans un premier temps, le greffon protoné ainsi que la CB6 ont été analysés afin d'identifier les différents signaux et dans un second temps les nanoparticules greffées ont été caractérisées.

### ii.1. Caractérisation des composés de référence : greffon protoné (greffon<sup>+</sup>) et macrocycle (CB6)

L'attribution des signaux sur les spectres <sup>13</sup>C CP-MAS des composés de référence greffon<sup>+</sup> et CB6 (Figure III-34) a été réalisée sur la base de leur étude par RMN des liquides.

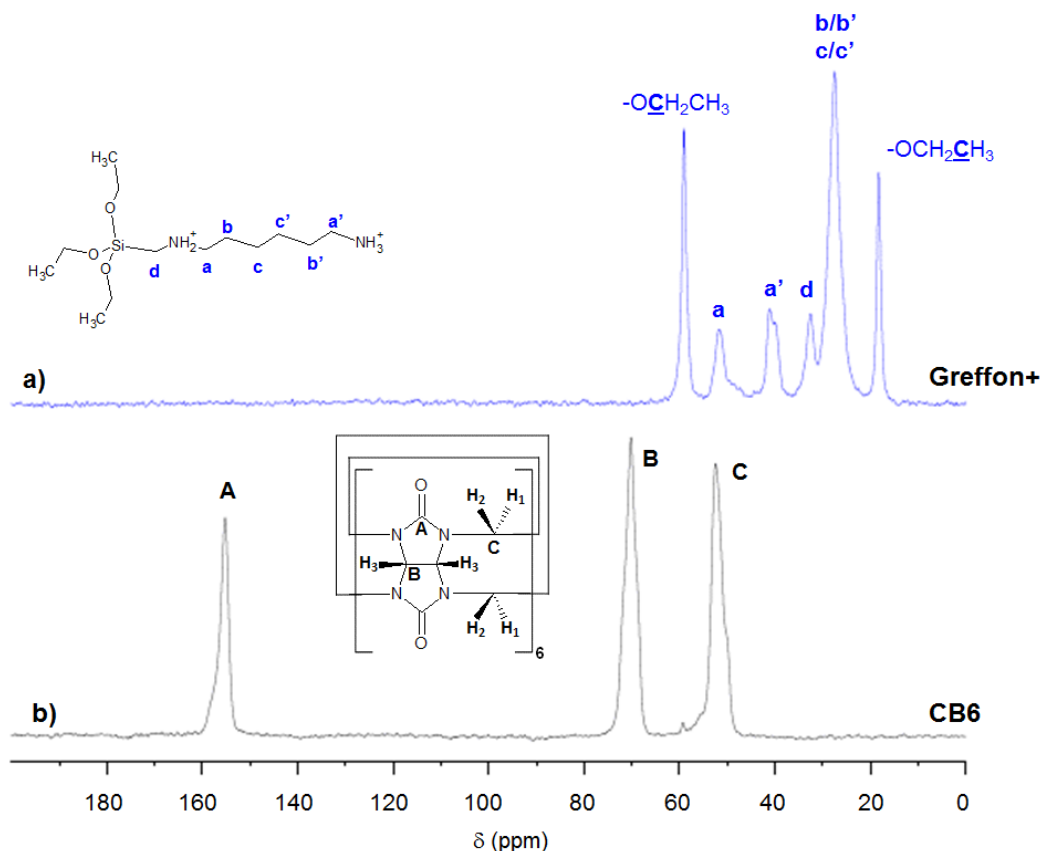


Figure III-34 : Spectres RMN <sup>13</sup>C CP-MAS a) du greffon<sup>+</sup> et b) du CB6

Sur le spectre RMN <sup>13</sup>C CP-MAS du greffon protoné (Figure III-34.a), les pics à 18,3 ppm et 59,1 ppm correspondent respectivement aux groupements CH<sub>3</sub> et CH<sub>2</sub> de la fonction ethoxy du greffon protoné. Le pic large à 27,5 ppm est caractéristique des carbones aliphatiques *b/b'* et *c/c'*. Les résonances à 32,6 ppm et 51,7 ppm sont attribuables aux carbone *d* et *a* respectivement. Enfin, pour l'atome de carbone *a'*, deux résonances à 40,0 ppm et 41,3 ppm sont observées.

Ce dédoublement des raies a déjà été mis en évidence dans la littérature<sup>[32,33]</sup> dans le cas du greffage du 3-aminopropyltriéthoxysilane (APTES). Il est attribué à la formation de liaisons hydrogène impliquant le groupement amine terminal.

Concernant le spectre <sup>13</sup>C CP-MAS du CB6 (Figure III-34.b), il met en évidence trois résonances à 52,5 ppm, 70,2 ppm et 155,4 ppm qui sont caractéristiques des groupements CH<sub>2</sub> (C), CH (B) et C=O (A). La plupart des signaux <sup>13</sup>C caractéristiques du greffon<sup>+</sup> et du CB6 ne se superposent pas (sauf les

carbone  $a$  du greffon<sup>+</sup> et  $C$  du CB6) ce qui permet d'identifier sans ambiguïté les deux molécules à la surface des nanoparticules.

## ii.2. Nanoparticules fonctionnalisées (NS@mSi-gref et NS@mSi-valve)

Sur le spectre RMN  $^{13}\text{C}$  CP-MAS des nanoparticules NS@mSi-gref (Figure III-35.a), l'ensemble des résonances du greffon sont observées (Tableau III-7).

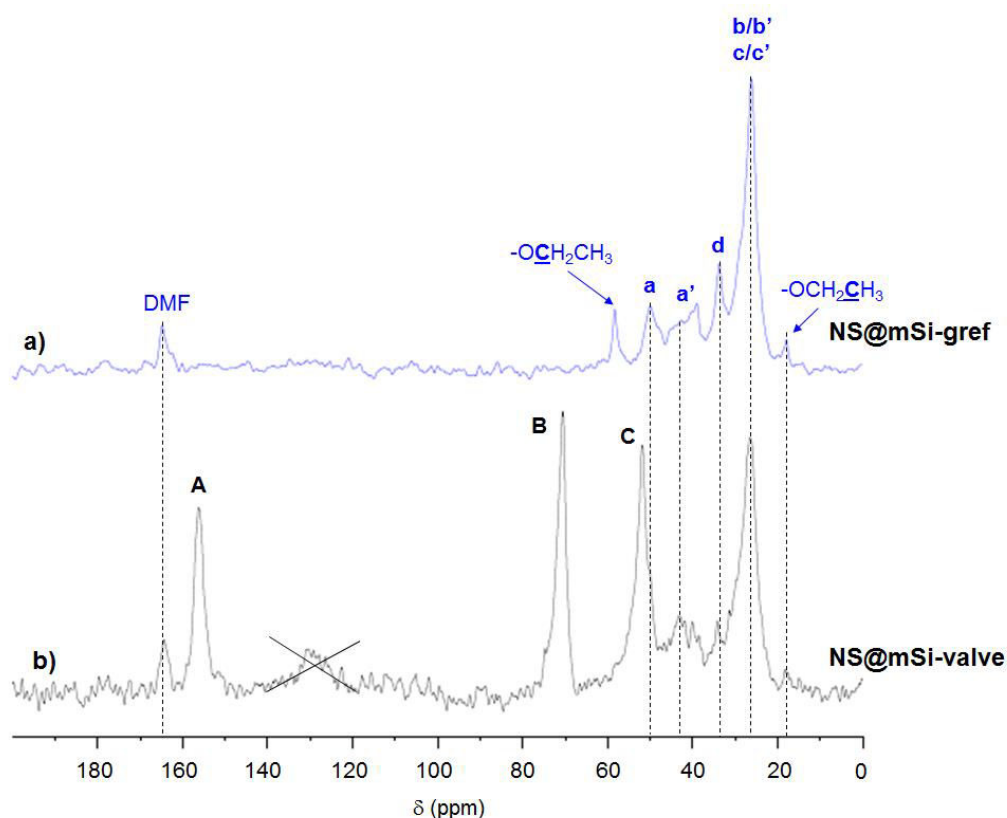


Figure III-35 : Spectres RMN  $^{13}\text{C}$  CP-MAS des nanoparticules a) NS@mSi-gref et b) NS@mSi-valve

Les atomes de carbone  $a$  et  $a'$  sont caractérisés par des pics assez larges qui résultent ici des interactions entre les amines et les silanols de surface. Ces signaux traduisent à la fois les organisations multiples du greffon à la surface des nanoparticules et peut être également la présence de greffon physisorbé (lié à la surface par des interactions faibles). De plus, les résonances correspondant aux fonctions éthoxy ( $-\text{Si}-\text{OCH}_2\text{CH}_3$ ), repérées à 17,9 ppm et 58,3 ppm, sont observées ce qui signifie que celles-ci n'ont pas totalement réagi avec les Si-OH de surface en accord avec les résultats de la littérature<sup>[16]</sup>. Enfin, le pic situé à 165,1 ppm est attribuable à des résidus de diméthylformamide (DMF) physisorbé dans les mésopores de la coquille de silice qui est difficile à éliminer en totalité du fait de son haut point d'ébullition.

Après avoir caractérisé les nanoparticules greffées, nous avons ensuite étudié le système complet NS@mSi-valve. Le spectre RMN <sup>13</sup>C CP-MAS est présenté dans la Figure III-35.b. Tout d'abord, l'ensemble des résonances associées au greffon se retrouvent sur le spectre ce qui signifie que l'étape de complexation ne modifie pas la fonctionnalisation de surface des nanoparticules. L'atome de carbone a' présente toujours de multiples résonances ce qui démontre que l'interaction entre le greffon et la surface demeure. La résonance associée à l'atome de carbone a est masquée par la présence du CB6. En effet, les résonances situées à 51,8 ppm, 70,5 ppm et 156,1 ppm correspondent respectivement aux groupements CH<sub>2</sub> (C), CH (B) et C=O (A) du CB6 en accord avec le spectre de référence du macrocycle (Figure III-34.b).

**Tableau III-7 : Déplacements chimiques RMN <sup>13</sup>C associés aux nanoparticules NS@mSi-gref et NS@mSi-valve**

<sup>13</sup> C	NS@mSi-gref δ (ppm)	NS@mSi-valve δ (ppm)
-O <u>C</u> H <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	17,8	18,0
b/b', c/c'	26,2	26,1
d	33,7	34,1
a'	42,6	42,7
a	50,1	
-OCH <sub>2</sub> <u>C</u> H <sub>3</sub>	58,3	59,0
C	-	51,7
B	-	70,6
A	-	156,6
DMF	165,1	164,6

A ce stade de la caractérisation par RMN des solides, l'étude des noyaux <sup>29</sup>Si et <sup>13</sup>C nous a permis de montrer que le diaminoalcoxysilane était greffé à la surface des nanoparticules, que l'ensemble des fonctions éthoxy du greffon n'était pas condensé et enfin que le greffon s'organisait de plusieurs manières à la surface des nanoparticules via probablement des interactions faibles entre les fonctions amines et les silanols de surface. Les expériences RMN <sup>13</sup>C CP-MAS ont également démontré la présence du CB6. Ainsi, l'ensemble des résultats obtenus par RMN des solides sont en accord avec ceux obtenus en XPS.

Comme nous l'avons vu dans l'étude préliminaire en RMN des liquides mais également au travers de la littérature, le noyau <sup>1</sup>H est généralement le noyau le plus étudié pour la mise en évidence de la formation du complexe en solution. Néanmoins, en RMN des solides, le proton n'est pas le noyau de choix car les interactions anisotropes (en particulier les couplages dipolaires <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H) élargissent les résonances ce qui ne permet pas de différencier les environnements chimiques. La rotation à l'angle magique (54,74°) de

l'échantillon permet de moyenniser ces interactions mais des vitesses de rotation très importantes doivent être utilisées.

Ainsi, nous avons réalisé des expériences RMN  $^1\text{H}$  MAS en augmentant la vitesse de rotation du rotor (60 kHz) afin d'identifier le blindage des protons aliphatiques du greffon dans le cas de la formation des nanovalves à la surface des nanoparticules. Les spectres  $^1\text{H}$  MAS des systèmes greffon $^+$ /CB6, NS@mSi-gref et NS@mSi-valve sont présentés dans la Figure III-36.

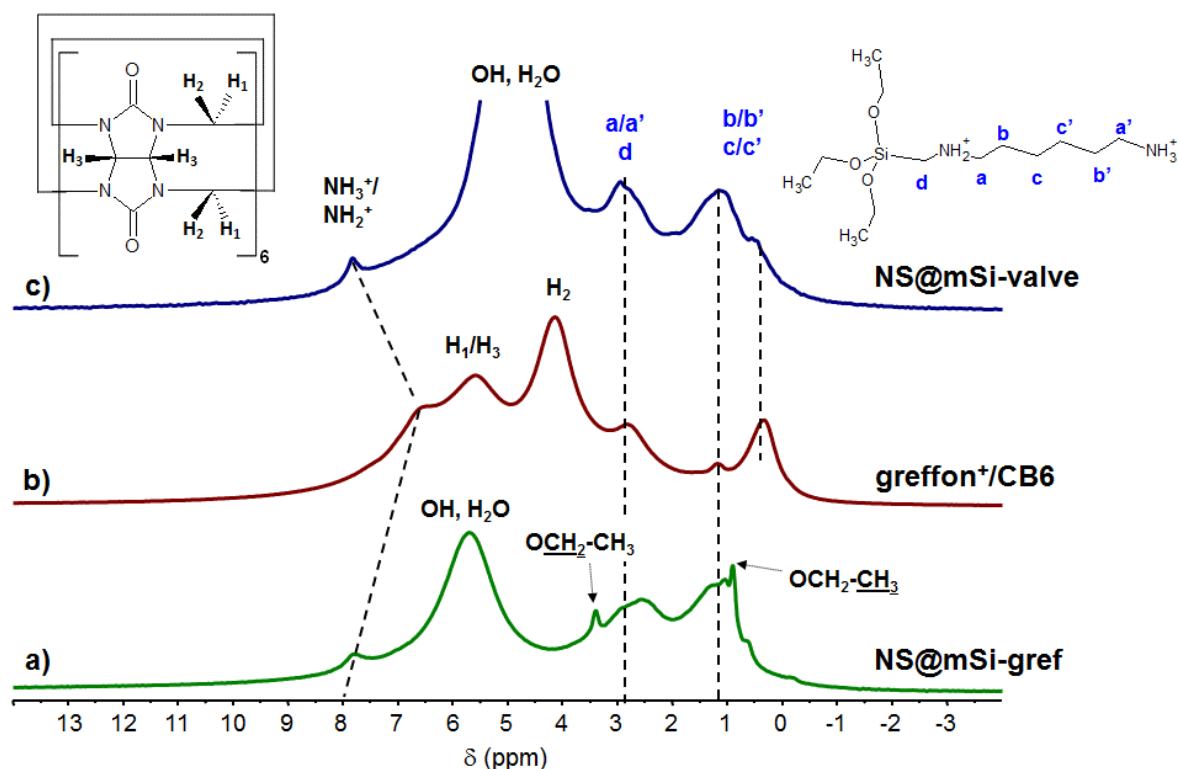


Figure III-36 : Spectres RMN  $^1\text{H}$  MAS des systèmes a) NS@mSi-gref, b) greffon $^+$ /CB6 et c) NS@mSi-valve

Sur le spectre RMN  $^1\text{H}$  MAS des nanoparticules NS@mSi-gref (Figure III-36.a), le pic à 5,7 ppm est caractéristique des groupements silanols ainsi que de la présence d'eau. Les protons associés aux groupements amines se distinguent par RMN  $^1\text{H}$  des solides à 7,8 ppm. Entre 0 et 4 ppm, plusieurs structures de signaux sont identifiées. Les pics à 0,9 ppm et 3,4 ppm correspondent respectivement aux protons des groupements  $\text{CH}_2$  et  $\text{CH}_3$  des fonctions ethoxy du greffon ( $-\text{Si}-\text{OCH}_2\text{CH}_3$ ) n'ayant pas réagi en accord avec le spectre RMN  $^{13}\text{C}$ . La plus fine largeur de ces pics traduit une dynamique plus grande de ces groupements. Le massif centré autour de 1 ppm correspond aux protons aliphatiques du greffon  $b$ ,  $b'$ ,  $c$ ,  $c'$  tandis que celui centré autour de 2,6 ppm est attribuable aux protons  $a$ ,  $a'$  et  $d$ .

Le spectre RMN  $^1\text{H}$  MAS du système référence greffon $^+$ /CB6 présente plusieurs résonances (Figure III-36.b). Le pic le plus intense à 4,3 ppm correspond aux protons  $H_2$  du CB6 et très certainement à de l'eau tandis que celui à 5,7 ppm est attribuable à la fois aux protons  $H_1$  et  $H_3$  de CB6. L'ensemble

des autres résonances correspondent donc aux protons du greffon avec les groupements ammoniums qui apparaissent à 6,6 ppm et le pic à 2,7 ppm qui correspond aux protons *a*, *a'* et *d*. Enfin, dans la zone de fréquence des protons aliphatiques, deux pics sont identifiables à 0,4 et 1,3 ppm. Le pic le plus intense à 0,4 ppm correspond aux protons aliphatiques de molécules de greffon situées dans la cavité du CB6 tandis que celui à 1,3 ppm est caractéristique des protons *b*, *b'*, *c*, *c'* de molécules de greffon libres en accord avec le spectre RMN <sup>1</sup>H MAS des nanoparticules NS@mSi-gref (Figure III-36.a). Ainsi, les deux formes du greffon, libre et complexée, sont présentes dans l'échantillon greffon<sup>+</sup>/CB6 sous forme de poudre dans des proportions différentes. Ce premier résultat montre qu'il est donc possible de démontrer par RMN des solides la formation du complexe entre le greffon et le macrocycle.

Néanmoins, le même échantillon, dissous dans le D<sub>2</sub>O et analysé par RMN <sup>1</sup>H des liquides avait montré une complexation totale des molécules de greffon. Ainsi, la précipitation de l'échantillon modifie l'état de complexation des molécules de greffon.

Concernant le spectre <sup>1</sup>H MAS du système NS@mSi-valve, une première remarque concerne le pic très intense autour de 4,7 ppm qui correspond à l'eau adsorbée ainsi qu'aux groupements silanols, et qui masquent totalement les résonances <sup>1</sup>H du CB6. Le pic à 2,9 ppm est assigné aux protons *a*, *a'* et *d* en accord avec les spectres des systèmes NS@mSi-gref et greffon<sup>+</sup>/CB6. Pour les protons aliphatiques du greffon, deux pics sont là encore observés à 0,4 ppm et 1,3 ppm. A l'inverse de la référence greffon<sup>+</sup>/CB6, le pic majoritaire est dans ce cas celui correspondant au greffon sous sa forme libre impliquant qu'une grande partie des greffons n'est pas complexée à la surface des nanoparticules. En accord avec ce résultat, le pic correspondant aux groupements amine/ammonium est repéré à 7,9 ppm, soit à plus haute fréquence par rapport à l'échantillon greffon<sup>+</sup>/CB6. Néanmoins, la résonance de ces groupements dans le cas du greffon complexé attendu autour de 6,6 ppm n'est pas visible. Elle est probablement masquée soit par le pic de l'eau ou alors par les couplages dipolaires proton-proton qui réduisent la résolution spectrale en RMN des solides.

Pour confirmer ces résultats, nous avons réalisé une étude RMN 2D <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H MAS à double quanta (DQ) (expérience RMN bidimensionnelle filtrée à double quanta). Nous avons utilisé la séquence BaBa2Rot qui permet de détecter des protons qui sont en interaction via des couplages dipolaires (à travers l'espace < 5 Å). L'idée ici est d'essayer de mettre en évidence les corrélations entre les protons *a*, *a'*, *b*, *b'*, *c*, *c'*, *d* du greffon et le proton *H<sub>I</sub>* du CB6 comme identifiées lors de l'expérience RMN <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H ROESY en solution.

Le spectre RMN 2D  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  DQ MAS du complexe greffon<sup>+</sup>/CB6 est présenté sur la Figure III-37. Sur le spectre bidimensionnel de corrélation, les déplacements chimiques donnés en abscisse (dimension simple quantum : 1Q) sont ceux d'un spectre RMN  $^1\text{H}$  classique tandis qu'en ordonnée (dimension double quanta : 2Q), les valeurs numériques correspondent à la somme des déplacements chimiques des protons qui corrélerent par couplage dipolaire entre eux. Les tâches qui apparaissent sur la diagonale sont des tâches d'autocorrélation (repérées en rouge par les lettres A, B, C, D et E) qui résultent des couplages dipolaires existant entre deux protons équivalents. Ce sont donc les tâches hors diagonale qui renseignent sur les proximités spatiales entre deux protons différents.

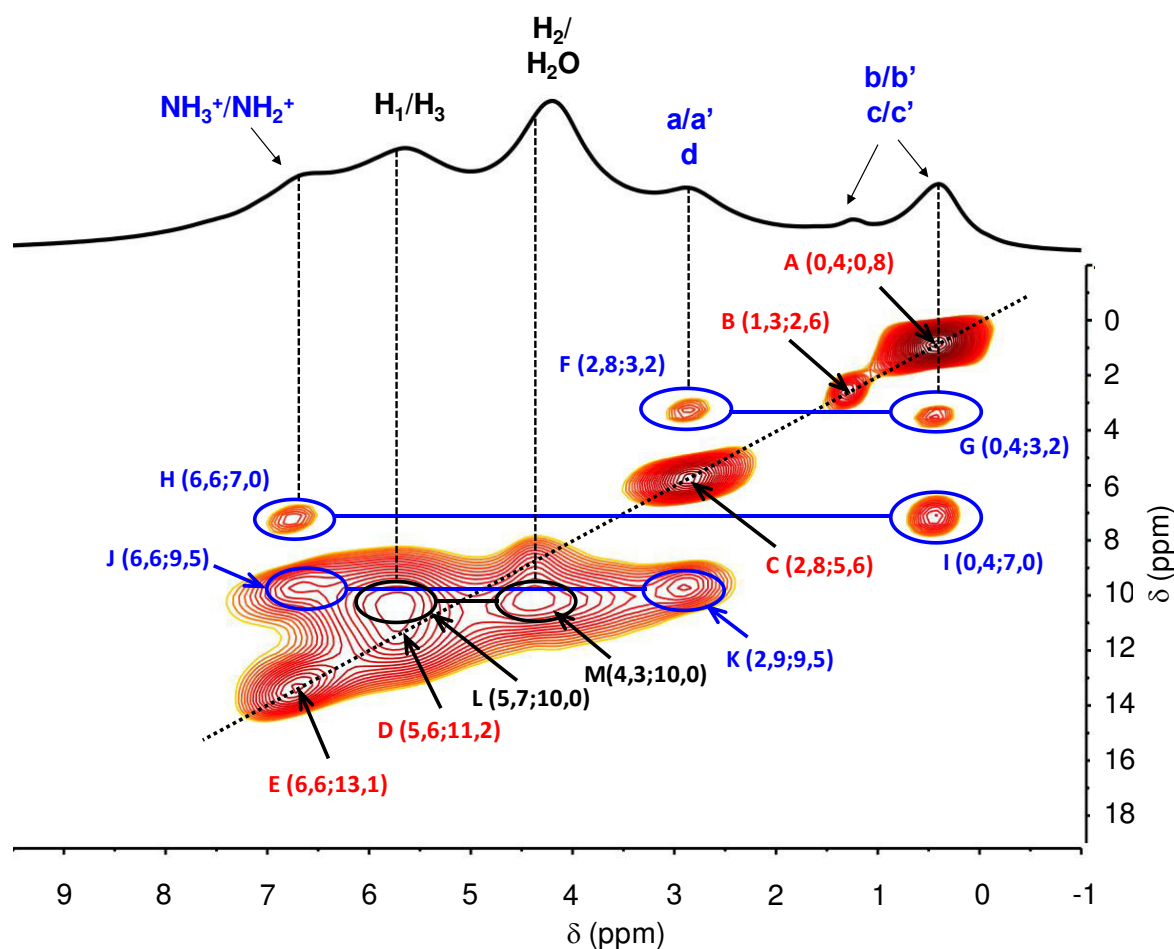


Figure III-37 : Spectre RMN 2D DQ-MAS  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  du système greffon<sup>+</sup>/CB6

Considérant une cohérence DQ entre le proton  $H_I$  du CB6 et les protons du greffon, nous devrions observer des tâches de corrélation à  $(0,4 ; (0,4+5,7) \text{ ppm})$  et  $(2,8 ; (2,8+5,7) \text{ ppm})$  soit à  $(0,4 ; 6,1 \text{ ppm})$  et  $(2,8 ; 8,5 \text{ ppm})$  ou celles-ci ne sont pas visibles sur le spectre enregistré.

Huit tâches sont repérées hors diagonale (identifiées par les lettres F, G, H, I, J, K, L, M) et leur attribution, réalisée sur la base des déplacements chimiques identifiés sur le spectre  $^1\text{H}$  MAS (Tableau III-8), montre que l'ensemble de ces tâches associe des protons d'une seule espèce chimique. Par exemple, la tâche I  $(0,4 ; 7,0 \text{ ppm})$  et par symétrie la tâche H  $(6,6 ; 7,0 \text{ ppm})$  correspondent au



couplage dipolaire entre les protons aliphatiques du greffon complexé  $b/b'/c/c'$  (0,4 ppm selon l'axe horizontal) et les protons des groupements ammoniums du greffon  $\text{NH}_3^+/\text{NH}_2^+$  (6,6 ppm selon l'axe horizontal). De la même manière, la tâche M (4,3 ; 10,0 ppm) (et par symétrie la tâche L (5,7 ; 10,0 ppm)) correspond au couplage dipolaire entre les protons  $H_2$  et  $H_1$  du CB6.

Dans notre cas, aucune corrélation entre les protons du greffon et du CB6 n'a pu être mise en évidence par les expériences RMN 2D  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  DQ MAS, l'intensité des tâches de corrélation étant probablement trop faible par rapport aux autres. Néanmoins, les tâches A et B associées aux protons aliphatiques des molécules de greffon respectivement complexée et libre se distinguent plus nettement sur le spectre 2D du fait de l'étalement selon l'axe vertical, ce qui confirme la présence des deux formes du greffon.

Pour les nanoparticules NS@mSi-valve, le spectre RMN 2D  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  DQ-MAS est encore plus complexe à interpréter (Figure III-38).

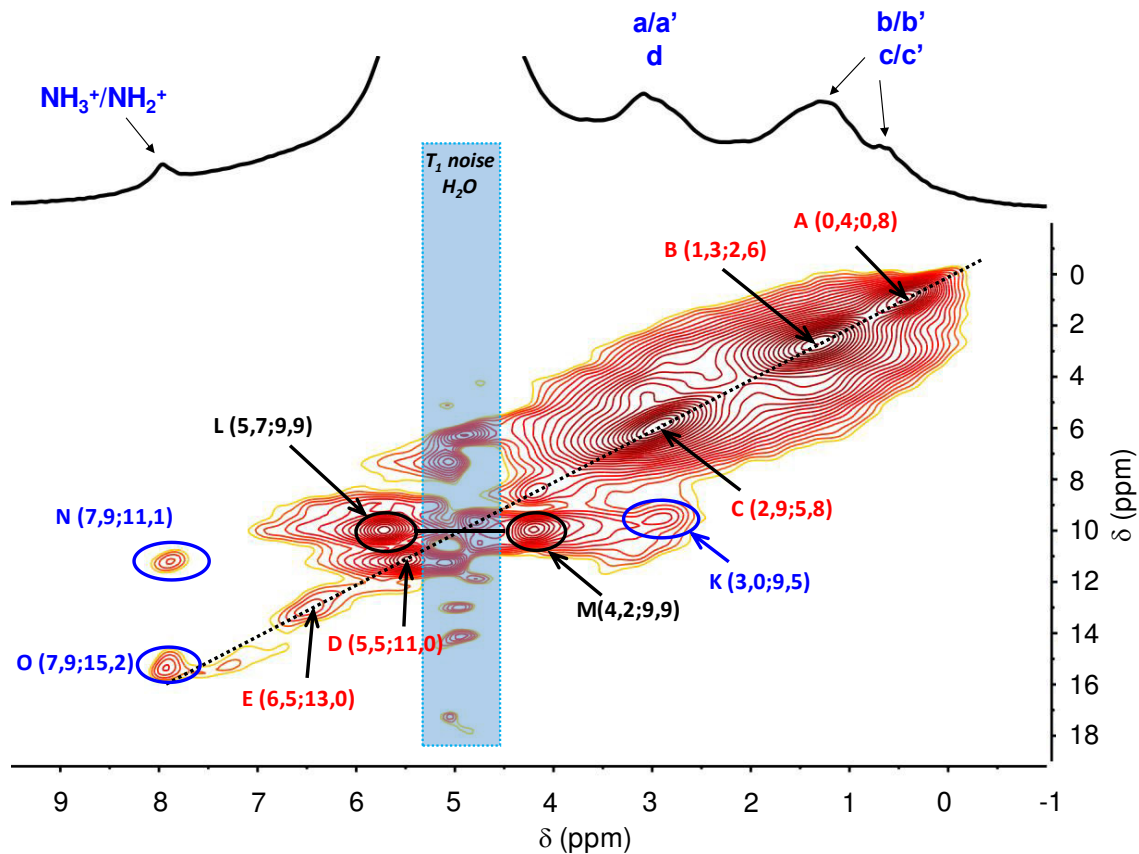


Figure III-38 : Spectre RMN 2D DQ-MAS  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  du système NS@mSi-valve

En effet, le pic de l'eau très intense masque l'intensité des autres signaux et conduit à une perte de sensibilité. Néanmoins, les tâches d'autocorrélation A, B, C, D et E sont identifiées sur la diagonale comme précédemment. Les corrélations L, M se retrouvent également. L'identification de la corrélation K qui traduit le couplage dipolaire entre les protons  $a/a'$  et les protons  $\text{NH}_3^+/\text{NH}_2^+$  du greffon de la forme complexée confirme la présence des deux formes du greffon à la surface des nanoparticules en accord avec l'identification des tâches A et B.

Par comparaison avec le spectre 2D  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  DQ MAS du système greffon<sup>+</sup>/CB6, certaines tâches sont difficilement identifiables du fait de largeur des pics, d'autres sont absentes. Des nouvelles tâches sont également identifiées (N et O) qui sont relatives au couplage dipolaire entre les protons des amines du greffon non complexé et les protons *ala'*.

**Tableau III-8 : Déplacements chimiques et attributions des tâches de corrélation (DQC) identifiées sur les spectres 2D  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  DQ MAS Greffon<sup>+</sup>/CB6 et NS@mSi-valve**

	Greffon <sup>+</sup> /CB6		NS@mSi-valve	
	$\delta$ (ppm)	DQC	$\delta$ (ppm)	DQC
<i>b/b'</i> - greffon <sup>+</sup>	0,4	<i>a/a'</i> ( <b>G</b> ); <i>b/b'</i> ( <b>A</b> ); <i>c/c'</i> ( <b>A</b> ); <i>NH<sub>2</sub><sup>+</sup>/NH<sub>3</sub><sup>+</sup></i> ( <b>I</b> )	0,4	<i>b/b'</i> ( <b>A</b> ); <i>c/c'</i> ( <b>A</b> );
	1,3	<i>b/b'</i> ( <b>B</b> ); <i>c/c'</i> ( <b>B</b> )	1,3	<i>b/b'</i> ( <b>B</b> ); <i>c/c'</i> ( <b>B</b> );
<i>c/c'</i> - greffon <sup>+</sup>	0,4	<i>b/b'</i> ( <b>A</b> ); <i>c/c'</i> ( <b>A</b> );	0,4	<i>b/b'</i> ( <b>A</b> ); <i>c/c'</i> ( <b>A</b> );
	1,3	<i>b/b'</i> ( <b>B</b> ); <i>c/c'</i> ( <b>B</b> )	1,3	<i>b/b'</i> ( <b>B</b> ); <i>c/c'</i> ( <b>B</b> );
<i>d</i> - greffon <sup>+</sup>	2,6	<i>d</i>	2,6	<i>d</i>
<i>a/a'</i> - greffon <sup>+</sup>	2,8	<i>a/a'</i> ( <b>C</b> ); <i>b/b'</i> ( <b>F</b> ); <i>c/c'</i> ( <b>F</b> ); <i>NH<sub>2</sub><sup>+</sup>/NH<sub>3</sub><sup>+</sup></i> ( <b>K</b> )	2,8-2,9-3,0	<i>a/a'</i> ( <b>C</b> ); <i>NH<sub>2</sub><sup>+</sup>/NH<sub>3</sub><sup>+</sup></i> ( <b>K</b> )
<i>H<sub>2</sub></i> -CB6	4,3	<i>H<sub>1</sub></i> ( <b>M</b> )	4,2	<i>H<sub>1</sub></i> ( <b>M</b> )
<i>H<sub>3</sub></i> -CB6	5,6	<i>H<sub>3</sub></i> ( <b>D</b> )	5,5	<i>H<sub>3</sub></i> ( <b>D</b> )
<i>H<sub>1</sub></i> -CB6	5,7	<i>H<sub>2</sub></i> ( <b>L</b> )	5,7	<i>H<sub>2</sub></i> ( <b>L</b> )
<i>NH<sub>2</sub><sup>+</sup>/NH<sub>3</sub><sup>+</sup>- greffon<sup>+</sup></i>	6,6	<i>a/a'</i> ( <b>J</b> ); <i>b/b'</i> ( <b>H</b> ); <i>c/c'</i> ( <b>H</b> ); <i>NH<sub>2</sub><sup>+</sup>/NH<sub>3</sub><sup>+</sup></i> ( <b>E</b> )		
			7,3-7,9	<i>a/a'</i> ( <b>N</b> ); <i>NH<sub>2</sub><sup>+</sup>/NH<sub>3</sub><sup>+</sup></i> ( <b>O</b> )

Cette étude RMN 2D  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  DQ MAS n'a donc pas permis de mettre en évidence des interactions entre le greffon et le macrocycle que ce soit pour le complexe référence ou à la surface des nanoparticules. Néanmoins, elle permet de confirmer la présence des deux formes du greffon dans les deux échantillons en particulier du fait de l'étalement du spectre selon l'axe vertical.

A travers la caractérisation par RMN des solides, nous avons pu étudier la complexation du macrocycle avec le greffon à la surface des nanoparticules. Ainsi, les expériences RMN  $^1\text{H}$  MAS à 60 kHz nous ont permis de mettre en évidence que la majorité des greffons à la surface des nanoparticules n'étaient pas en interaction avec le macrocycle. De plus, les expériences RMN  $^{13}\text{C}$  CP-MAS ont montré que le greffon s'organisait de plusieurs façons à la surface des nanoparticules

du fait d'interactions entre les groupements silanols et les amines du greffon. Des expériences du type 2D <sup>1</sup>H-<sup>29</sup>Si HETCOR, permettant d'obtenir des informations sur la proximité spatiale ( $\leq 5 \text{ \AA}$ ) entre un noyau <sup>1</sup>H et un noyau <sup>29</sup>Si via les couplages dipolaires, pourraient apporter des informations supplémentaires sur les interactions mises en jeu. Finalement ce dernier résultat pourrait expliquer que l'ensemble des greffons n'interagissent pas avec le macrocycle.

Dans le cas où le diaminoalcoxysilane serait greffé sous la forme d'oligomères, il peut également exister un effet stérique qui empêche la complexation avec le macrocycle. Le paramètre clé dans l'élaboration de ces nanosystèmes concerne donc l'étape de greffage.

De plus, le CB6 peut également interagir avec les silanols via des liaisons hydrogènes<sup>[34]</sup> ce qui augmente encore le nombre d'assemblages possibles à la surface des nanoparticules.

Enfin, l'ensemble de ces résultats concerne les nanoparticules à l'état de poudre. Il serait donc intéressant d'étudier par des séquences RMN des solides les nanoparticules en suspension dans un environnement aqueux en solution.

## CONCLUSION

Les objectifs de ce travail étaient dans un premier temps d'élaborer une coquille silicique fonctionnalisée autour des cœurs (bi)métalliques afin de construire un matériau pouvant présenter des potentialités dans le domaine de la délivrance contrôlée de médicament. Dans un second temps, il s'agissait de caractériser les nanoparticules Au@SiO<sub>2</sub> hybrides obtenues par différentes techniques de caractérisation, notamment en combinant XPS et RMN afin de rendre compte des mécanismes d'interaction physico-chimiques se produisant au niveau des interfaces organiques-inorganiques et organiques-organiques.

Dans le cadre de l'élaboration de la coquille silicique, nous avons adapté la méthode développée par Yoon et *al.*<sup>[2]</sup> qui consiste en un premier dépôt de silice dense servant de couche d'accroche pour la croissance d'une coquille mésoporeuse, et ce, afin de contrôler plus précisément l'organisation du réseau poreux. Le polyvinylpyrrolidone a été utilisé en tant qu'agent de couplage pour la croissance de la coquille de silice dense. La formation et la croissance de la coquille de silice mésoporeuse a ensuite été démontrée. Celle-ci présente une orientation radiale des pores qui est contrôlée par le rapport molaire tensioactif/précurseur de silice. Cette organisation radiale est en outre d'autant plus maîtrisée que la taille de la coquille est importante. A ce stade, nous avons pu montrer que les propriétés photothermiques du cœur étaient conservées mais également que ces nanoparticules Au@SiO<sub>2</sub> présentaient une porosité adaptée pour l'encapsulation d'un principe actif (surface spécifique et volume poreux importants).

L'étape suivante a concerné la fonctionnalisation des nanoparticules dont la procédure, inspirée des travaux de Zink<sup>[11,12]</sup>, a été réalisée en deux phases. Le diaminoalcoxysilane a d'abord été greffé de façon covalente à la surface des nanoparticules puis la formation des nanovalves après ajout du macrocycle a conduit à l'élaboration des matériaux fonctionnels NS@mSi-valve. A chaque étape de la procédure de fonctionnalisation, les nanomatériaux ont été caractérisés par XPS et par RMN. Les analyses XPS ont permis de valider et confirmer le greffage à la surface des nanoparticules ainsi que la présence du macrocycle. La RMN a précisé davantage les interactions mises en jeu au niveau des interfaces. Une étude préliminaire en RMN des liquides nous a permis de déterminer les caractéristiques spectrales attestant de la formation des nanovalves (complexe) en solution. La caractérisation des nanoparticules fonctionnalisées par RMN des solides a finalement montré :

- que les greffons à la surface des nanoparticules n'étaient, en grande majorité, pas complexés
- qu'il existait différentes configurations moléculaires du greffon à la surface (interaction possible avec la surface) qui peuvent en partie expliquer ce faible taux de complexation.

A travers cette étude, nous avons pu apprécier les potentialités mais également les limites associées à chacune des techniques utilisées. Alors que l'interprétation des données XPS permet d'évaluer les différents environnements chimiques de la surface des nanoparticules, la RMN semble, dans les

conditions de ce travail, être plus adaptée pour extraire l'information des interactions faibles mises en jeu dans l'assemblage des nanovalves.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] C. Graf, D. L. J. Vossen, A. Imhof, A. van Blaaderen, *Langmuir* **2003**, *19*, 6693.
- [2] S. B. Yoon, J.-Y. Kim, J. H. Kim, Y. J. Park, K. R. Yoon, S.-K. Park, J.-S. Yu, *J. Mater. Chem.* **2007**, *17*, 1758.
- [3] K. S. W. Sing, *Pure Appl. Chem.* **1985**, *57*, 603.
- [4] S. Brunauer, P. H. Emmett, E. Teller, *J. Am. Chem. Soc.* **1938**, *60*, 309.
- [5] E. P. Barrett, L. G. Joyner, P. P. Halenda, *J. Am. Chem. Soc.* **1951**, *73*, 373.
- [6] P. I. Ravikovitch, A. V. Neimark, *J. Phys. Chem. B* **2001**, *105*, 6817.
- [7] M. Grün, K. K. Unger, A. Matsumoto, K. Tsutsumi, *Microporous Mesoporous Mater.* **1999**, *27*, 207.
- [8] M. Wang, T. Chen, C. Ding, J. Fu, *Chem. Commun.* **2014**, *50*, 5068.
- [9] Y. Sun, Y. Xia, *Anal. Chem.* **2002**, *74*, 5297.
- [10] S. Giri, B. G. Trewyn, V. S. Y. Lin, *Nanomед.* **2007**, *2*, 99.
- [11] J. Croissant, J. I. Zink, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 7628.
- [12] C. R. Thomas, D. P. Ferris, J.-H. Lee, E. Choi, M. H. Cho, E. S. Kim, J. F. Stoddart, J.-S. Shin, J. Cheon, J. I. Zink, *J Am Chem Soc* **2010**, *132*, 10623.
- [13] W. L. Mock, N. Y. Shih, *J. Org. Chem.* **1986**, *51*, 4440.
- [14] S. Angelos, Y.-W. Yang, K. Patel, J. F. Stoddart, J. I. Zink, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 2222.
- [15] J. W. Lee, S. Samal, N. Selvapalam, H.-J. Kim, K. Kim, *Acc. Chem. Res.* **2003**, *36*, 621.
- [16] L.-H. Lee, *J. Colloid Interface Sci.* **1968**, *27*, 751.
- [17] M. Zhu, M. Z. Lerum, W. Chen, *Langmuir* **2012**, *28*, 416.
- [18] E. Asenath Smith, W. Chen, *Langmuir* **2008**, *24*, 12405.
- [19] T. Yokoi, H. Yoshitake, T. Tatsumi, *J. Mater. Chem.* **2004**, *14*, 951.
- [20] H. Ehrlich, K. D. Demadis, O. S. Pokrovsky, P. G. Koutsoukos, *Chem. Rev.* **2010**, *110*, 4656.
- [21] P. Mulvaney, M. Giersig, T. Ung, L. M. Liz-Marzán, *Adv. Mater.* **1997**, *9*, 570.
- [22] M. L. Miller, R. W. Linton, *Anal. Chem.* **1985**, *57*, 2314.
- [23] J. H. Scofield, *J. Electron Spectrosc. Relat. Phenom.* **1976**, *8*, 129.

- [24] L. Leclercq, N. Noujeim, S. H. Sanon, A. R. Schmitzer, *J. Phys. Chem. B* **2008**, *112*, 14176.
- [25] N. Noujeim, L. Leclercq, A. R. Schmitzer, *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 3784.
- [26] S. Samsam, L. Leclercq, A. R. Schmitzer, *J. Phys. Chem. B* **2009**, *113*, 9493.
- [27] E. Masson, X. Lu, X. Ling, D. L. Patchell, *Org. Lett.* **2009**, *11*, 3798.
- [28] J. Lagona, P. Mukhopadhyay, S. Chakrabarti, L. Isaacs, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 4844.
- [29] C.-J. Lin, S.-H. Huang, N.-C. Lai, C.-M. Yang, *ACS Catal.* **2015**, *5*, 4121.
- [30] H. Zhao, Q. Chen, S. Zhang, *Microporous Mesoporous Mater.* **2012**, *155*, 240.
- [31] J. Trébosc, J. W. Wiench, S. Huh, V. S.-Y. Lin, M. Pruski, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 3057.
- [32] C. Chiang, N.-I. Liu, J. L. Koenig, *J. Colloid Interface Sci.* **1982**, *86*, 26.
- [33] G. S. Caravajal, D. E. Leyden, G. R. Quinting, G. E. Maciel, *Anal. Chem.* **1988**, *60*, 1776.
- [34] L. Ma, S. Liu, Q. Wang, L. Yao, L. Xu, *J. Sep. Sci.* **2015**, *38*, 1082.

## ANNEXES

### Annexe III.1 : Synthèse de la forme condensée et protonée du greffon

#### 1. Forme condensée

0,5 ml de greffon est additionné à une solution constituée de 5,9 ml d'éthanol, 0,6 ml d'eau et 0,470 ml d'ammoniaque (30%). Après une nuit sous agitation, la solution est lavée trois fois avec 30 ml d'éthanol. Le surnageant est finalement éliminé et le gel récupéré est placé à l'étuve.

#### 2. Forme protonée

234 mg de greffon ainsi que 20 ml de pentane sont introduits dans un schlenk. A l'aide d'une seringue, 5 ml d'une solution HCl.Et<sub>2</sub>O (1M) sont additionnés goutte à goutte sous agitation. A la fin de l'addition, un précipité blanc est observable. Après 2 h sous agitation, le surnageant est filtré et le solide est récupéré et lavé trois fois avec 10 ml de pentane. Le produit final (poudre) est séché sous vide pendant 5 h puis stocké en boîte à gants.

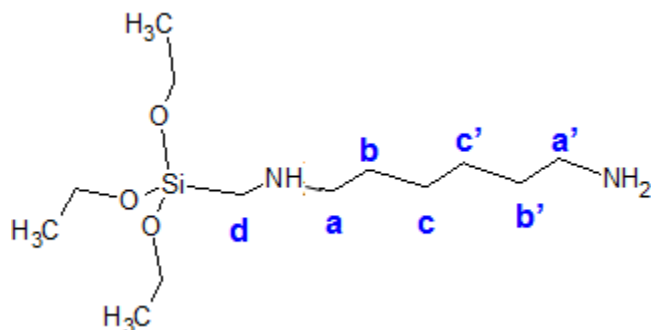
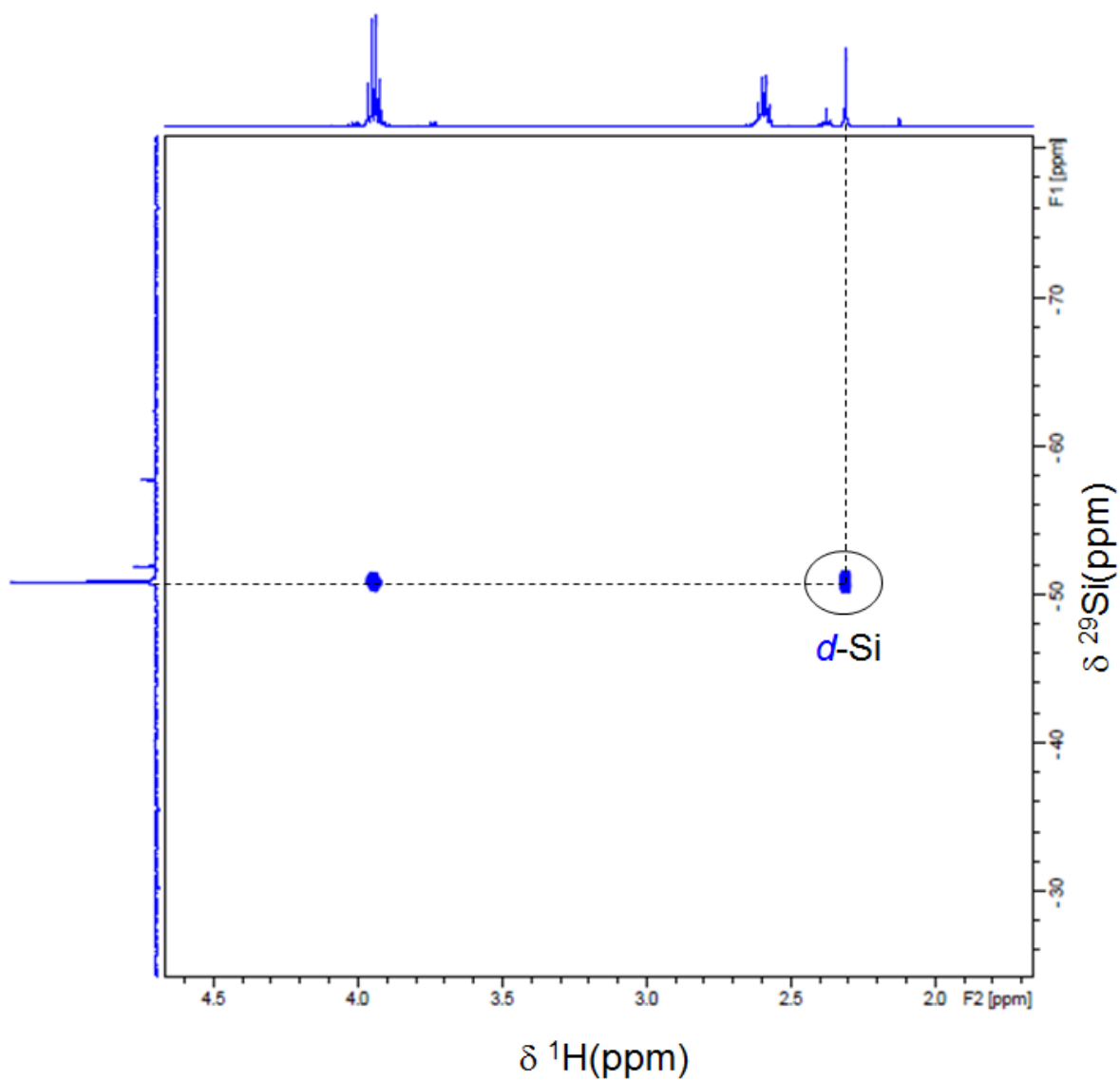


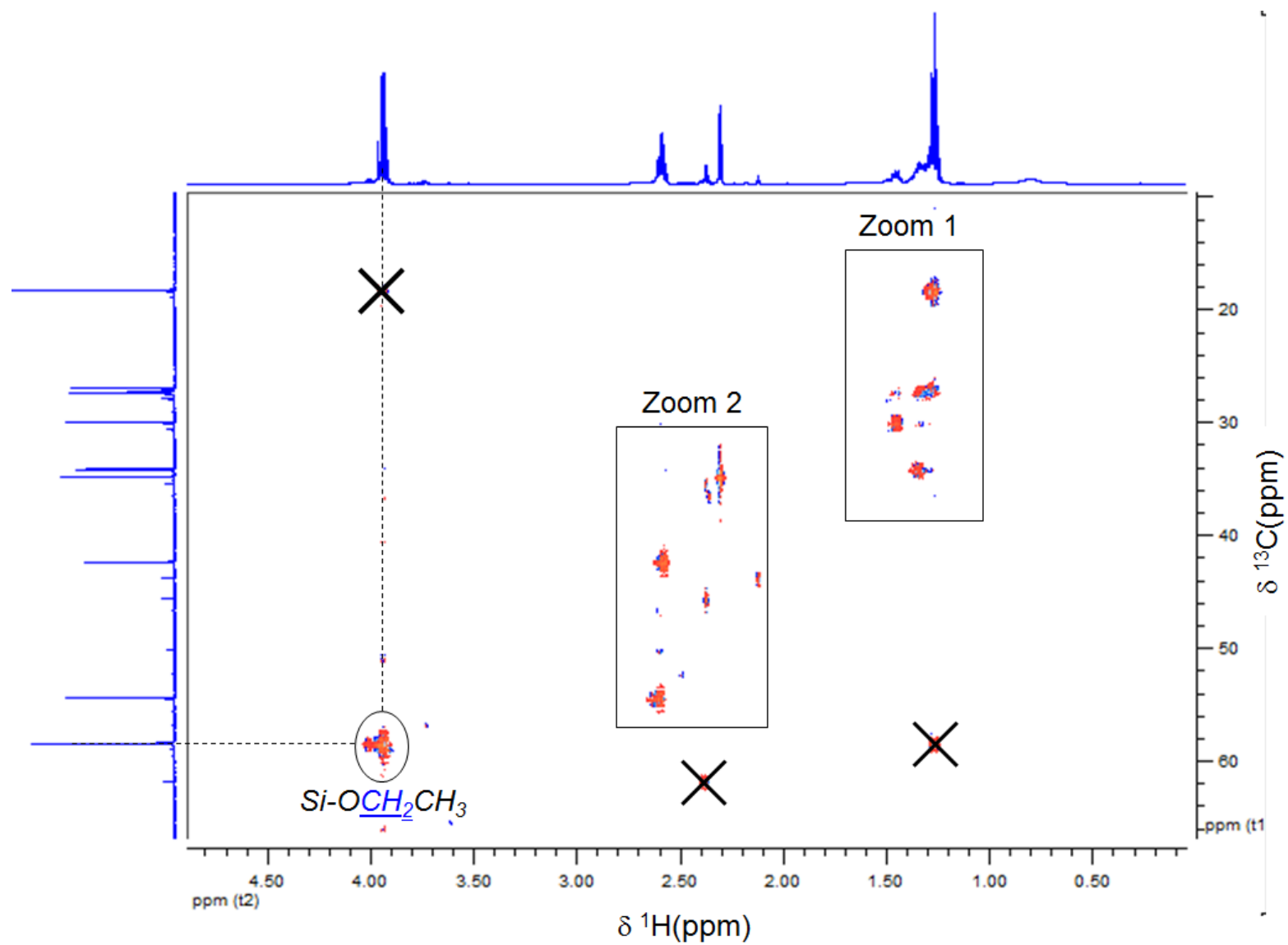
Annexe III.2 : Résultats des analyses quantitatives XPS

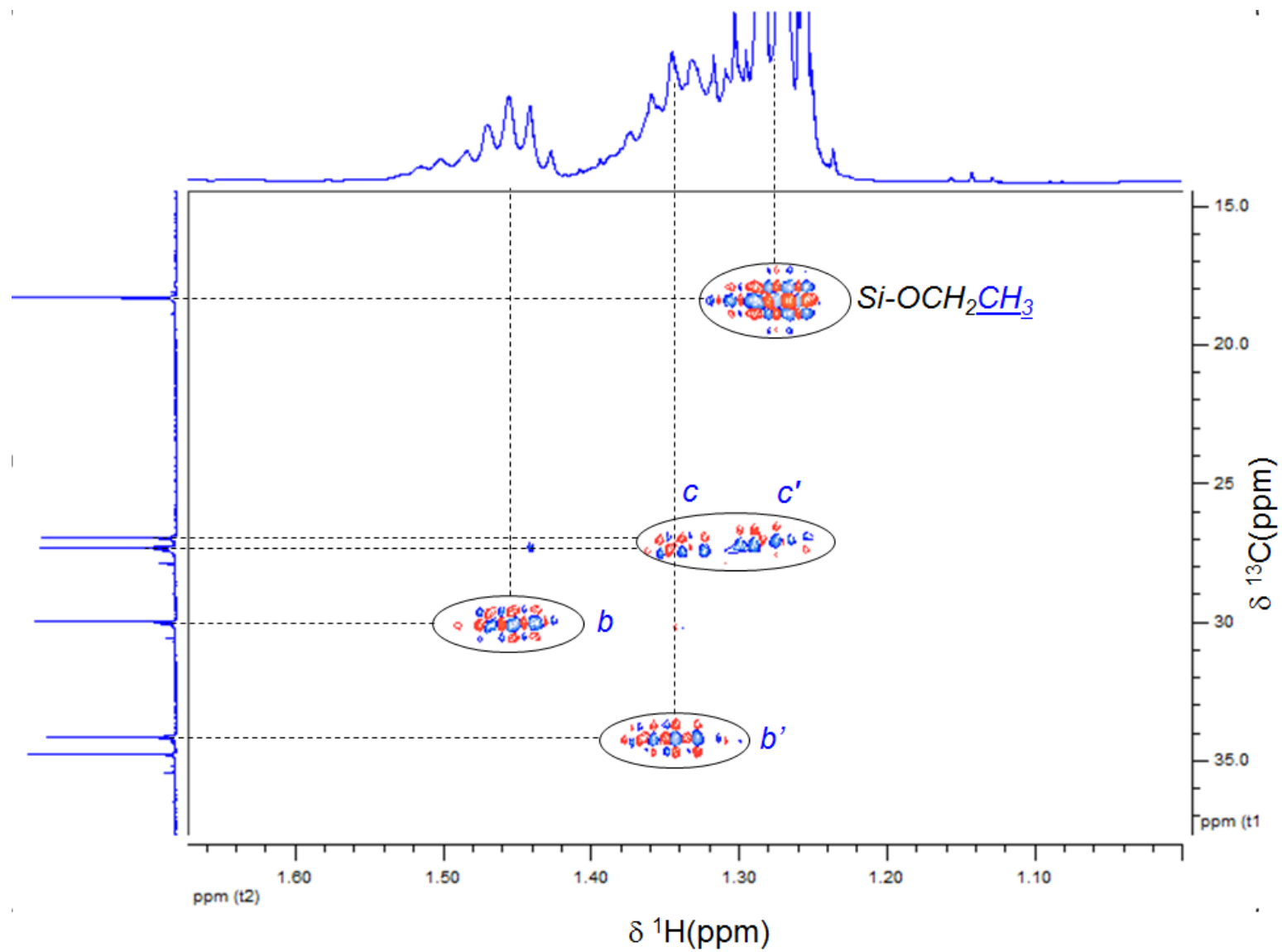
	SiO <sub>2</sub> mésoporeuse		Couche d'oxyde (6 nm) sur wafer de silicium		Greffon auto-condensé	
<b>Pics de cœur</b>	<b>EL (eV) (fwhm) (eV)</b>	<b>% At</b>	<b>EL (eV) (fwhm) (eV)</b>	<b>% At</b>	<b>EL (eV) (fwhm) (eV)</b>	<b>% At</b>
C1s	285,0 (1,7)	5,5	285,0 (1,6)	5,3	285,0 (1,4)	32,4
	286,6 (1,9)	1,8	286,9 (1,5)	0,7	286,4 (1,5)	7,9
	288,2 (2,0)	0,6			288,1 (1,5)	1,3
<b>% at. total</b>		<b>7,9</b>		<b>6,0</b>		<b>41,6</b>
O1s	533,3 (1,9)	53,8	533,0 (1,5)	55,9	532,9 (1,7)	31,9
	534,8 (2,0)	4,4			530,8 (1,7)	2,2
<b>% at. total</b>		<b>58,2</b>		<b>55,9</b>		<b>34,1</b>
Si2p <sub>3/2</sub>	104,0 (1,8)	22,6	103,6 (1,6)	25,4	103,1 (1,6)	13,9
Si2p <sub>1/2</sub>	104,6 (1,8)	11,3	104,3 (1,6)	12,7	103,8 (1,6)	7,0
<b>% at. total</b>		<b>33,9</b>		<b>38,1</b>		<b>20,9</b>
N1s					399,8 (1,9)	1,8
					401,8 (1,9)	1,6
<b>% at. total</b>						<b>3,4</b>

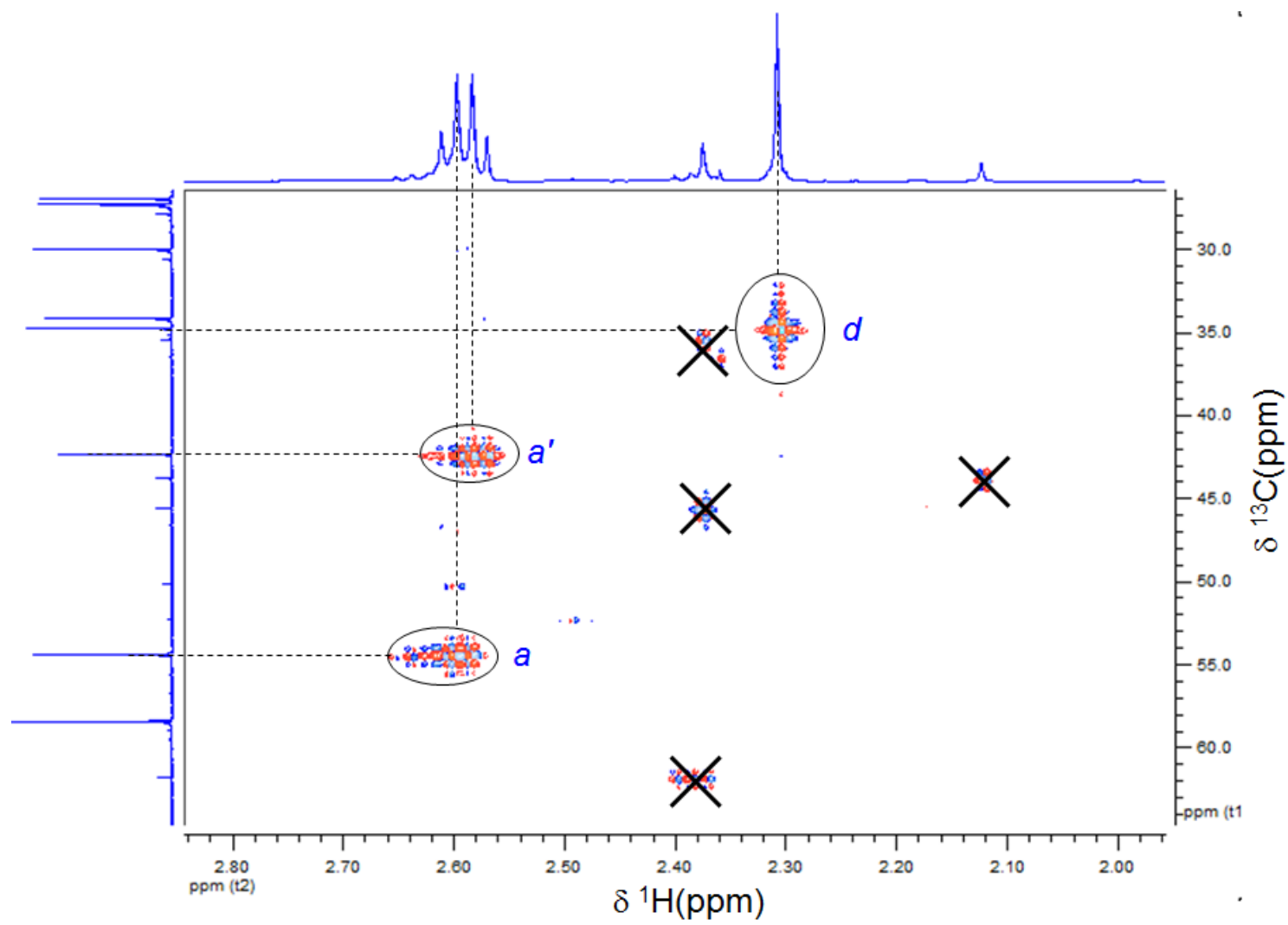
Annexe III.3 : Etude par RMN des liquides du greffon

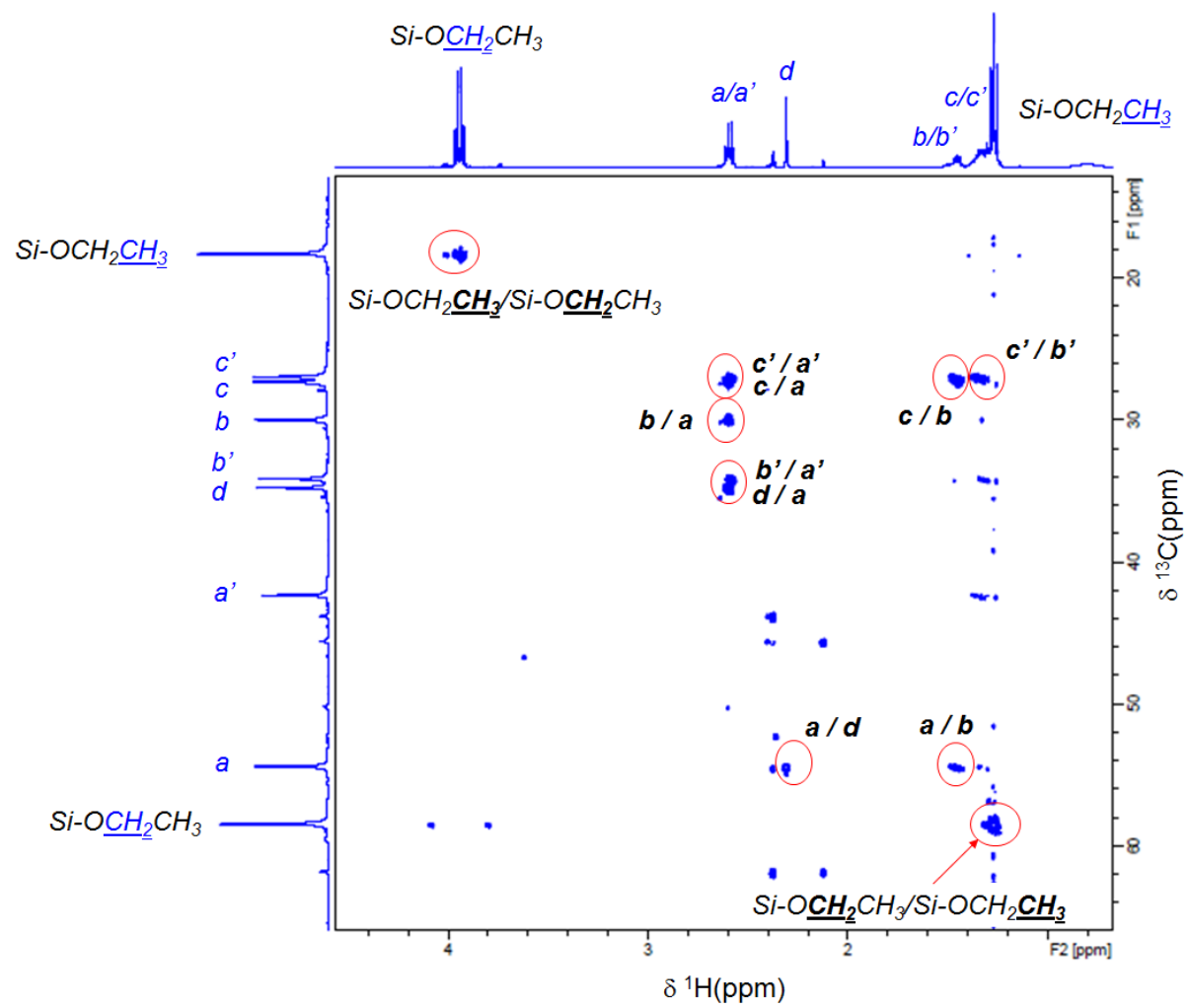
Identification des protons et atomes de carbone sur la structure chimique du greffon

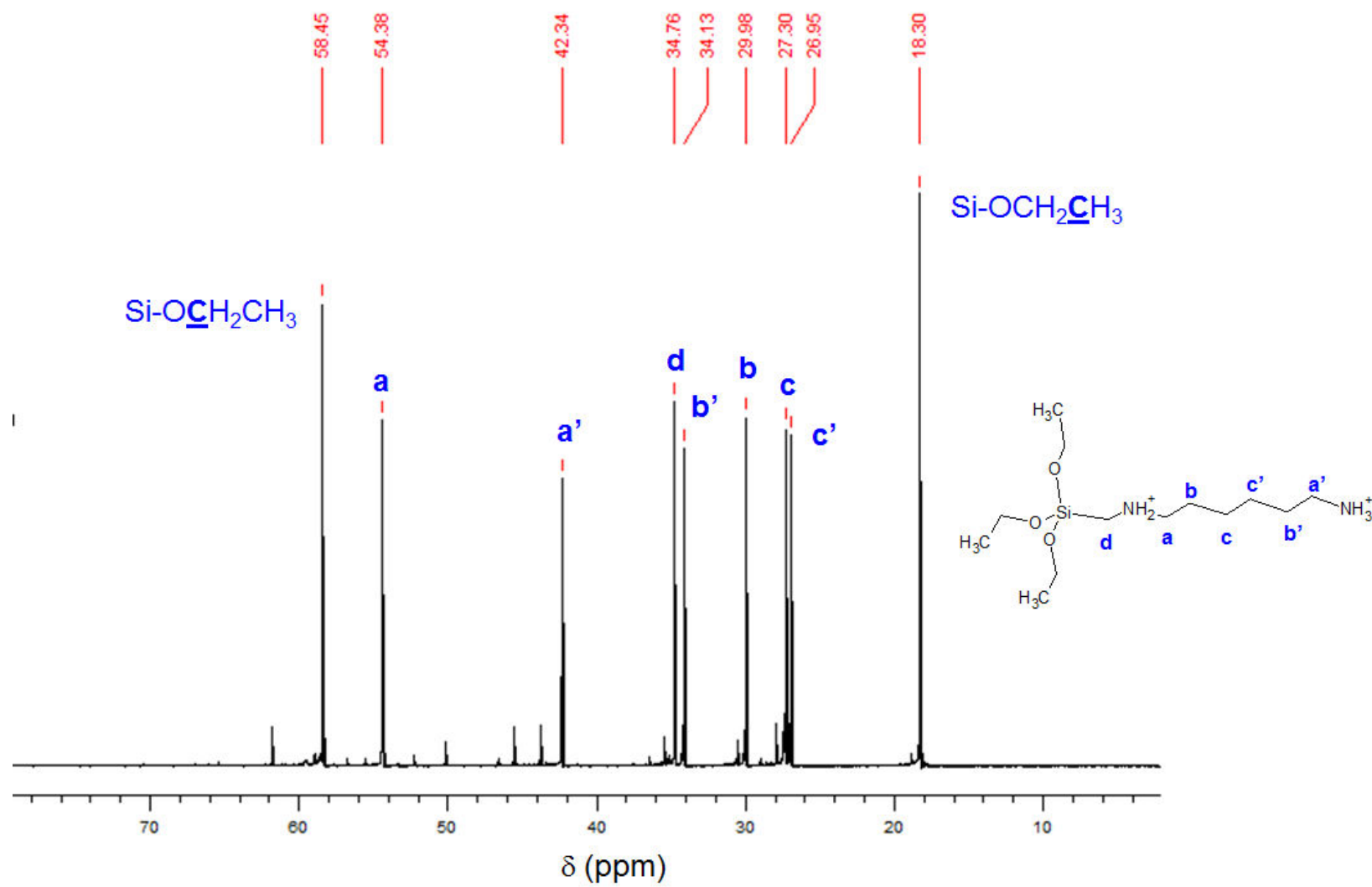
Spectre RMN HMQC <sup>1</sup>H-<sup>29</sup>Si du greffon dans CDCl<sub>3</sub>

Spectre RMN HSQC  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  du greffon dans  $\text{CDCl}_3$ 

Zoom 1 du spectre RMN HSQC  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  du greffon dans  $\text{CDCl}_3$ 

Zoom 2 du spectre RMN HSQC  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  du greffon dans  $\text{CDCl}_3$ 

Spectre RMN HMBC  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  du greffon dans  $\text{CDCl}_3$ 

Spectre RMN  $^{13}\text{C}$  du greffon dans  $\text{CDCl}_3$ 





CHAPITRE IV.  
ELABORATION DE  
NANOSYSTEMES Au@SiO<sub>2</sub> PAR  
UNE APPROCHE BIO-INSPIREE



## INTRODUCTION

Ce chapitre s'attache au développement de nanocomposites formés d'un cœur d'or et d'une coquille hybride qui est cette fois-ci constituée d'un assemblage polymère/silice. Ce travail se place dans le contexte d'une réflexion menée autour d'une voie de synthèse dite « bio-inspirée » utilisant des polycations présentant une activité biologique et un caractère biocompatible capables d'interagir avec une phase minérale pour établir un réseau bio-inorganique. En effet, comme évoqué dans le chapitre bibliographique, certaines macromolécules biologiques sont capables d'activer la condensation silicique et impliquent alors la structuration de systèmes hybrides polymère/silice.

Pour cette étude spécifique, deux types de polymère ont été testés, la gélatine et la poly-L-lysine, qui ont des structures et conformations moléculaires différentes ; il nous a semblé intéressant d'examiner l'impact de ces macromolécules sur la morphologie et la structuration du réseau bio-inorganique formé à la surface des nanoshells d'or.

L'élaboration des nanocomposites est basée sur un procédé en deux étapes. Le polymère est d'abord adsorbé en surface des nanoshells, puis la condensation silicique à partir de silicates de sodium est réalisée dans un second temps afin de créer la coquille hybride. Le choix des silicates comme précurseur silicique plutôt qu'un alcoxyde de silicium a été motivé par l'absence de production d'alcool pendant la condensation silicique. Ceci est en effet plus conforme à une démarche d'optimisation du caractère biocompatible des matériaux en accord avec une approche d'élaboration bio-inspirée.

Dans le cadre de l'élaboration de ces matériaux, il s'agissait d'évaluer l'influence du polymère et de différents paramètres de synthèse sur la morphologie, la structuration et l'état physico-chimique des couches hybrides. La caractérisation des matériaux a été réalisée par le biais de techniques de microscopie électronique, de diffusion dynamique de la lumière (DLS) et de spectroscopie photoélectronique à rayonnement X (XPS).

La dernière partie de l'étude concerne l'évaluation *in vitro* de l'effet et l'interaction de ces nanoparticules vis-à-vis de cellules en termes de cytotoxicité et d'internalisation cellulaire. Ces investigations ont été réalisées en collaboration avec des biologistes de notre institut (Anne-Laure Bulteau, Chargée de Recherche CNRS et Marlène Dezest, Doctorante, toutes deux de l'équipe IPREM-LCABIE). Pour nous aiguiller dans cette nouvelle réflexion, nous avons également sollicité d'autres chercheurs de la même équipe (Stéphane Faucher, Post-doctorant et Gaëtane Lespes, Professeur des Universités) pour la détermination par ICP-MS de la concentration en or dans les échantillons préparés. Enfin, nous avons également travaillé avec l'équipe de recherche de Thibaud Coradin (Directeur de recherche CNRS, LCMCP, Paris) en particulier avec Carole Aime (Chargée de recherche CNRS) et Bernard Haye (Technicien) qui ont réalisées les coupes ultra-fines des cellules ainsi que les images de microscopie électronique en transmission (MET).

## I. Elaboration de la coquille hybride polymère/silice

L'élaboration des nanoshells (cœur) est identique au protocole décrit dans le chapitre II.

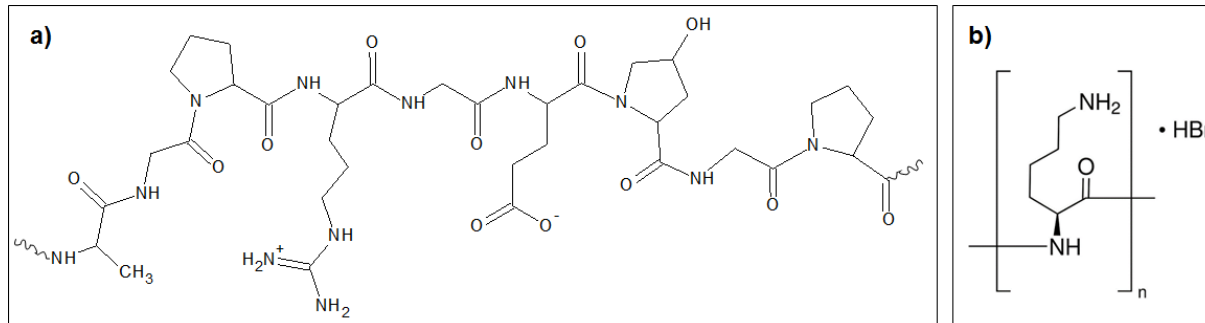
La synthèse de la coquille hybride se fait en deux étapes :

- L'adsorption des polymères à la surface des nanoshells (NS) conduisant à la formation de nanoparticules NS@polymère.
- La condensation de la silice sur les nanoparticules NS@polymère pour former les nanoparticules bio-hybrides NS@polymère/silice

L'objectif initial est ici de valider les différentes étapes d'élaboration de la coquille hybride sur les nanoshells d'or et notamment de corrélérer la morphologie et la structuration des matériaux obtenus à la nature du polymère employé.

### 1. Adsorption du polymère (NS@polymère)

La gélatine utilisée dans ce travail est de type A ( $7 < pI < 9$ ). Elle est principalement constituée des acides aminés glycine, proline et 4-hydroxyproline (Figure IV-1.a). La masse molaire des chaînes est comprise entre 50000 g/mol et 100000 g/mol. La poly-L-lysine, qui est un poly(acide aminé) composé d'unités lysine (Figure IV-1.b), correspond dans ce travail à des masses molaires de 30000-70000 g/mol et est chargée positivement à pH neutre.



**Figure IV-1 : Structure chimique de a) la gélatine et b) la poly-L-lysine**

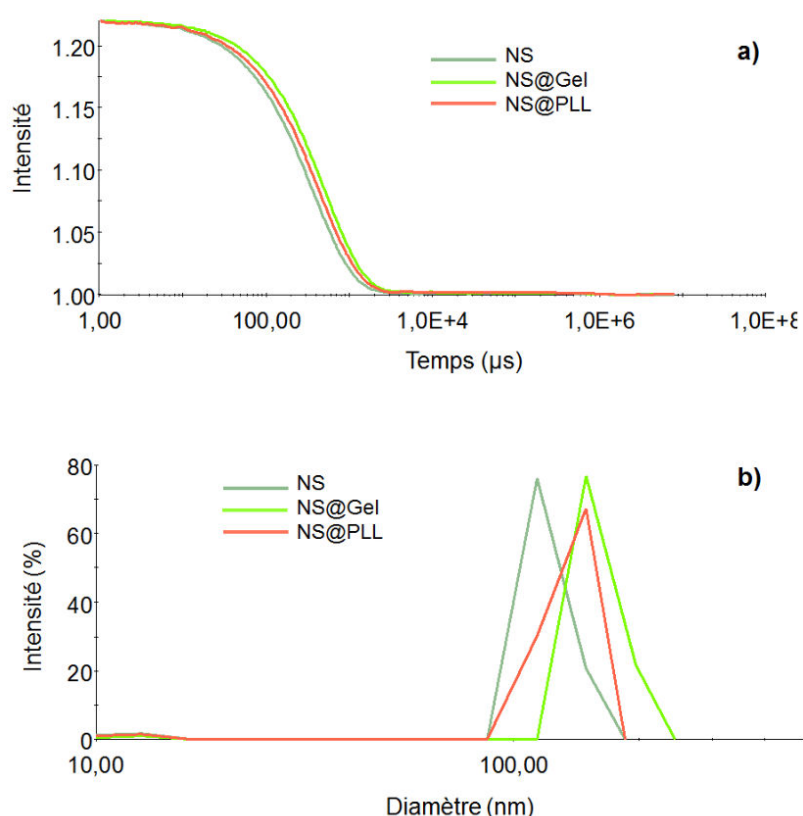
#### Mode opératoire :

**1) Adsorption de la gélatine :** Pour la synthèse des nanoparticules NS@Gel (0,1 %), 30 mg de gélatine (type A, from porcine skin, Bloom Number 300,  $M_w$  50000-100000 g/mol) est additionnée à 30 ml d'une suspension de nanoshells préalablement lavée. La solution est portée à 45°C sous agitation pendant 30 min. Les nanoparticules sont ensuite lavées (à l'eau) par des cycles de centrifugation/redispersion. Pour les nanoparticules NS@Gel (0,2 %) et NS@Gel (1 %), les quantités de gélatine utilisées sont respectivement 60 mg et 300 mg.

**2) Adsorption de la poly-L-lysine** : 30 mg de poly-L-lysine (30000-70000 g/mol) sont ajoutés à 30 ml d'une suspension de nanoshells préalablement lavée. La solution est conservée sous agitation pendant 2h puis les nanoparticules sont lavées (à l'eau) par centrifugation.

L'adsorption des polymères à la surface des nanoparticules est difficile à mettre en évidence par le biais des techniques de microscopie électronique. D'autres outils tels que la diffusion dynamique de la lumière (Dynamic Light Scattering, DLS) sont adaptés pour son observation indirecte. En effet, le rayon hydrodynamique des nanoparticules en solution varie de manière plus significative avec l'adsorption des polymères à la surface. Pour une concentration de 0,1%, les résultats obtenus sont présentés dans la Figure IV-2.

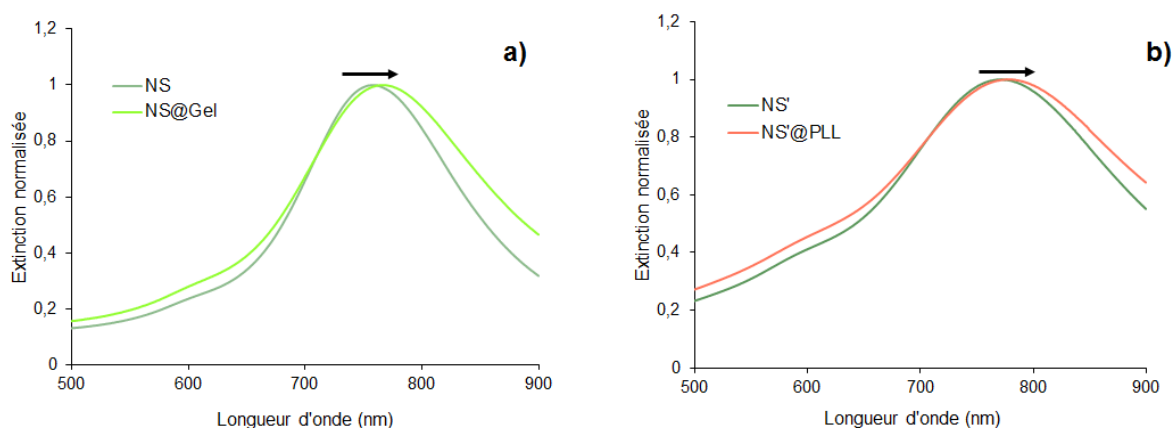
Les courbes d'auto-corrélation, plus précisément leurs décroissances, sont directement reliées au diamètre des nanoparticules. La superposition des trois fonctions pour les nanoparticules NS, NS@Gel et NS@PLL montrent donc une évolution relative de la taille (Figure IV-2.a).



**Figure IV-2 : a) Courbes d'auto-corrélation et b) Distribution en taille des nanoparticules NS, NS@Gel et NS@PLL**

Cette décroissance est en théorie d'autant plus rapide que la taille des particules est petite. Les courbes permettent de remonter à la distribution en taille (Figure IV-2.b) et le diamètre semble augmenter très légèrement pour les nanoparticules NS@PLL. L'évolution plus importante du diamètre des nanoparticules modifiées avec la gélatine mettent en évidence le gonflement de l'hydrogel à 25°C.

La spectroscopie UV-visible permet également de visualiser la modification de l'environnement à la surface des nanoparticules. En effet, avec l'adsorption des polymères, la fréquence de résonance plasmon des nanoshells se déplace vers le proche IR ce qui confirme l'interaction des polymères avec la surface d'or (Figure IV-3).



**Figure IV-3 : Spectres d'extinction UV-vis des nanoparticules ; Comparaison a) NS et NS@Gel et b) NS' et NS'@PLL**

## 2. Minéralisation de la coquille (NS@polymère/SiO<sub>2</sub>)

La silicification de la coquille est ensuite rendue possible par l'activation de la condensation des silicates à la surface des nanoparticules NS@polymère.

### Mode opératoire :

Une solution de silicate de sodium à 60 mM est acidifiée jusqu'à pH 7. En fonction de la synthèse réalisée, un volume (cf Tableau IV-1) de cette solution est immédiatement ajouté à une suspension de NS@polymère lavée (2 ml de NS@polymère + 8 ml H<sub>2</sub>O). La solution est conservée sous agitation pendant plusieurs heures puis lavée par centrifugation.

**Tableau IV-1 : Différents volumes de silicates mis en jeu dans les synthèses de silicification, nombre de moles et concentration associées**

Volume ajouté de silicates (ml)	n(silicates) (mol)	C(silicates) (mol/l)
1	$6,0 \cdot 10^{-5}$	$5,5 \cdot 10^{-3}$
2	$1,2 \cdot 10^{-4}$	$1,0 \cdot 10^{-2}$
4	$2,4 \cdot 10^{-4}$	$1,7 \cdot 10^{-2}$

La solution commerciale de silicate de sodium est une solution concentrée, très basique, composée d'anions polysilicates du type (Si<sub>x</sub>O<sub>y</sub>(OH)<sub>z</sub>)<sup>n-</sup>.

Lorsque cette solution est diluée et acidifiée, deux processus opposés se mettent en place :

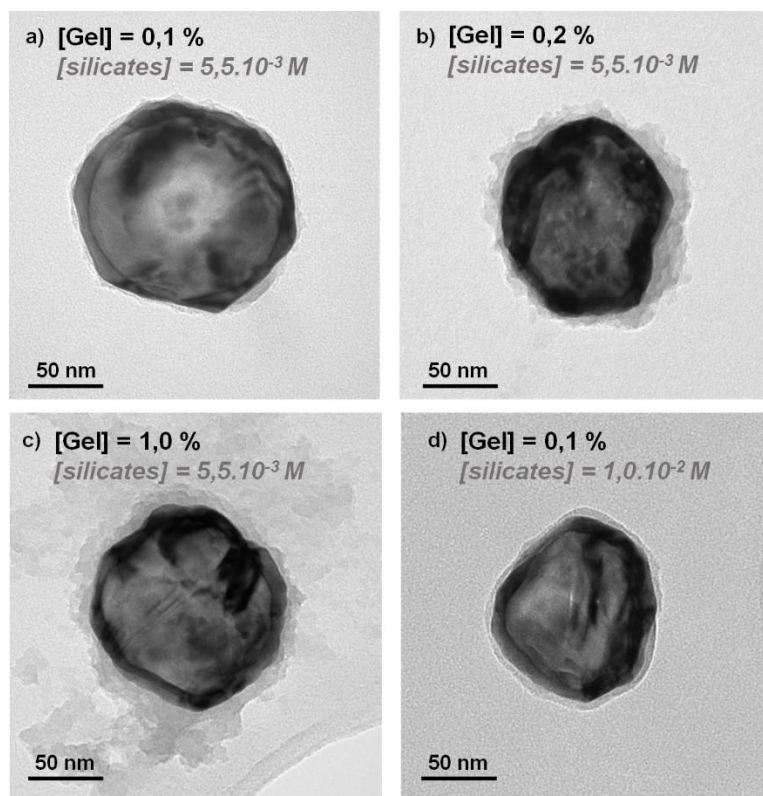
- d'un côté, la dilution de cette solution entraîne la décondensation des oligomères conduisant à des espèces plus petites jusqu'à  $[\text{Si}(\text{OH})_{4-x}]^{x-}$ .
- d'un autre côté, la diminution du pH induit la protonation des espèces ce qui favorise les réactions de condensation entre les silanols Si-OH et/ou les groupement silanoates (Si-O<sup>-</sup>) pour former des oligomères (Si-O-Si) et au final conduire à la précipitation de SiO<sub>2</sub>.

La présence de sels ou de composés organiques a une influence sur le procédé et peut soit favoriser les espèces isolées soit la condensation.

Cette deuxième étape a nécessité une phase d'optimisation. En particulier, un équilibre a dû être trouvé entre :

- une concentration en nanoparticules permettant d'éviter la formation d'agrégats mais qui soit suffisamment importante pour favoriser la condensation des silicates et,
- une concentration en silicates qui soit relativement faible pour éviter la formation de particule de silice en solution

Lorsque la solution de silicates de sodium acidifiée est mise en contact avec les nanoparticules NS@Gel ou NS@PLL, la condensation des silicates et la formation de couche de silice à la surface des nanoparticules ont pu être identifiées par microscopie électronique.

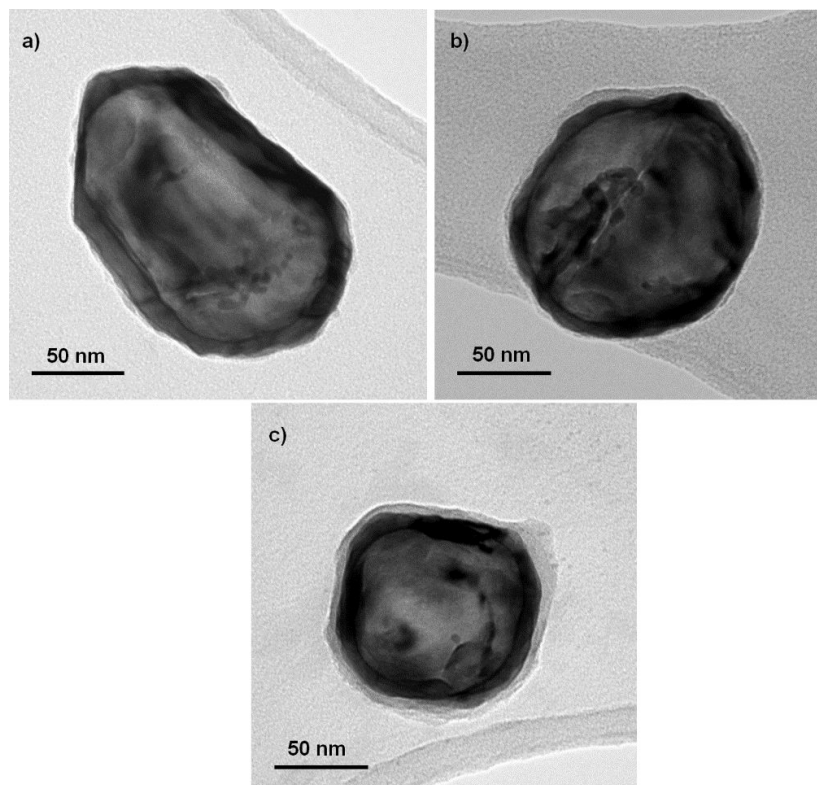


**Figure IV-4 :** Images MET de nanoparticules NS@Gel-SiO<sub>2</sub> synthétisées dans des conditions différentes ([Gel] (%)/ [silicates] (M)) : a) 0,1%/5,5.10<sup>-3</sup>M, b) 0,2%/5,5.10<sup>-3</sup>M, c) 1,0%/5,5.10<sup>-3</sup>M et d) 0,1%/1,0.10<sup>-2</sup>M

Dans le cas des systèmes à base de gélatine, l'influence de la concentration en gélatine lors de la première étape de synthèse et de la quantité de silicates ajoutée a été suivie. Les images de microscopie électronique en transmission (MET) mettent clairement en évidence la formation d'une coquille hétérogène en surface des particules (Figure IV-4). La concentration en gélatine semble avoir une incidence directe sur la structure et la morphologie de la coquille.

En effet, l'épaisseur de la coquille est proportionnelle à la concentration en gélatine. A faible concentration (0,1%) (Figure IV-4.a), la couche formée est relativement fine (<5 nm). A l'inverse, pour une concentration de 1% (Figure IV-4.c), le réseau bio-inorganique n'est plus confiné à l'extrême surface des nanoshells mais s'étend sur des distances supérieures à 50 nm. Ceci est vraisemblablement dû à une extension et/ou redissolution des chaînes polymères en excès en solution favorisant la nucléation silicique relativement loin de la surface des nanoshells. En outre, à concentration en gélatine identique, l'augmentation de la concentration en silicates conduit à une hausse modérée de l'épaisseur de la coquille (de 2-5 nm à 6-8 nm) comme le montre la comparaison des clichés sur les Figure IV-4.a et d. Ces premiers résultats soulignent bien le rôle de catalyseur de la gélatine dans le mécanisme de condensation des silicates.

Dans le cas des systèmes à base de de poly-L-lysine, l'augmentation de la concentration en silicates de  $5,5 \cdot 10^{-3}$  M (Figure IV-5.a) à  $1,7 \cdot 10^{-2}$  M fait croître l'épaisseur de la coquille de manière modérée mais significative jusqu'à 6 nm.



**Figure IV-5 : Images MET de nanoparticules NS@PLL(0,1%)-SiO<sub>2</sub> dont la synthèse met en jeu un concentration en silicates différentes a) [silicates] =  $5,5 \cdot 10^{-3}$  M, b)  $1,0 \cdot 10^{-2}$  M, b)  $1,7 \cdot 10^{-2}$  M**



Nous avons observé de façon générale que la coquille présentait dans ce cas précis une structure plus homogène et dense. Ceci peut être à priori mis en corrélation avec les structures moléculaires des polymères utilisés qui vont jouer un rôle primordial dans les processus de biominéralisation et dans la morphogénèse de la coquille hybride comme nous le verrons dans la partie III.

## II. Caractérisation XPS des nanoparticules synthétisées

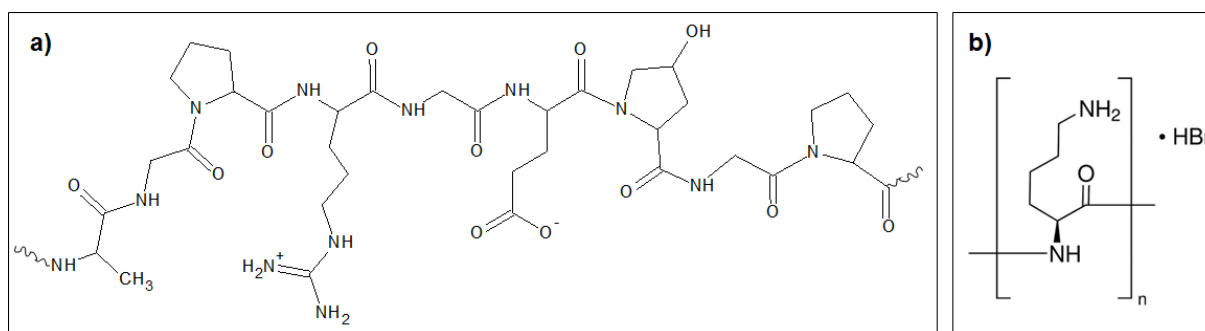
Cette partie est consacrée à la caractérisation XPS des nanoparticules à chaque étape de l'élaboration. Comme pour les nanoshells dans le chapitre II, la difficulté pour récupérer les nanoparticules sous forme de poudre nous a contraints à les analyser après le dépôt de la suspension sur la platine porte-échantillon et sa mise à l'étuve.

L'objectif premier consiste, comme précédemment, à obtenir les signatures chimiques (XPS) des matériaux de référence (polymères et nanoshells isolés) qui sont essentielles à la description des systèmes hybrides cœur-coquille.

### 1. Analyse des matériaux de référence

#### a. Les polymères

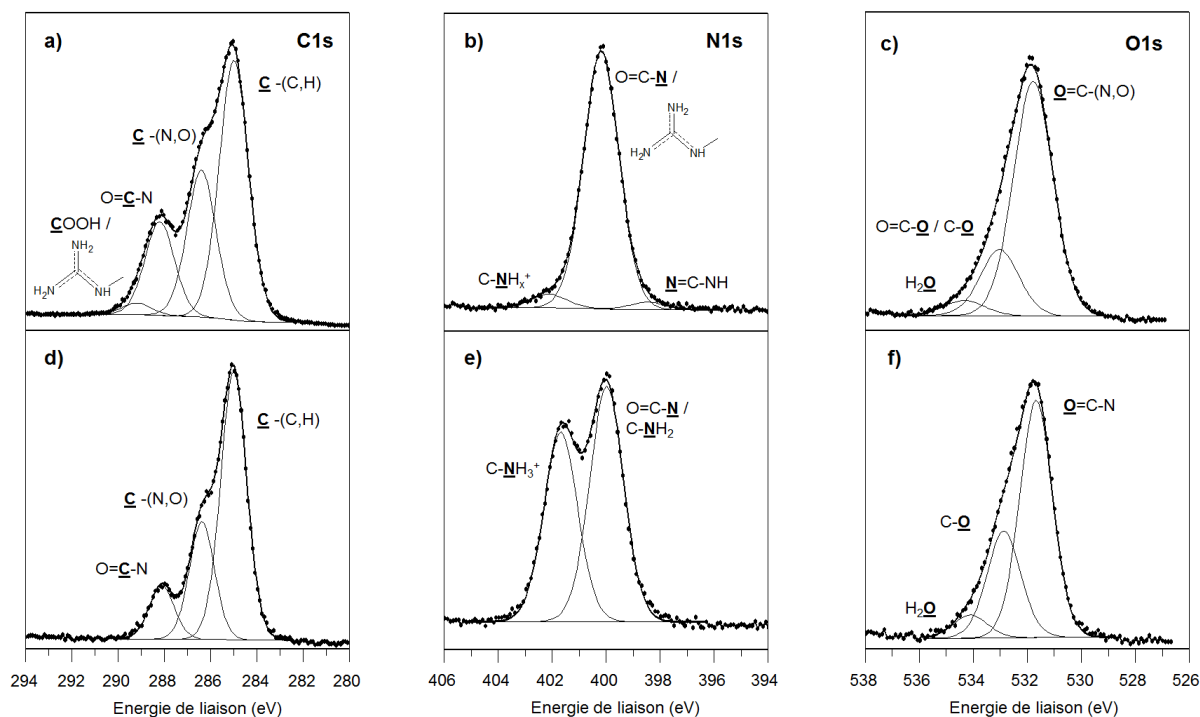
La gélatine est principalement constituée des acides aminés alanine (Ala, ~10 %), arginine (Arg, ~9 %), acide glutamique (Glu, ~11 %), glycine (Gly, ~28 %), hydroxyproline (4Hyp, ~13 %) et proline (Pro, ~17 %) assemblés entre eux par des liaisons peptidiques (motif O=C-NH-C) (Figure IV-6.a)



**Figure IV-6 : Rappel de la structure chimique principale de a) la gélatine Ala-Gly-Pro-Arg-Gly-Glu-4Hyp-Gly-Pro et b) la poly-L-lysine**

Concernant la poly-L-lysine, sa structure chimique est beaucoup plus simple que celle de la gélatine puisqu'elle correspond à la répétition d'un seul acide aminé : la L-lysine (Figure IV-6.b).

Les spectres C1s, N1s et O1s des deux polymères sont présentés dans la Figure IV-7.



**Figure IV-7 : Pics de cœur XPS C1s, N1s et O1s de la gélatine (a, b, c) et de la poly-L-lysine (d, e, f)**

Pour la gélatine, le pic de cœur C1s (Figure IV-7.a) met en évidence quatre environnements bien différenciés. La composante à 285,0 eV (35,3 % at.) correspond à des atomes de carbone du type  $\underline{\text{C}}\text{-(C,H)}$  attribuables principalement aux carbones aliphatiques des acides aminés. Le pic repéré à 286,4 eV (20,0 % at.) révèle la présence de groupements  $\underline{\text{C}}\text{-(N,O)}$ . La composante à 288,2 eV (13,0 % at.), caractéristique d'atomes de carbone dans un environnement  $\text{O}=\underline{\text{C}}\text{-N}$  est directement spécifique des liaisons peptidiques. Enfin, le pic minoritaire (1,6 % at.) à plus haute énergie de liaison (289,2 eV), peut correspondre à la fois à des groupements acides carboxyliques, significatifs de l'acide glutamique, à des groupes guanidine ( $\underline{\text{C}}\text{N}_3$ ) caractéristiques de l'arginine ou encore à des fonctions ammoniums de la lysine présente en faible quantité dans la gélatine. La complexité structurale du réseau polymérique et les similitudes de certains environnements chimiques ne permet pas de donner davantage de précisions.

Concernant le pic de cœur N1s (Figure IV-7.b), la composante la plus intense à 400,2 eV est significative de la liaison peptidique ( $\text{O}=\underline{\text{C}}\text{-N}$ ). Elle correspond également aux groupes guanidine ( $\text{CN}_3$ ) qui d'après le spectre C1s existent en très faible proportion en relation avec la formulation du biopolymère. En accord avec la déconvolution du spectre C1s, cette composante correspond à un pourcentage atomique d'azote de 11,8 %. Le spectre N1s révèle également deux composantes minoritaires à 398,5 eV (0,3 % at.) et 402,1 eV (0,6 % at.) attribuables respectivement à des liaisons imines ( $\underline{\text{N}}=\text{C-NH}$ ) et à des groupements ammoniums ( $\text{C-NH}_x^+$ ).

Enfin, le pic de cœur O1s de la gélatine présente trois composantes (Figure IV-7.c). La plus importante à 531,8 eV fait référence aux atomes d'oxygène du type  $\underline{\text{O}}=\text{C}-\text{O}$  mais surtout aux groupements carbamides ( $\underline{\text{O}}=\text{C}-\text{N}$ ). La quantification révèle un pourcentage atomique d'oxygène associé à cette composante de 11,7 % en accord avec les résultats précédents. La composante localisée à 533,0 eV (3,2 % at.) correspond à la fois à des atomes d'oxygène du type  $\text{O}=\text{C}-\underline{\text{O}}$  et  $\text{C}-\underline{\text{O}}$ . Enfin, le pic à 534,3 eV (0,8 % at.) est attribuable à de l'eau naturellement présente dans le réseau.

Enfin, la présence de silicium correspondant à de la contamination indésirable (1,7 % at.) est aussi enregistrée.

Pour la poly-L-lysine, le pic de cœur C1s (Figure IV-7.d) est traduit par trois composantes identifiées à 285,0 eV (42,1 % at.), 286,4 eV (17,1 % at.) et 288,1 eV (8,1 % at.) qui sont associées respectivement à des environnements  $\underline{\text{C}}-(\text{C},\text{H})$ ,  $\underline{\text{C}}-(\text{O},\text{N})$  et ( $\text{O}=\underline{\text{C}}-\text{NH}$ ). Par ailleurs, le pic de cœur N1s met en évidence deux composantes bien différenciées (Figure IV-7.e). Le pic repéré à plus basse énergie de liaison (400,0 eV, 7,3 % at.) est majoritairement caractéristique des groupements amides ( $\text{O}=\text{C}-\underline{\text{N}}\text{H}$ ) (mais peut aussi correspondre à une minorité de groupements amines ( $\text{C}-\underline{\text{N}}\text{H}_2$ )) tandis que le pic à 401,7 eV est attribuable aux groupements du type ammonium ( $\text{C}-\underline{\text{N}}\text{H}_3^+$ ). Enfin, le pic de cœur O1s est relativement identique à celui de la gélatine (Figure IV-7.f). La composante majoritaire à 531,7 eV (6,7 % at.) est significative de la liaison peptidique ( $\underline{\text{O}}=\text{C}-\text{NH}$ ). Les deux autres pics repérés à 532,9 eV et 534,1 eV correspondent à des atomes d'oxygène associés à de la contamination ( $\text{C}-\underline{\text{O}}$  et  $\text{H}_2\underline{\text{O}}$ ).

**Tableau IV-2 : Energies de liaison (eV), largeur à mi-hauteur (fwhm) (eV) et pourcentages atomiques (%) associés aux composantes issues de la déconvolution des spectres XPS de la gélatine et de la poly-L-lysine**

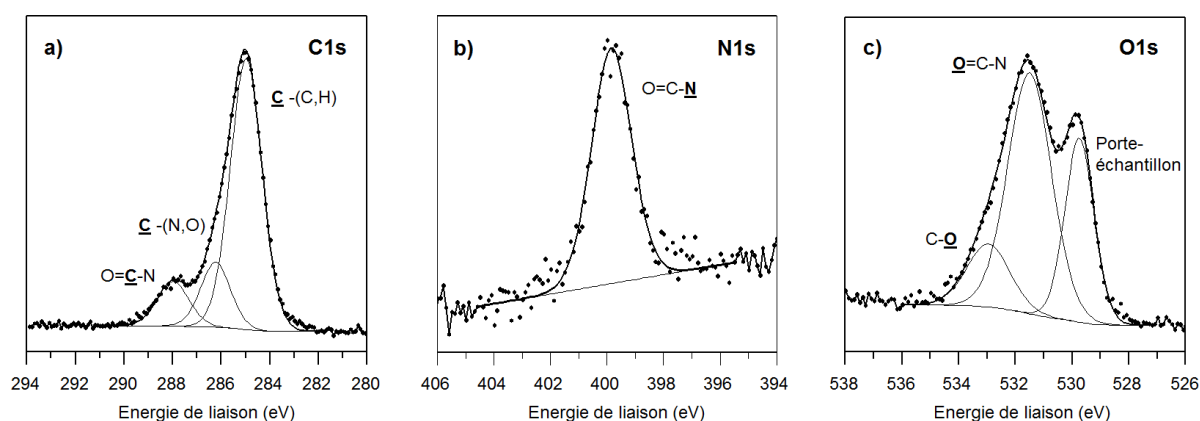
	Gélatine		Poly-L-lysine		Attribution
	E <sub>L</sub> (fwhm) (eV)	% at.	E <sub>L</sub> (fwhm) (eV)	% at.	
C 1s	285,0 (1,5)	35,3	285,0 (1,3)	42,1	$\underline{\text{C}}-(\text{C},\text{H})$
	286,4 (1,5)	20,0	286,4 (1,3)	17,7	$\underline{\text{C}}-(\text{N},\text{O})$
	288,2 (1,5)	13,0	288,1 (1,3)	8,1	$\text{O}=\underline{\text{C}}-\text{N}$
	289,2 (1,5)	1,6			$\underline{\text{C}}\text{OOH} / \underline{\text{C}}\text{N}_3$
<b>% at. Total C</b>		<b>69,9</b>		<b>67,9</b>	
N 1s	398,5 (1,5)	0,3	-		$\underline{\text{N}}=\text{C}-\text{NH}$
	400,2 (1,5)	11,8	400,0 (1,5)	7,3	$\text{O}=\text{C}-\underline{\text{N}} / \underline{\text{C}}\text{N}_3$
	402,1 (1,5)	0,6	401,7 (1,5)	5,9	$\text{C}-\underline{\text{N}}\text{H}_x^+$
<b>% at. Total N</b>		<b>12,7</b>		<b>13,2</b>	
O 1s	531,8 (1,7)	11,7	531,7 (1,4)	6,7	$\underline{\text{O}}=\text{C}-(\text{N},\text{O})$
	533,0 (1,7)	3,2	532,9 (1,5)	3,0	$\text{O}=\text{C}-\underline{\text{O}} / \text{C}-\underline{\text{O}}$
	534,3 (1,8)	0,8	534,1 (1,5)	0,7	$\text{H}_2\underline{\text{O}}$
<b>% at. Total O</b>		<b>15,7</b>		<b>10,4</b>	
Br 3d			68,1 (1,3)	4,2	
			69,2 (1,3)	2,8	
<b>% at. Total Br</b>				<b>7,0</b>	
Si 2p	-	1,7	-	1,5	
<b>% at. Total Si</b>		<b>1,7</b>		<b>1,5</b>	

Ce travail préliminaire d'analyse des polymères isolés nous a permis de préciser les environnements chimiques qui leur sont associés. Ces deux macromolécules sont en particulier caractérisées par la liaison peptidique dont la signature apparaît sur les pics de cœur C1s autour de 288,1 eV, N1s autour de 400,0 eV et O1s autour de 531,8 eV, en accord avec les analyses quantitatives.

Les rapports (% at. total C)/(% at. total N) calculés sont relativement proches pour les deux polymères (5,5 pour la gélatine et 5,1 pour la poly-L-lysine). Néanmoins, le rapport [% at. C(O=C-N)]/[% at. total N] différencie la gélatine (= 1) de la poly-L-lysine (= 0,6 dans le cas où la majorité des amines sont protonées).

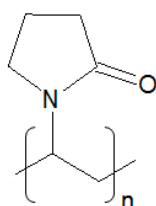
## b. Les nanoshells

Les nanoshells seules avant adsorption des polymères ont également été étudiées. En accord avec les précédents résultats du chapitre 2, la composante  $Ag3d_{5/2}$  repérée à 367,9 eV est caractéristique de l'argent métal. De la même manière, la composante  $Au4f_{7/2}$  du pic de cœur Au4f est localisée à une énergie de liaison de 83,9 eV significative de l'or métal (Annexe, p.196). Dans ce chapitre, comme les nanoshells sont stabilisées par du PVP (poly(vinylpyrrolidone)), les pics de cœur C1s, N1s et O1s sont aussi présentés à titre de référence sur la Figure IV-8.



**Figure IV-8 : Pics de cœur XPS des nanoshells NS stabilisées par le PVP : a) C1s, b) N1s et c) O1s**

Rappelons que le PVP présente en effet des groupements fonctionnels semblables à la gélatine et à la poly-L-lysine (Figure IV-9), les environnements seront donc difficiles à différencier avec cette procédure standard de traitement mathématique.



**Figure IV-9 : Structure chimique du poly(vinylpyrrolidone)**

En effet, le pic de cœur C1s met en évidence trois composantes déjà identifiées dans les spectres C1s de la gélatine et de la poly-L-lysine avec la reconnaissance d'atomes de carbone aliphatiques (285,0 eV), de ceux associés aux fonctions amines (286,2 eV) et amides (288,0 eV). La signature de la fonction amide apparaît également sur le pic de cœur N1s à 399,8 eV et sur le spectre O1s à 531,5 eV. Le pic O1s localisé à plus basse énergie de liaison (529,7 eV) est significatif d'un environnement du type oxyde qui atteste de la détection du support porte échantillon. Enfin la composante à 533,0 eV est attribuable à de la contamination du type C-O en accord avec les résidus de carbone oxydé identifiés sur spectre C1s. Enfin l'analyse XPS révèle la présence de chlore et de sodium en faibles quantités issues des sous-produits de la synthèse.

D'un point de vue quantitatif, l'analyse XPS révèle 10,8 % at. d'argent et 8,7 % at. d'or soit un rapport Ag/Au de 1,2 comme déjà calculé dans le chapitre 2. Par ailleurs, le rapport (% at. total C)/ (% at. total N) calculé est de 12,8 en accord avec celui trouvé pour le PVP seul (13,5). De plus, considérant les pourcentages atomiques de carbone (7,3 %), d'azote (4,8 %) et d'oxygène (9,2 %) relatifs aux fonctions amides, il semblerait finalement que les composantes à 288,0 eV pour le carbone et 531,5 eV pour l'oxygène soient également associées à une part de contamination (sûrement localisée sur le porte échantillon).

Globalement, ces résultats rendent compte de la difficulté de différencier les signatures XPS des polymères « biologiques » (gélatine, poly-L-lysine) de celle du stabilisant (PVP) initialement présent à la surface des nanoshells tant les groupements fonctionnels de ces macromolécules présentent des similitudes. Cette difficulté a par conséquent fait l'objet d'une attention particulière dans le paragraphe suivant consacré à la caractérisation des matériaux hybrides.

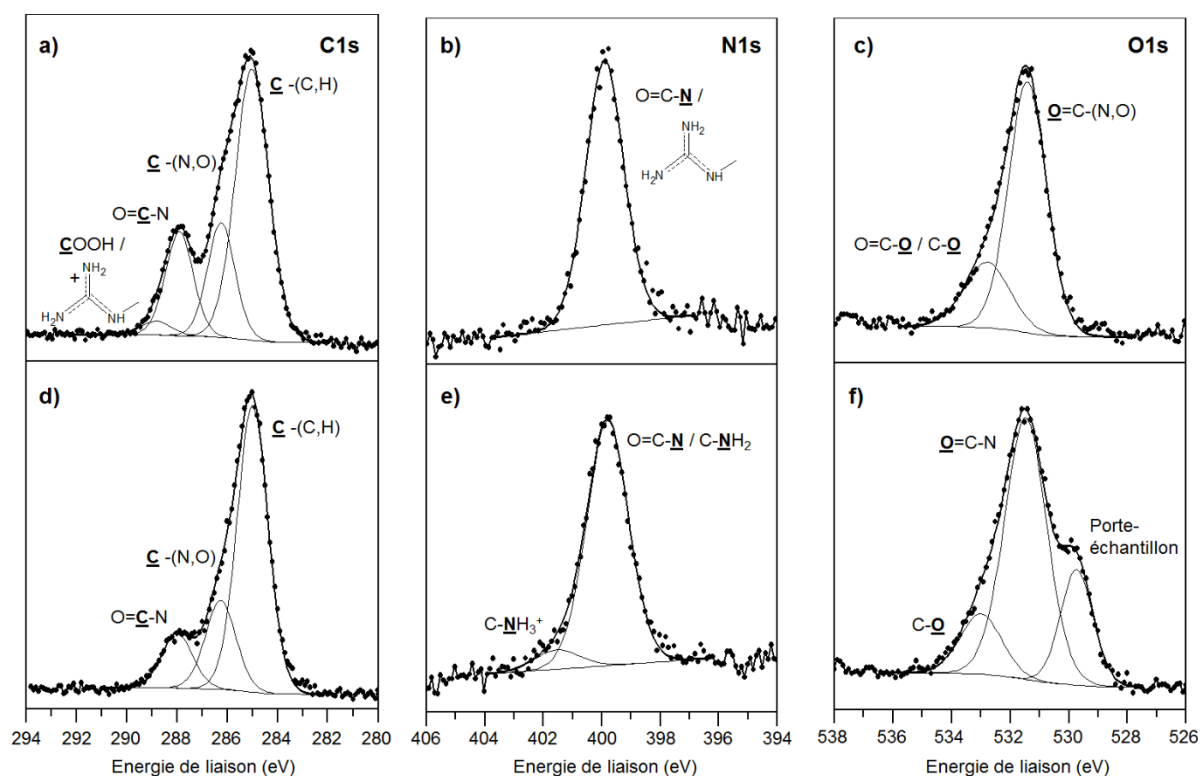
## 2. Analyse des nanoparticules hybrides

Les nanoparticules NS@Gel/SiO<sub>2</sub> et NS@PLL/SiO<sub>2</sub> dont la synthèse met en jeu une concentration en polymère de 0,1% et une concentration en silicates de 1,0.10<sup>-2</sup> M (Figure IV-4.b et Figure IV-5.d) ont été caractérisées par XPS à chaque étape d'élaboration.

### a. Les nanoparticules NS@polymère

L'analyse des pics de cœur XPS Ag3d<sub>5/2</sub> et Au4f<sub>7/2</sub> montre que les énergies de liaisons ne sont pas modifiées après adsorption (Annexe, p.196). Ceci rend compte des interactions faibles entre les polymères et les éléments métalliques (argent et or).

Par ailleurs, la Figure IV-10 présente les spectres C1s, N1s et O1s des nanoparticules après adsorption.



**Figure IV-10 : Pics de cœur XPS C1s, N1s et O1s des nanoparticules NS@Gel (a, b, c) et NS@PLL(d, e, f)**

L'allure du pic de cœur C1s des nanoparticules NS@Gel (Figure IV-10.a) est très semblable à celle de la gélatine (Figure IV-7.a). Les quatre mêmes composantes peuvent être identifiées à 285,0 eV ( $\underline{\text{C}}\text{-(C,H)}$ ), 286,2 eV ( $\underline{\text{C}}\text{-(N,O)}$ ), 287,9 eV ( $\text{O}=\underline{\text{C}}\text{-NH}$ ) et 288,8 eV ( $\underline{\text{C}}\text{N}_3/\underline{\text{C}}\text{OOH}$ ). De plus, la proportion de groupements du type  $\underline{\text{C}}\text{-(N,O)}$  et  $\text{O}=\underline{\text{C}}\text{-N}$  plus particulièrement devient plus importante après fonctionnalisation des nanoshells au détriment des fonctions  $\underline{\text{C}}\text{-(C,H)}$ . Les pics de cœur N1s et O1s sont relativement semblables à ceux de la gélatine (et du PVP) et le porte-échantillon n'est plus détecté (absence de composante O1s à 529,7 eV).

D'un point de vue quantitatif, les pourcentages atomiques de l'ensemble des éléments détectés n'évoluent pas de façon significative après adsorption de la gélatine sauf le pourcentage atomique d'azote, qui a quasiment doublé par rapport à celui déterminé pour les nanoshells (Tableau IV-3). Cette variation conduit d'ailleurs à des pourcentages atomiques équivalents pour les composantes associées à l'environnement ( $\text{O}=\text{C-NH}$ ) sur les pics de cœur C1s, N1s et O1s. Ainsi le rapport ( $\% \text{ at. total C}$ )/( $\% \text{ at. total N}$ ) calculé passe de 12,8 pour les NS à 5,1 pour les NS@Gel en accord avec celui de la gélatine (5,5).

Alors que l'adsorption de la gélatine ne fait aucun doute, l'adsorption de la poly-L-lysine est difficile à mettre en évidence par l'analyse XPS. En effet, l'allure des spectres C1s, N1s et O1s est très

similaire à celle des nanoshells stabilisées par le PVP. Toutefois, le pic de cœur N1s révèle une nouvelle composante à 401,5 eV, certes peu intense mais déjà identifiée dans le cas de l'analyse de la poly-L-lysine (groupements du type ammoniums C-NH<sub>3</sub><sup>+</sup>). Le rapport (% at. total C)/(% at. total N) calculé est de 7,7 (5,1 attendu) soit une valeur intermédiaire entre le PVP et la poly-L-lysine. La valeur du rapport [% at. C(O=C-N)]/[% at N total] de 1 conforte ce résultat.

**Tableau IV-3 : Energies de liaison (eV), largeur à mi-hauteur fwhm (eV) et pourcentages atomiques (%) associés aux composantes issues de la déconvolution des spectres XPS des nanoparticules NS, NS@Gel et NS@PLL**

	NS		NS@Gel		NS@PLL	
	E <sub>L</sub> (fwhm) (eV)	% at.	E <sub>L</sub> (fwhm) (eV)	% at.	E <sub>L</sub> (fwhm) (eV)	% at.
Ag 3d	367,9 (0,7)	6,4	367,8 (0,7)	6,9	367,9 (0,7)	4,7
	373,9 (0,7)	4,5	373,8 (0,7)	4,6	373,9 (0,7)	3,1
		<b>10,9</b>		<b>11,5</b>		<b>7,8</b>
Au 4f	83,9 (0,7)	4,9	83,9 (0,7)	5,4	83,9 (0,7)	3,7
	87,6 (0,7)	3,8	87,5 (0,7)	4,0	87,6 (0,7)	2,8
		<b>8,7</b>		<b>9,4</b>		<b>6,5</b>
C 1s	285,0 (1,5)	44,2	285,0 (1,6)	32,0	285,0 (1,4)	43,0
	286,2 (1,4)	10,0	286,2 (1,3)	11,2	286,3 (1,4)	13,3
	288,0 (1,5)	7,2	287,9 (1,3)	10,2	288,0 (1,4)	8,2
			288,8 (1,4)	1,5		
		<b>61,4</b>		<b>54,9</b>		<b>64,5</b>
Cl 2p	197,5 (1,0)	1,5	197,5 (0,9)	0,9		
	199,1 (1,0)	0,7	199,1 (0,9)	0,5		
		<b>2,2</b>		<b>1,4</b>		
Br3d					67,9 (0,8)	0,9
					69,0 (0,8)	0,6
						<b>1,5</b>
N 1s	399,8 (1,5)	4,8	399,9 (1,5)	10,6	399,8 (1,7)	7,7
					401,5 (1,8)	0,6
		<b>4,8</b>		<b>10,6</b>		<b>8,3</b>
Na 1s	1071,3 (1,4)	0,5				
		<b>0,5</b>				
O 1s	529,7 (1,2)	0,0			529,7 (1,3)	0,0
	531,5 (1,8)	9,2	531,4 (1,5)	9,4	531,5 (1,7)	9,3
	533,0 (1,8)	2,3	532,8 (1,7)	2,8	533,0 (1,6)	2,1
		<b>11,5</b>		<b>12,2</b>		<b>11,4</b>

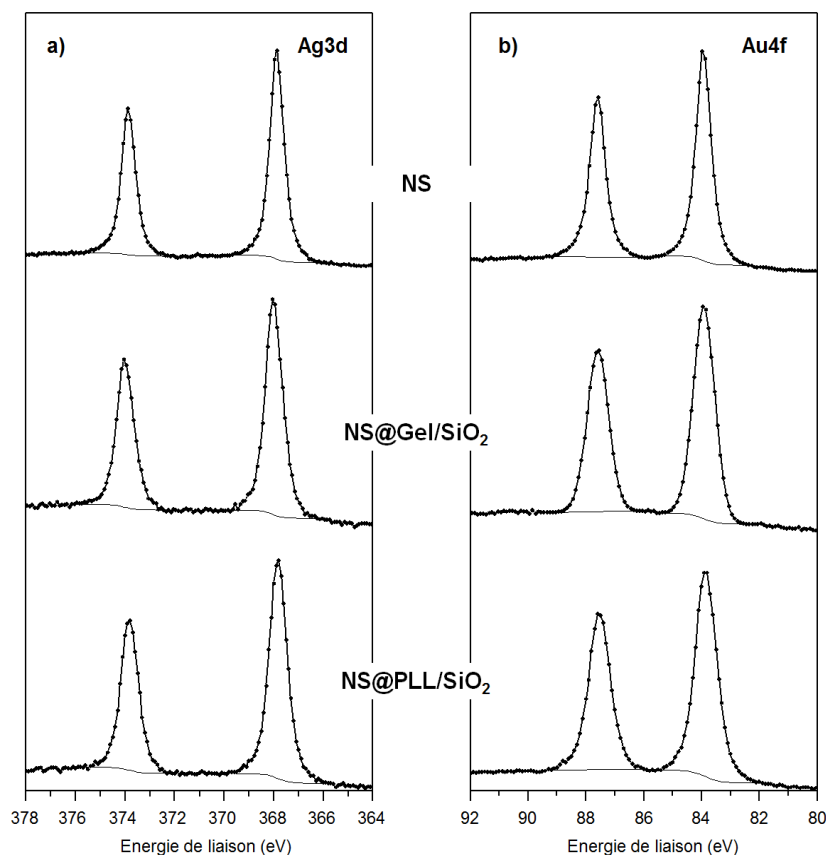
Les analyses XPS permettent donc de confirmer l'adsorption des polymères à la surface des nanoshells malgré la difficulté d'interprétation des résultats (principalement dans le cas de la poly-L-lysine) due à la présence de PVP. Notons que des analyses en RMN DOSY ont été réalisées sur ces particules sans succès compte tenu de la taille trop importante des objets.

## b. Les nanoparticules NS@polymère/SiO<sub>2</sub>

Après condensation de la silice, les analyses de surface ont été plus difficiles à valider avec la mise en évidence de phénomènes d'effets de charges différentiels. La configuration électronique du système analysé étant celle d'une jonction métal-isolant, le signal enregistré est dépendant de la zone analysée avec par exemple, dans certains cas, l'observation d'une asymétrie, d'un élargissement voire même d'un dédoublement sur les pics de cœur des métaux.

Pour l'interprétation des résultats, nous avons donc considéré les zones d'analyse où les pics de cœur associés aux métaux Ag et Au étaient symétriques, ce qui justifiait à priori d'un bon écoulement des charges au cours de l'analyse.

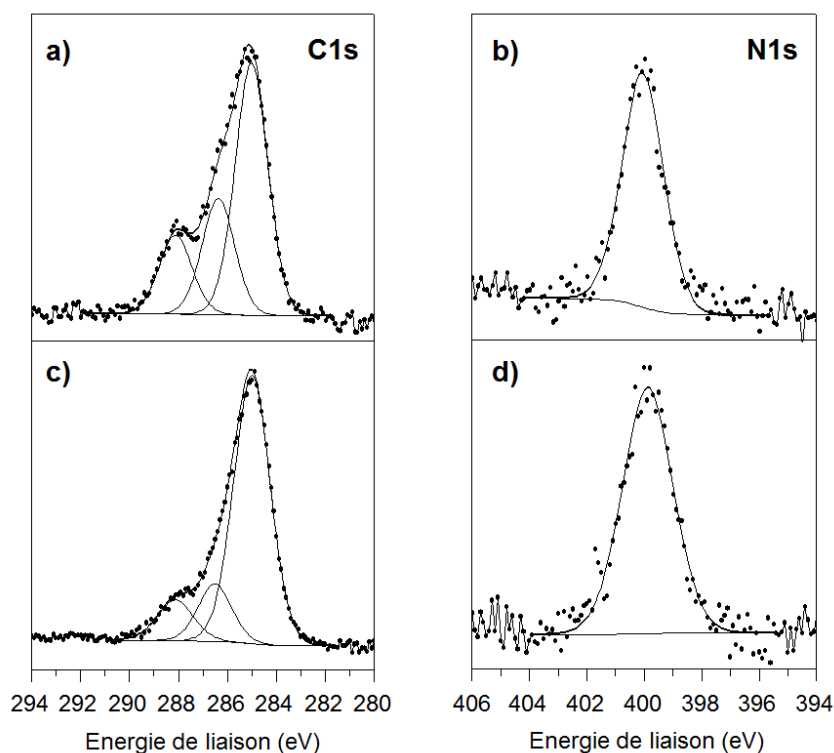
De manière générale, les résultats des analyses XPS permettent de rendre compte de l'ensemble des éléments constitutifs du système hybride, quel que soit le polymère mis en jeu dans le phénomène de biosilicification. En effet, pour les deux types de nanoparticules hybrides, l'argent et l'or sont toujours détectés, mais en plus faibles quantités (dû à l'ajout de silice), celle-ci étant présente à la surface des nanoparticules (Tableau IV-4). Les énergies de liaisons des pics Au4f<sub>7/2</sub> et Ag3d<sub>5/2</sub> ne sont pas modifiées ce qui signifie que le cœur conserve globalement son caractère métallique (Figure IV-11). Néanmoins, la largeur à mi-hauteur des pics augmente (de 0,7 eV à 0,9 eV), cette évolution résultant probablement des effets de charges induits et/ou à des environnements locaux moins bien définis.



**Figure IV-11 : Pics de cœur XPS : a) Ag3d et b) Au4f des nanoparticules NS, NS@Gel/SiO<sub>2</sub> NS@PLL/SiO<sub>2</sub>**



Par ailleurs, pour les deux types de nanoparticules NS@Gel/SiO<sub>2</sub> et NS@PLL/SiO<sub>2</sub>, les pics de cœur C1s et N1s ont un profil semblable à celui enregistré auparavant (Figure IV-12).



**Figure IV-12 : Pics de cœur XPS C1s et N1s des nanoparticules NS@Gel/SiO<sub>2</sub> (a, b) et NS@PLL/SiO<sub>2</sub> (c, d)**

Pour les nanoparticules NS@Gel/SiO<sub>2</sub>, l'environnement associé à la liaison peptidique (O=C-NH) est toujours identifiable sur les pics C1s (à 288,0 eV) et N1s (à 400,0 eV) avec des pourcentages atomiques relatifs identiques qui confirment cette attribution (Tableau IV-4).

Pour les nanoparticules NS@PLL/SiO<sub>2</sub>, ces mêmes environnements sont retrouvés mais correspondent à la fois au PVP et à la poly-L-lysine. Le rapport (% at. C)/(% at. N) dans le cas des nanoparticules NS@Gel-SiO<sub>2</sub> reste constant après l'insertion de la silice dans la structure polymère enchevêtrée (= 5,6) alors que pour la poly-L-lysine ce rapport devient important (= 9,4) révélant une concentration en carbone anormalement importante. Par contre, le rapport [% at. C(O=C-N)]/[% at. N total] conserve sa valeur de 1.

**Tableau IV-4 : Energies de liaison (eV), largeur à mi-hauteur fwhm (eV) et pourcentages atomiques (%) associés aux composantes issues de la déconvolution des spectres XPS des nanoparticules NS@Gel-SiO<sub>2</sub> et NS@PLL-SiO<sub>2</sub>**

	NS@Gel-SiO <sub>2</sub>		NS@PLL-SiO <sub>2</sub>	
	E <sub>L</sub> (fwhm) (eV)	% at.	E <sub>L</sub> (fwhm) (eV)	% at.
Ag3d	367,9 (0,9)	1,9	367,8 (0,9)	2,9
	373,9 (0,9)	1,3	373,8 (0,9)	2,0
		<b>3,2</b>		<b>4,9</b>
Au4f	83,9 (0,9)	1,6	83,8 (0,9)	2,4
	87,4 (0,9)	1,2	87,5 (0,9)	1,8
		<b>2,8</b>		<b>4,2</b>
C1s	285,0 (1,6)	18,3	285,0 (1,7)	21,6
	286,4 (1,6)	8,4	286,5 (1,6)	4,2
	288,1 (1,6)	5,8	288,1 (1,7)	3,3
		<b>32,5</b>		<b>29,2</b>
Br3d			67,9 (1,0)	0,4
			68,9 (1,0)	0,3
				<b>0,7</b>
N1s	400,0 (1,7)	5,8	399,9 (2,1)	3,1
		<b>5,8</b>		<b>3,1</b>
O1s	531,1 (1,8)	2,6	530,6 (1,8)	2,2
	532,7 (1,8)	36,3	532,6 (1,8)	36,5
		<b>38,9</b>		<b>38,8</b>
Si2p	103,1 (1,5)	11,3	103,2 (1,6)	12,8
	103,7 (1,5)	5,6	103,8 (1,6)	6,4
		<b>16,9</b>		<b>19,2</b>

Le silicium est également détecté après l'étape de biominéralisation. La composante Si2p<sub>3/2</sub> du pic de cœur Si2p ( Figure IV-13.a, c) est enregistrée à une énergie de liaison de 103,7 eV caractéristique d'un environnement SiO<sub>2</sub>. En accord avec ce résultat, la composante majoritaire sur le pic de cœur O1s est localisée à 532,7 eV ( Figure IV-13.b, d).

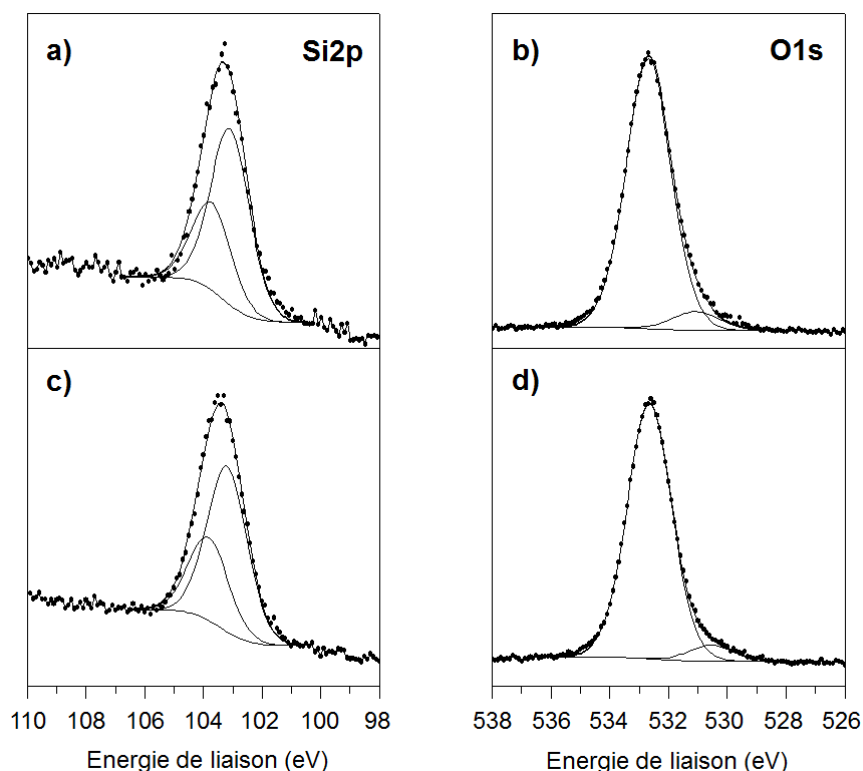


Figure IV-13 : Pics de cœur XPS Si2p et O1s des nanoparticules NS@gel-SiO<sub>2</sub> (a, b) et NS@PLL-SiO<sub>2</sub> (c, d)

### III. Discussion

L'élaboration de la coquille polymère/silice sur les nanoshells est basée sur des interactions faibles d'abord entre le cœur et le polymère puis entre le polymère et la silice. Les techniques de caractérisation utilisées dans ce travail permettent de confirmer chaque étape de la synthèse mais pas de mettre en évidence la nature exacte des interactions ni les atomes ou groupements mis en jeu. Néanmoins, certaines données de la littérature permettent de proposer des hypothèses.

#### 1. Nanoparticules NS@polymère

Le PVP initialement adsorbé sur les nanoshells pour les stabiliser joue probablement un rôle dans l'adsorption des polymères.

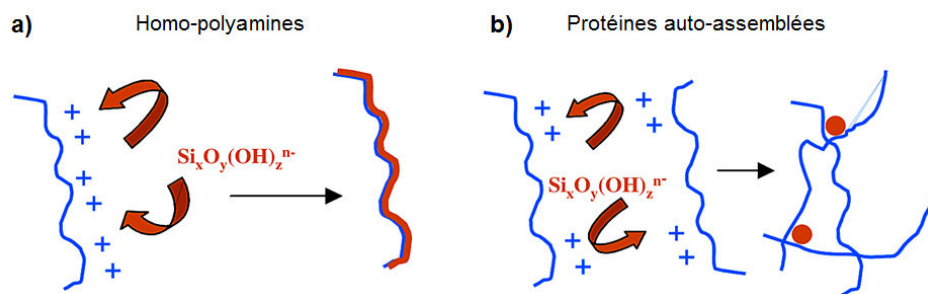
Quelques travaux de la littérature rapportent les interactions mises en jeu dans le cas de l'adsorption de poly-L-lysine sur des nanoparticules. Par exemple, Xu et *al.*<sup>[1]</sup> ont pu mettre en évidence par spectroscopie Raman exaltée de surface (SERS) que l'adsorption de L-lysine sur des nanoparticules d'or stabilisées par du citrate s'établit par l'intermédiaire du groupe ammonium en position  $\epsilon$ . Joshi et *al.*<sup>[2]</sup> ont également pu conclure que l'adsorption avait lieu par l'intermédiaire des

amines/ammoniums de la lysine selon le pH. Dans la gélatine, les unités lysine étant minoritaires, l'interaction implique d'autres entités. Les groupements guanidinium (unité arginine) sont susceptibles d'être à l'origine de l'adsorption, l'interaction entre l'arginine et l'or ayant déjà été rapportée<sup>[3]</sup>.

## 2. Nanoparticules NS@polymère/SiO<sub>2</sub>

Les processus de biominéralisation ont été rapportés, comme nous l'avons vu au cours de l'introduction bibliographique, dans plusieurs travaux de la littérature. L'interaction, au cœur du mécanisme, se fait essentiellement entre les charges cationiques du polymère et les espèces silicatés négatives<sup>[4]</sup>. Les liaisons hydrogènes participent également au processus. De ce fait, la structure des polymères et la distribution des charges sur les chaînes jouent un rôle essentiel.

Coradin et *al.*<sup>[5-7]</sup> soulignent que pour des microparticules de gélatine, la croissance de la silice a lieu sous la forme de nanoparticules en raison de l'organisation des chaînes en hydrogel alors que la poly-L-lysine a plutôt tendance à promouvoir une condensation étendue des silicates en raison de la conformation du polymère induite par la distribution homogène des sites cationiques sur la chaîne comme illustré sur la Figure IV-14.



**Figure IV-14 : Modes d'interaction entre les silicates et les macromolécules polycationiques : exemples des a) homo-polyamines et b) protéine auto-assemblées<sup>[5]</sup>**

Cependant, les travaux de Allouche et *al.*<sup>[7]</sup> démontrent que pour des nanoparticules de gélatine, l'extension des chaînes est réduite ce qui conduit à une déposition rapide de silice sous la forme d'une fine couche. Ce résultat est en bon accord avec les clichés de microscopie électronique. En effet, lorsque la concentration en gélatine est faible (0,1 %), les chaînes sont essentiellement confinées au niveau de la surface des nanoshells ce qui conduit à des couches fines et plus denses.

## IV. Interaction des nanoparticules avec les cellules : étude de l'exposition à temps court (16 h)

La dernière partie de ce chapitre vise à donner un premier aperçu du comportement biologique de ces nouveaux nanomatériaux vis-à-vis de cellules cancéreuses. La surface des nanoparticules étant modifiée par une membrane polymère ou hybride polymère/silice, il s'agit précisément d'étudier l'influence de la nature de cette membrane sur les cellules. Des analyses en microscopie électronique en transmission (MET) et en spectrométrie de masse par torche à plasma (ICP-MS) sont mises en œuvre pour rendre compte des processus d'internalisation. La cytotoxicité des nanoparticules est par ailleurs évaluée grâce à la technique de cytométrie de flux.

Pour ce travail, le choix des cellules s'est porté sur des cellules HaCaT (issues d'épiderme humain) qui sont immortelles donc à priori faciles à utiliser et à manipuler en culture.

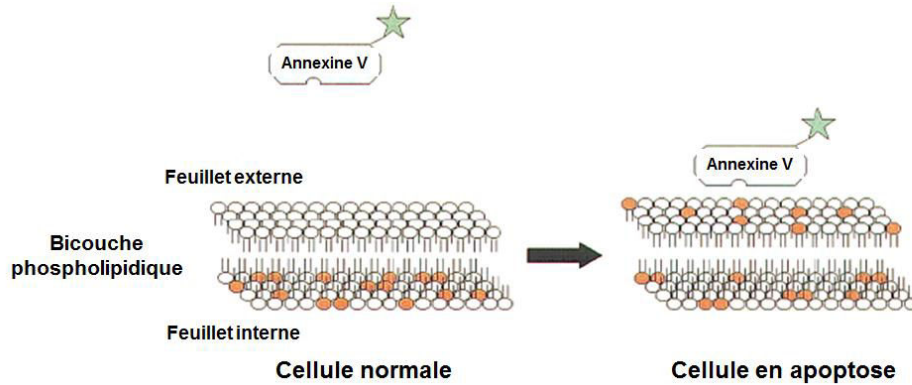
Avant de discuter des résultats obtenus ci-après, il convient de définir ici les deux principaux processus de mort cellulaire que sont la nécrose et l'apoptose. La nécrose est une mort cellulaire qui survient à la suite d'une agression externe. La membrane plasmique de la cellule est d'abord altérée ce qui entraîne une entrée anormale d'eau et d'électrolytes avec comme conséquence un gonflement de la cellule suivie rapidement de fragmentation irrégulière de l'ADN. C'est un événement passif, accidentel. A l'inverse, l'apoptose, ou mort cellulaire programmée, est un processus actif qui est un phénomène essentiel dans de nombreux processus physiologiques et pathologiques. Les cellules s'autodétruisent lorsqu'elles sont endommagées ou dysfonctionnelles.

La cytométrie de flux est une technique qui permet la mesure simultanée de plusieurs caractéristiques physiques et biologiques d'une cellule. Elle est caractérisée par deux principes :

- Le guidage des cellules isolées en suspension à l'aide d'un flux laminaire liquide, assurant le défilement des cellules une à une devant une source d'excitation lumineuse à une vitesse uniforme
- L'utilisation d'un système d'excitation et de détection permettant l'analyse d'une cellule en quelques microsecondes

Le laser produit une lumière monochromatique qui excite spécifiquement un fluorochrome à une longueur d'onde donnée. Ces fluorochromes utilisés se fixent directement sur un élément cellulaire spécifique comme l'ADN par exemple. Ainsi, l'intensité de fluorescence émise est alors proportionnelle à la quantité de l'élément. Les cellules viables présentent une membrane plasmique constituée de phospholipides qui forment une double couche (bicouche) asymétrique. Par exemple, la phosphatidylsérine n'est présente qu'au niveau interne de la bicouche lipidique. Pendant l'apoptose précoce, la phosphatidylsérine est transloquée de la face interne à la face externe de la membrane

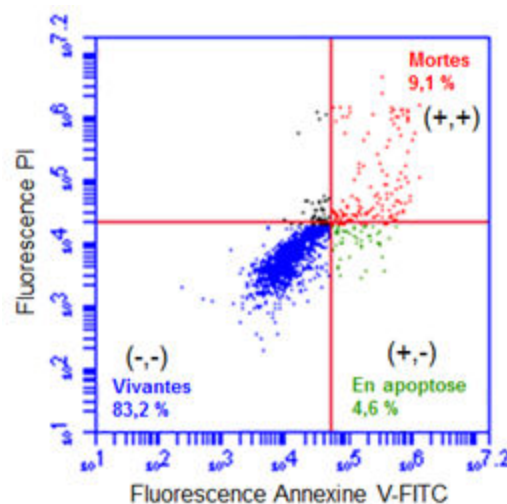
plasmique et peut être identifiée en utilisant un conjugué fluorescent de l'annexine V (Figure IV-15). Cette protéine ne peut donc pas se lier aux cellules viables (qui ne présentent pas de phosphatidylsérine à la surface). Néanmoins, elle peut se fixer sur les cellules nécrotiques du fait de la perte d'intégrité de la membrane.



**Figure IV-15 : Schématisation de la perte d'asymétrie de la membrane plasmique durant l'apoptose et du test à l'Annexine V**

Ainsi, pour différencier les cellules apoptotiques des cellules nécrotiques, on utilise en complément un autre fluorochrome tel que l'iodure de propidium (PI) qui est un agent qui ne traverse que les membranes cytoplasmiques endommagées et par conséquent est utilisé comme marqueur de cellules mortes (nécrotiques).

Les résultats obtenus en cytométrie de flux se présentent sous la forme suivante (Figure IV-16). Comme le montre la représentation, cette technique analytique permet de compter et de distinguer les cellules viables, des cellules apoptotiques et des cellules nécrotiques.

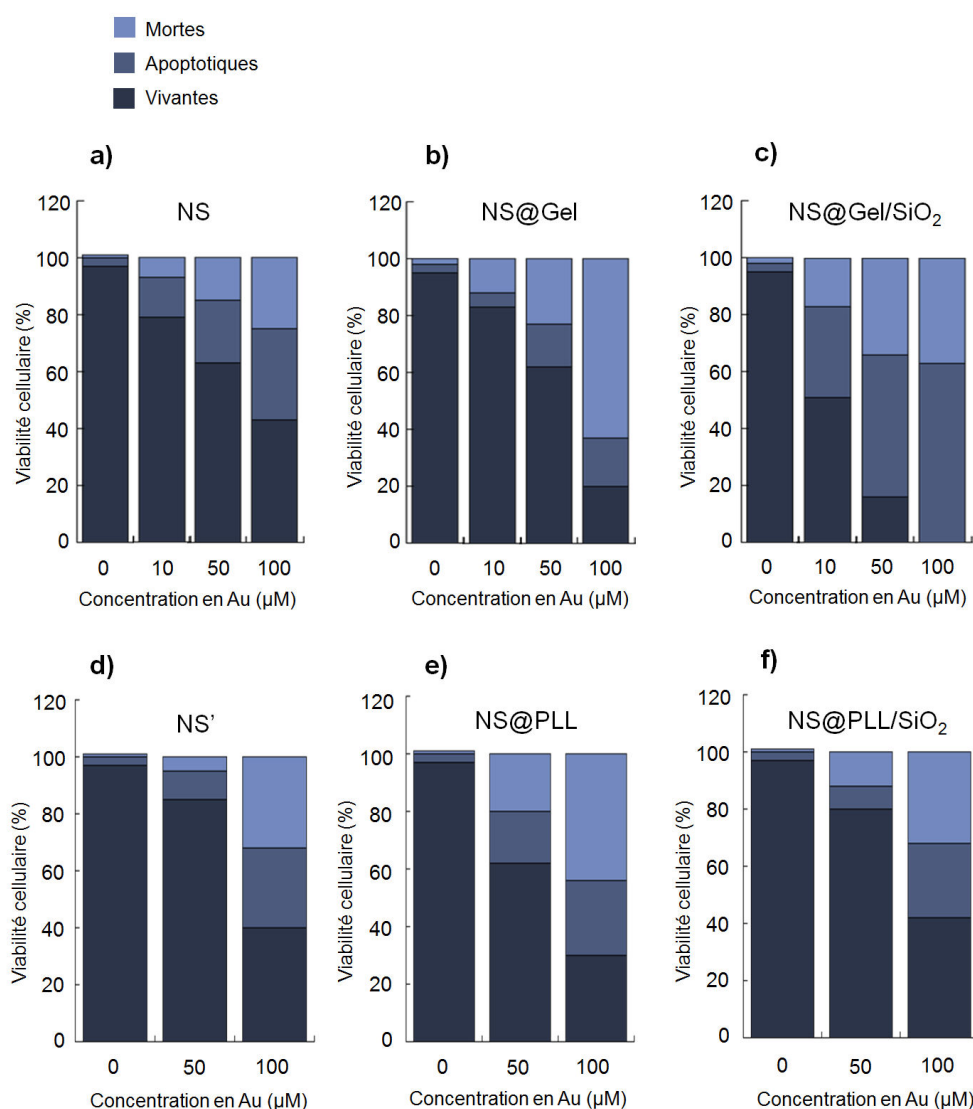


**Figure IV-16 : Analyse des différentes populations cellulaires par co-marquage à l'Annexine V-FITC et à l'iodure de propidium (PI)**

Dans notre cas, les cellules HaCaT ont été mises en culture dans du milieu de culture DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) (2 ml) dans des plaques 6 puits de 10 cm<sup>2</sup> de surface accessible chacun et incubées 24 h avant d'être exposées à une suspension de nanoparticules à 37°C pendant 16 h. Pour pouvoir évaluer l'influence de la concentration en particules sur les cellules, la concentration molaire en or est préalablement déterminée par ICP-MS pour chaque suspension de nanoparticules avant injection dans les puits de culture. Pour chaque concentration, l'expérience a été répétée trois fois et les puits ont ensuite été regroupés pour l'évaluation de la viabilité cellulaire.

### 1. Etude de la viabilité cellulaire

Les résultats de viabilité cellulaire déterminés par cytométrie de flux et retranscrits sous forme d'histogrammes sont présentés dans la Figure IV-17.



**Figure IV-17 : Viabilité cellulaire après 16h d'exposition aux nanoparticules a) NS, b) NS@Gel, c) NS@Gel-SiO<sub>2</sub>, d) NS', e) NS@PLL, f) NS@PLL-SiO<sub>2</sub>. Comptage des cellules mortes (nécrotiques ou apoptotiques tardives), apoptotiques et vivantes par cytométrie de flux**

Quelles que soient les nanoparticules considérées, la viabilité cellulaire diminue d'autant plus que la concentration en or augmente (Figure IV-17). De plus, la formation de la couche de silice dans le cas des échantillons à base de gélatine augmente significativement l'effet délétère conduisant même à une mort cellulaire quasi-totale pour les nanoparticules à une concentration en or de 100  $\mu\text{M}$ . A l'inverse, pour les échantillons à base de poly-L-lysine, aucun effet significatif de la silice n'est observé.

Il est relativement difficile de comparer ces résultats avec ceux issus de la littérature étant donné la variabilité des paramètres. L'effet de dose observé peut être le résultat de plusieurs phénomènes.

Premièrement, l'interaction des nanoparticules avec le milieu de culture et en particulier le sérum, nécessaire à la prolifération des cellules peut expliquer l'évolution. En effet, Alkilany et *al.*<sup>[8]</sup> ont montré que la protéine principale qui compose le milieu, l'albumine de sérum bovin (BSA, bovin serum albumin), peut s'adsorber sur des nano-bâtonnets d'or. Ainsi, plus la concentration en nanoparticules est importante, plus la concentration de cette protéine en solution diminue, ce qui prive les cellules de leurs nutriments et donc diminue la viabilité cellulaire.

Par ailleurs, la formation d'une couronne de protéine autour des nanoparticules peut conduire à une modification de la charge de surface. En particulier, la BSA s'adsorbe de manière significative sur les surfaces chargées positivement (en raison de sa charge négative). La stabilité des nanoparticules est alors modifiée. La présence de sel dans le milieu en concentration importante accentue cet effet. Finalement, les espèces qui composent le milieu peuvent contribuer à la diminution de la charge de surface<sup>[9]</sup>. Ce phénomène peut conduire à une agrégation non contrôlée des nanoparticules qui pourrait expliquer la toxicité.

Enfin, la biodégradabilité de la gélatine peut expliquer les résultats de toxicité observés pour les nanoparticules NS@Gel-SiO<sub>2</sub>. En effet, la digestion partielle de biopolymère lors de l'internalisation dans les cellules a déjà été mise en évidence dans la littérature<sup>[6,7]</sup>. Dans ce cas, la silice de la coquille peut se retrouver sous forme libre (petites nanoparticules) et induire une toxicité importante comme l'ont montré Quignard et *al.*<sup>[10]</sup>. Par ailleurs, cet effet cytotoxique important de la silice dans le cas des systèmes à base de gélatine est vraisemblablement d'autant plus marqué que la gélatine présente un caractère relativement peu cytotoxique au vu de nombreuses données de la littérature<sup>[11-14]</sup>.

Dans le cas des nanoparticules à base de poly-L-lysine, la cytotoxicité plus modérée est également en accord avec un certain nombre de données de la littérature. Ces études montrent notamment un caractère « irritant » faible de la lysine sur des cellules HaCaT<sup>[15]</sup>. Par ailleurs, il semble que la toxicité de la poly-L-lysine sur des modèles de cellules fibroblastes dépende de son poids moléculaire en raison du nombre de charge en interaction avec la membrane cellulaire<sup>[16,17]</sup>. En dessous de 60-70 kDa, ce qui est le cas ici, il semble que l'effet cytotoxique soit modéré. Enfin dans notre cas, il semble que la silice n'augmente pas le caractère cytotoxique par rapport aux particules NS@PLL. Si l'on compare ce résultat avec les particules à base de gélatine, il n'est pas exclu que la morphologie et la structure de la coquille hybride qui est plus dense pour les nanoparticules NS@PLL/SiO<sub>2</sub> ne génère que peu de nanoparticules de silice après dégradation des matériaux au sein des cellules. Par conséquent, la structuration de la silice



différente en fonction de la conformation moléculaire du polymère jouerait un rôle significatif dans le caractère cytotoxique des matériaux.

## 2. Etude de l'internalisation

Après 16 h d'exposition à des suspensions à 10  $\mu\text{M}$  et 100  $\mu\text{M}$ , les cellules ont été fixées puis observées en MET sur des coupes ultra-fines. Dans un même temps, nous avons réalisé un protocole identique mais pour lequel, après exposition, les cellules ont été isolées de leur milieu. Le culot de cellules ainsi que le milieu ont alors été analysés par ICP-MS afin de remonter à la quantité molaire d'or dans chaque échantillon.

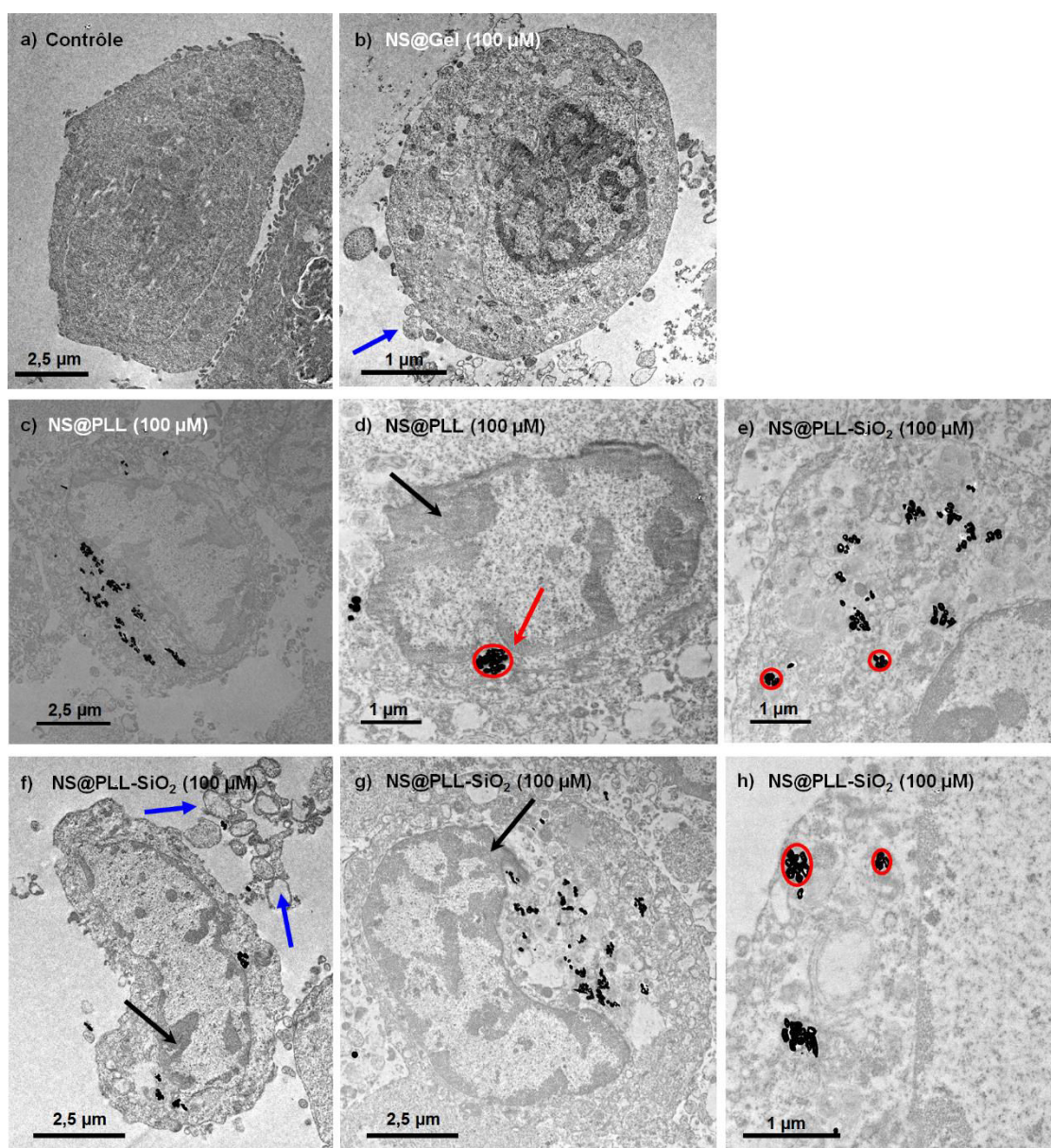
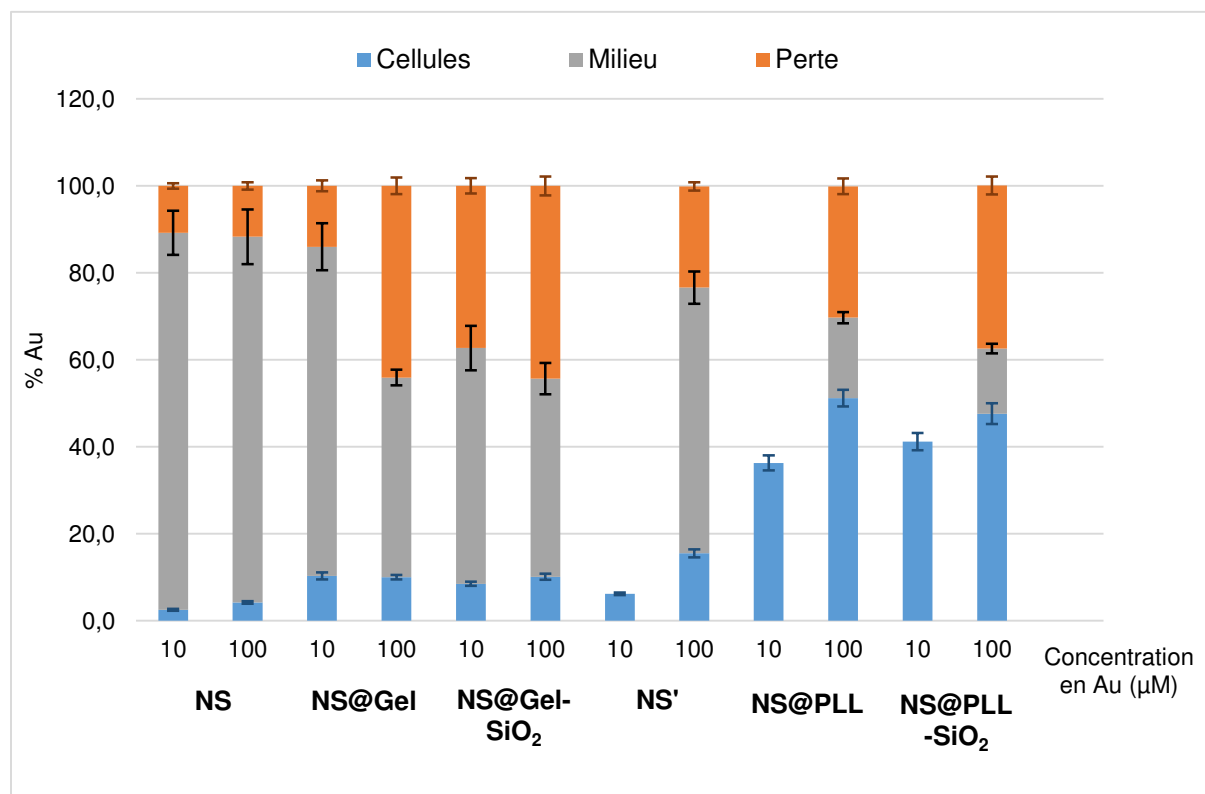


Figure IV-18 : Images MET de coupes ultra-fines de cellules a) sans exposition et après 16h d'exposition aux nanoparticules b) NS@Gel (100  $\mu\text{M}$ ), c-d) NS@PLL (100  $\mu\text{M}$ ), e-h) NS@PLL-SiO<sub>2</sub>

La tendance générale qui se dégage des différents clichés MET enregistrés est que les nanoparticules NS (et NS'), NS@Gel (Figure IV-18.b) et NS@Gel/SiO<sub>2</sub> ne sont pas quasiment pas internalisées par les cellules HaCaT. Par contre, les nanoparticules NS@PLL et NS@PLL-SiO<sub>2</sub> se retrouvent de manière plus significative dans le cytoplasme des cellules, jusqu'à parfois même atteindre le noyau (Figure IV-18.d). L'internalisation se fait de manière passive et les nanoparticules sont présentes dans le cytosol sous la forme d'agrégats plus ou moins denses (Figure IV-18.c-h) et se retrouvent parfois piégées dans des vésicules (repérées par les cercles rouges sur les Figure IV-18.d, e, h). La comparaison avec les cellules du contrôle (Figure IV-18.a), montre que l'ensemble des membranes cellulaires semblent endommagées. On peut d'ailleurs observer sur plusieurs images des débris cellulaires (repérés par les flèches bleues). La morphologie des cellules est modifiée ce qui indique une perturbation de leur physiologie (Figure IV-18.f). De plus, un début de condensation de la chromatine est mis en évidence sur plusieurs images (flèches noires sur les figures (Figure IV-18.d, f, g)). L'ensemble de ces modifications morphologiques des cellules traduisent le début d'un phénomène d'apoptose.

Les analyses ICP-MS nous ont ensuite permis de calculer le pourcentage molaire d'or (quantité molaire d'or mesurée par ICP-MS sur la quantité molaire introduite au départ) dans le culot de cellules et dans le milieu pour chaque type de nanoparticule et chaque concentration.

Nous avons également reporté le pourcentage molaire d'or associé aux pertes. Ces pertes sont dues à l'interaction des nanoparticules avec les puits de culture, avec le milieu (sérum) ainsi qu'aux différentes étapes de lavage.



**Figure IV-19 : Pourcentages molaires d'or dans les cellules, dans le milieu et associé aux pertes déduits des analyses ICP-MS des culots de cellules et du milieu pour chaque type de nanoparticules et chaque concentration**

Les résultats des analyses ICP-MS (Figure IV-19) sont en accord avec les clichés de microscopie puisque les pourcentages molaires d'or associés aux culots de cellules exposées aux nanoparticules NS@PLL et NS@PLL-SiO<sub>2</sub> sont nettement plus importants. En effet, quasiment 50 % de la quantité molaire d'or introduite au départ se retrouve dans les cellules lorsqu'elles ont été exposées à ces suspensions à 100 µM.

Ces résultats préliminaires montrent donc un effet de la surface des nanoparticules sur le phénomène d'internalisation. La poly-L-lysine favorise ce phénomène et la formation de la couche de silice sur les nanoparticules NS@PLL n'a pas de réelle influence.

Pour essayer de comprendre ces résultats, une caractérisation plus approfondie des nanoparticules dans des conditions biologiques (c'est-à-dire en milieu de culture) est nécessaire. En effet, l'évaluation de la charge des nanoparticules, de la stabilité des suspensions, de l'état d'agrégation sont tant de paramètres qui sont à considérer afin de pouvoir appréhender au mieux les mécanismes d'internalisation. L'interaction avec la membrane cellulaire à l'origine de l'internalisation, l'état de surface en terme de densité et de rugosité est également à prendre compte. En particulier, nous avons pu voir sur quelques images MEB qu'en fonction du polymère utilisé, la gélatine ou la poly-L-lysine, les coquilles bio-hybrides formées pouvaient présenter des structurations de surface différentes qui peuvent en partie expliquer les résultats obtenus.

Néanmoins, dans le cas du système à base de PLL, le taux d'internalisation plus important est en accord avec la tendance observée dans différentes études de la littérature. La poly-lysine est en effet particulièrement connue pour être un excellent agent de transfection de gènes<sup>[18-20]</sup> en raison de ses interactions avec l'ADN et sa capacité de protection vis-à-vis de nucléases. Une étude montre en particulier une efficacité d'internalisation de particules mésoporeuses siliciques vis-à-vis de cellules HeLa lorsqu'elles sont fonctionnalisées par de la poly-lysine<sup>[21]</sup>.

## CONCLUSION

Ce chapitre consacré à l'élaboration d'une coquille hybride polymère/silice par une approche biomimétique ouvre de nouvelles perspectives autour de la biosilicification. Ce mécanisme, inspiré d'organismes vivants (diatomées) et qui met en jeu des molécules organiques (acides aminés, peptides, polyamines) et des espèces silicatées, a été adapté ici dans cette étude dans l'intérêt de la réalisation de systèmes Au@SiO<sub>2</sub> hybrides à caractère plus biocompatible.

Deux polymères, la gélatine et la poly-L-lysine, qui sont déjà reportés dans la littérature pour le processus de biosilicification, ont été choisis pour ce travail. La première étape, qui consistait à les adsorber sur la surface des nanoparticules, a pu être confirmée par des mesures DLS avec une évolution du rayon hydrodynamique des nanoparticules mais également par spectroscopie UV-vis avec un décalage significatif de la bande plasmon des nanoshells après modification avec les polymères. La suite du travail concernait la condensation de silicates de sodium activée par les polymères adsorbés à la surface des nanoparticules. Avec la réalisation de synthèse où la quantité de gélatine adsorbée variait, nous avons pu souligner le rôle catalytique du polymère avec une condensation d'autant plus favorisée que la quantité de gélatine était importante. La variation de la concentration en silicates a également été étudiée sur les deux systèmes NS@Gel(0,1%) et NS@PLL(0,1%). Les images de microscopie électronique ont montré dans ce cas que l'épaisseur de la couche formée augmentait très légèrement avec la concentration en silicates ce qui confirme encore le rôle majeur des polymères dans la condensation silicique. De plus, les couches hybrides formées se distinguent dans certaines conditions. En effet, la poly-L-lysine a conduit à des coquilles qui semblent plus denses par rapport à celles obtenues avec la gélatine. Ce résultat met en évidence l'influence de la structure du polymère dans la formation et la croissance de la silice. La gélatine du fait de l'organisation de ces chaînes en réseau conduit à des structures qui sont plus hétérogènes.

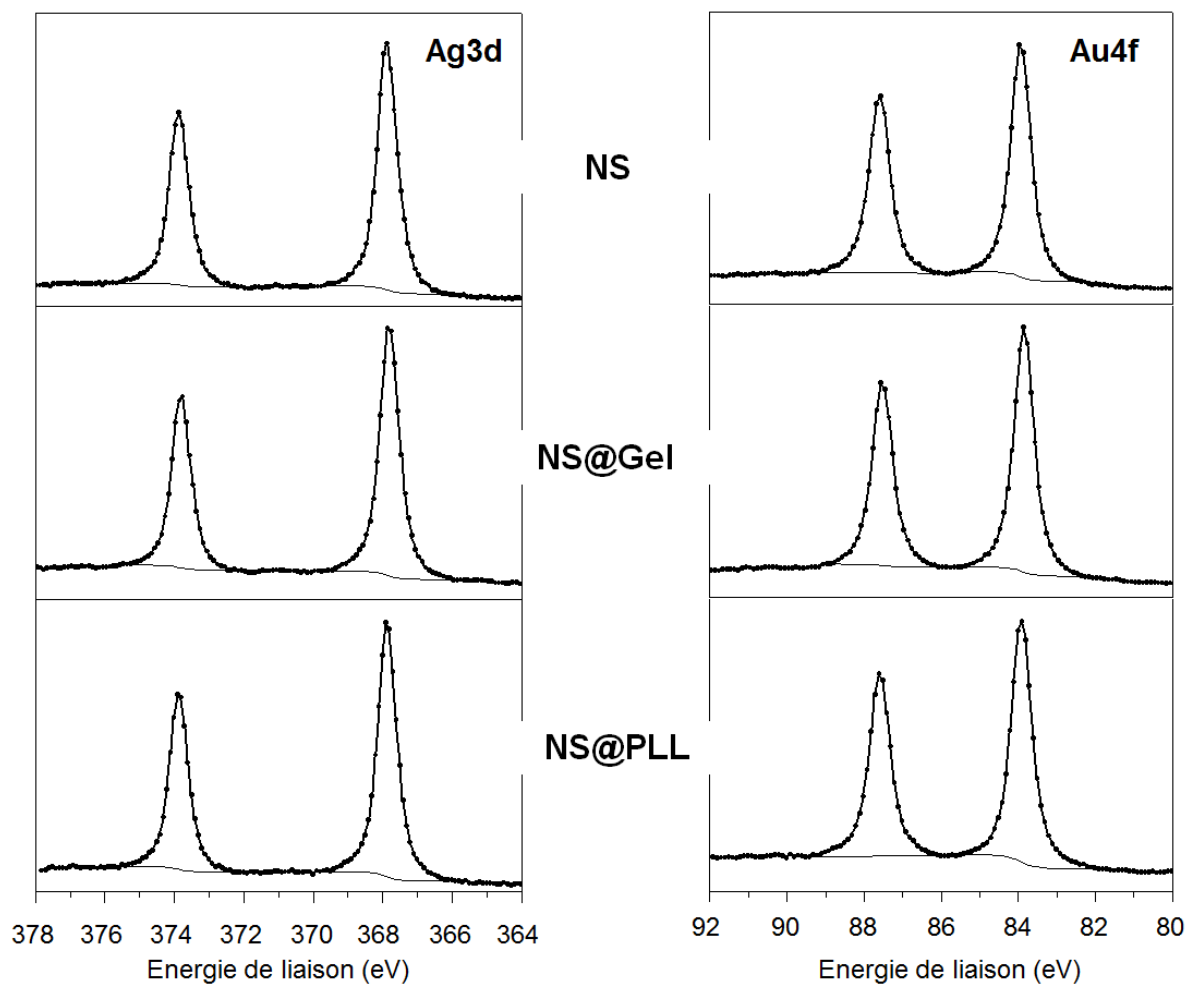
Dans cette démarche, les analyses XPS ont permis de confirmer la nature hybride des couches élaborées avec la mise en évidence des environnements chimiques caractéristiques des polymères et de la silice.

Enfin, nous avons pu appréhender, par une première série de tests *in vitro*, l'interaction des nanoparticules avec des cellules de type HaCaT. Les tests de cytotoxicité ont révélé un effet de dose plus ou moins importants selon la composition de surface des nanoparticules. Par la suite, les images de microscopie électronique et les analyses en ICP-MS ont permis de montrer que les nanoparticules à base de poly-L-lysine étaient plus internalisées que celles constituées de gélatine. A ce stade de l'étude, la compréhension du mécanisme d'internalisation reste difficile à évaluer par manque d'informations d'un point de vue caractérisation des nanoparticules (charges, état d'agrégation, stabilité) en conditions biologiques.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] L. Xu, Y. Guo, R. Xie, J. Zhuang, W. Yang, T. Li, *Nanotechnology* **2002**, *13*, 725.
- [2] H. Joshi, P. S. Shirude, V. Bansal, K. N. Ganesh, M. Sastry, *J. Phys. Chem. B* **2004**, *108*, 11535.
- [3] G. Tomoaia, P. T. Frangopol, O. Horovitz, L.-D. Boboş, A. Mocanu, M. Tomoaia-Cotisel, *J. Nanosci. Nanotechnol.* **2011**, *11*, 7762.
- [4] T. Coradin, J. Livage, *Colloids Surf. B Biointerfaces* **2001**, *21*, 329.
- [5] T. Coradin, J. Livage, *Acc. Chem. Res.* **2007**, *40*, 819.
- [6] M. Boissière, P. J. Meadows, R. Brayner, C. Hélyary, J. Livage, T. Coradin, *J. Mater. Chem.* **2006**, *16*, 1178.
- [7] J. Allouche, M. Boissière, C. Hélyary, J. Livage, T. Coradin, *J. Mater. Chem.* **2006**, *16*, 3120.
- [8] A. M. Alkilany, P. K. Nagaria, C. R. Hexel, T. J. Shaw, C. J. Murphy, M. D. Wyatt, *Small* **2009**, *5*, 701.
- [9] K. Rezwani, A. R. Studart, J. Vörös, L. J. Gauckler, *J. Phys. Chem. B* **2005**, *109*, 14469.
- [10] S. Quignard, G. Mosser, M. Boissière, T. Coradin, *Biomaterials* **2012**, *33*, 4431.
- [11] A. K. Gupta, M. Gupta, S. J. Yarwood, A. S. G. Curtis, *J. Controlled Release* **2004**, *95*, 197.
- [12] C. Coester, P. Nayyar, J. Samuel, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2006**, *62*, 306.
- [13] G. Kaul, M. Amiji, *J. Pharm. Sci.* **2005**, *94*, 184.
- [14] S. J. Byrne, Y. Williams, A. Davies, S. A. Corr, A. Rakovich, Y. K. Gun'ko, Y. P. Rakovich, J. F. Donegan, Y. Volkov, *Small* **2007**, *3*, 1152.
- [15] L. Sanchez, M. Mitjans, M. R. Infante, M. P. Vinardell, *Toxicol. Lett.* **2006**, *161*, 53.
- [16] D. Fischer, Y. Li, B. Ahlemeyer, J. Krieglstein, T. Kissel, *Biomaterials* **2003**, *24*, 1121.
- [17] H. J. G. Wolfgang Hartmann, *Biochim. Biophys. Acta* **1978**, *509*, 474.
- [18] J. H. Jeong, T. G. Park, *J. Controlled Release* **2002**, *82*, 159.
- [19] J. P. Leonetti, G. Degols, B. Lebleu, *Bioconjug. Chem.* **1990**, *1*, 149.
- [20] V. Toncheva, M. A. Wolfert, P. R. Dash, D. Oupicky, K. Ulbrich, L. W. Seymour, E. H. Schacht, *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj.* **1998**, *1380*, 354.
- [21] S. B. Hartono, W. Gu, F. Kleitz, J. Liu, L. He, A. P. J. Middelberg, C. Yu, G. Q. (Max) Lu, S. Z. Qiao, *ACS Nano* **2012**, *6*, 2104.

## ANNEXES

Annexe IV.1 : Pics de cœur XPS Ag3d et Au4f des nanoshells avant et après adsorption des polymères

# CONCLUSION GENERALE





L'étude exposée dans ce mémoire concerne la synthèse et la caractérisation de nanoparticules hybrides du type Au@SiO<sub>2</sub> pour des applications potentielles en nanomédecine. Elle représente surtout le tout premier travail de l'équipe dans le domaine des nanosciences et ouvre des perspectives prometteuses dans le contexte de la santé.

En effet, les recherches s'orientent de plus en plus vers l'élaboration de nanomatériaux multifonctionnels avec l'espoir d'améliorer l'efficacité des traitements actuels. Ainsi, les nanosystèmes étudiés présentent des architectures originales, de plus en plus complexes, avec des fonctionnalisations très variées qui offrent des combinaisons multiples de propriétés au sein d'un seul et unique objet. L'élaboration de ces nanostructures génère de multiples interfaces qui peuvent influencer les propriétés tant les phénomènes de surfaces sont importants à cette échelle. Une description physico-chimique détaillée est donc essentielle afin d'optimiser ces systèmes et ce, avant d'envisager une quelconque application.

Dans ce contexte, nous nous sommes engagés dans l'élaboration de nanoparticules cœur-coquille Au@SiO<sub>2</sub>. L'or, à l'échelle nanométrique, est caractérisé par le phénomène de résonance plasmon de surface à l'origine de propriétés optiques et photothermiques qui le rend particulièrement intéressant pour des traitements par photothermie. La silice, de son côté, peut être structurée à l'échelle nanométrique ; c'est un matériau facilement fonctionnalisable, qui améliore la stabilité chimique, et dans certains cas également la tenue mécanique des assemblages dans lesquels elle intervient. Ainsi, la combinaison particulière de ces deux matériaux pour la formation de nanostructures du type cœur-coquille a nécessité l'optimisation de chaque étape de synthèse avec le soutien d'une approche analytique multi-techniques sensible tant à l'aspect structural que chimique.

Dans un premier temps, les efforts ont été dirigés vers la synthèse du cœur du nanomatériau réalisée par un procédé de remplacement galvanique. Cette méthode a nécessité au préalable la mise en forme de nanoparticules d'argent, effectuée en une seule étape et basée sur la réduction chimique d'un précurseur par le tri-citrate de sodium qui joue également le rôle d'agent stabilisant. Les gabarits obtenus sont quasiment sphériques et présentent un diamètre moyen de (95 ± 15) nm.

Pour la réalisation des nanoshells d'or, l'influence des paramètres de synthèse sur la morphologie, sur la structure et sur l'état de surface des nanoparticules a été largement discutée. La réaction d'oxydo-réduction mise en jeu dans la constitution de ces nanoparticules conduit à la formation de sous-produits tels que le chlorure d'argent qui peut contaminer les nanostructures. Nous avons montré que la précipitation de ce sel à la surface des nanoparticules pouvait être contrôlée par la température mais également par la nature du précurseur d'or qui influence la cinétique de la réaction et permet de favoriser la précipitation d'AgCl en solution. La synthèse, réalisée à température ambiante, génère des nanoparticules creuses avec une surface relativement lisse et homogène. Après cette phase d'optimisation des paramètres de synthèse, la modulation des propriétés optiques des nanoparticules métalliques à la fenêtre biologique (650-900 nm) a ensuite été initiée. Comme nous l'avons vu dans

l'introduction bibliographique, l'utilisation des nanoparticules d'or en tant qu'agents photothermiques nécessite que leur résonance plasmon soit située dans cette gamme de longueur d'onde où la pénétration de la lumière à travers les tissus est maximale.

Ainsi, la variation de la concentration en sel d'or conduit à des nanostructures plus ou moins creuses ce qui a une influence directe sur les propriétés optiques avec un déplacement de la bande plasmon. Les conditions optimales semblent être atteintes pour un rapport  $3 < n(\text{Ag})/n(\text{Au}) < 5$  avec une résonance plasmon autour de 800 nm.

La nature chimique intrinsèque de ces nanostructures creuses a été sondée par spectroscopie photoélectronique à rayonnement X. L'étude des pics de cœur Ag3d et Au4f a mis en évidence la réaction d'oxydoréduction avec l'identification d'or métal, d'argent métal et d'argent (+I). Il est à noter que pour des concentrations en or importantes (au-delà des quantités stœchiométriques), la synthèse conduit à l'éclatement des nanoparticules pour lesquelles l'argent métal est toujours détecté. Cet écart à la stœchiométrie peut s'expliquer par la mise en place d'un phénomène de « dealloying » qui implique une corrosion plus sélective des atomes d'argent. A ce stade de l'étude, l'examen haute résolution de nanoparticules isolées a été entrepris afin de préciser l'arrangement chimique interne et la possibilité ou non de formation d'un alliage. Ce point particulier est en effet très controversé dans la littérature. Une étude spécifique par spectroscopie d'électrons Auger de la tranche de nanoparticules préalablement sectionnées par un faisceau ionique d'argon a été mise en place à cet effet. Les données enregistrées soulignent l'évidence même de la formation d'un alliage Ag/Au assez hétérogène avec un certain confinement de l'or sur la surface externe des nanoshells.

Au cours de cette première phase du projet, des nanoparticules d'or creuses ont été élaborées et affichent à priori des propriétés certaines et adaptées pour des applications potentielles en nanomédecine. En marge des analyses classiques effectuées par microscopie électronique, les potentialités des techniques d'analyse de surface (XPS, AES) ont offert une perception plus complète de ces objets.

Nous avons ensuite entrepris la croissance d'une coquille de silice mésoporeuse fonctionnalisée autour des cœurs (bi)métalliques préparés. L'objectif était de réaliser un matériau multifonctionnel combinant photothérapie et délivrance de médicaments thermo-contrôlée. Pour cela, la pré-formation d'une fine couche dense de silice a permis ensuite de contrôler plus facilement l'organisation et la structuration de la porosité de la coquille. Les caractéristiques texturales déduites des mesures par volumétrie d'adsorption d'azote ont confirmé la mésoporosité attendue ; la surface spécifique et le volume poreux importants démontrent le potentiel de ce réseau pour le confinement moléculaire.

La dernière étape de la procédure synthétique consistait en la fonctionnalisation de la coquille par des nanovalves constituées d'assemblages supramoléculaires du type [2]pseudorotaxanes ; le fonctionnement de tels ensembles supramoléculaires est basé sur la complexation/décomplexation de deux entités (moléculaire et macromoléculaire). Le greffage préliminaire d'un diaminoalcooxysilane a été validé avant la complexation avec le macrocycle (CB6) censé conduire à la fermeture des

nanovalves. Les images de microscopie électronique ont permis d'appréhender la densité de greffage en fonction des quantités mises en jeu et d'observer la dissolution d'une partie de la silice de la coquille en raison des conditions salines qui augmentent la solubilisation du CB6. Chacune des étapes de la fonctionnalisation a pu finalement être confirmée par la diminution concomitante de la surface spécifique et du volume poreux des nanoparticules.

Le greffage ainsi que la présence du macrocycle à la surface des nanoparticules ont été clairement révélés par la spectroscopie de photoélectrons sur la base de données référence enregistrées dans le cadre de ce travail de thèse. L'évaluation quantitative des espèces a cependant été difficile, les composantes (C1s et N1s par exemple) associées à chacune des entités constitutives des nanovalves étant relativement proches en énergie de liaison. Finalement, des analyses en RMN ont fortement contribué à appréhender l'organisation de ces assemblages supramoléculaires. L'étude préliminaire des nanovalves isolées en RMN des liquides a servi de référence pour la validation du phénomène de complexation. Les analyses des nanoparticules en RMN des solides ont tout d'abord confirmé les résultats XPS (présence des deux entités) et également révélé la présence de diaminoalcoxysilane sous forme libre et complexée à la surface des nanoparticules. Le fonctionnement de ces nano-systèmes nécessiterait donc selon ces dernières observations une phase d'optimisation en particulier de l'étape de greffage.

Le dernier volet de ce travail concernait l'élaboration d'une coquille hybride polymère/silice autour des nanoshells par une approche dite « bio-inspirée ». Cette réflexion constitue en quelque sorte une ouverture vers des systèmes à caractère plus biocompatible. Nous avons choisi pour cette étude deux polycations, la gélatine et la poly-L-lysine, qui se distinguent par la conformation et la structuration des chaînes polymères. Ces deux polymères ont tout d'abord été adsorbés à la surface des nanoshells comme l'ont confirmé les mesures DLS et les analyses en spectroscopie UV-visible. A travers quelques synthèses, nous avons ensuite pu souligner le rôle majeur des polymères dans la condensation silicique. Les coquilles hybrides élaborées sont différentes en fonction de la nature polymère ; une couche plus dense est obtenue avec la poly-L-lysine tandis la structure est nettement plus hétérogène avec la gélatine.

La nature hybride des couches élaborées a pu être confirmée par les analyses XPS. Alors que la présence de la gélatine semble évidente, l'identification de la poly-L-lysine a été relativement plus complexe en raison des similitudes des environnements avec ceux du polymère qui stabilise au départ les nanoshells (polyvinylpyrrolidone).

Pour valoriser ces nouveaux systèmes, une première série de tests *in vitro* a sondé l'impact et l'interaction des nanoparticules avec des cellules de type HaCaT. Cette étude nous a permis d'élargir notre vision ainsi que d'appréhender quelques notions de biologie qui sont indispensables pour le développement de particules pour la nanomédecine. Un effet cytotoxique plus marqué a été mis en évidence pour les nanoparticules constituées d'une couche hybride gélatine/silice. La biodégradabilité de ce polymère qui peut conduire à la libération de la silice pourrait expliquer l'origine de la cytotoxicité

observée. Enfin, les images de microscopie électronique en transmission (MET) ainsi que les analyses en spectrométrie de masse par torche à plasma (ICP-MS) ont en parallèle révélé que la poly-L-lysine avait tendance à favoriser une meilleure internalisation des nanoparticules par les cellules HaCaT.

La compréhension globale de l'ensemble de ces résultats nécessite dans un premier temps une caractérisation plus approfondie des nanoparticules en particulier dans le milieu biologique ainsi que des tests *in vitro* supplémentaires afin de confirmer les différentes tendances observées. A terme, l'idée serait d'évaluer l'influence de l'irradiation laser des nanoparticules sur la cytotoxicité des cellules exposées.

De façon plus générale, ce travail de thèse montre à quel point les connections entre les différentes communautés scientifiques sont bénéfiques dans la progression du savoir. Sans cette synergie, il semble aujourd'hui acquis que l'essor des nanosciences sera voué à ralentir.

Par ailleurs, cette étude nous a permis d'appréhender les nombreux effets qui peuvent intervenir lors de la synthèse et de la caractérisation et qui deviennent parfois prépondérants à l'échelle nanométrique. La reproductibilité des synthèses est un paramètre clé dans le développement de tels systèmes et nécessite une précision et une rigueur dans les procédures d'élaboration. Par ailleurs, la répétition des analyses en terme de caractérisation est essentielle pour une description représentative de l'échantillon. Enfin, concernant plus particulièrement l'XPS, la forme sous laquelle l'échantillon est analysé ainsi que son histoire sont des paramètres essentiels qui peuvent influencer significativement les résultats et doivent donc être considérés pour l'interprétation des données.

Des prolongements et perspectives à ce travail devraient intervenir tout logiquement tant sur le plan synthétique qu'analytique. La perspective de multifonctionnalité en relation avec une application biomédicale nécessitera des évolutions, ajustements ou nouvelles réflexions pour améliorer les nanomatériaux d'intérêt. L'ouverture engagée vers des voies biomimétiques est en ce sens une réelle avancée pour les systèmes or/silice et leur assimilation biologique.

D'un point de vue analytique, de nombreux tests sont encore en suspens et visent à améliorer la connaissance de la dépendance de la préparation des nanoparticules sur leur observation. Le mode de conditionnement avant analyse est par exemple une donnée à explorer dans le but d'uniformiser un tant soit peu l'interaction avec le milieu environnant (stabilisation de l'état de surface, minimisation de la contamination indésirable, ...).

Une nouvelle voie de traitements des données XPS pourra également être introduite pour l'analyse des biomatériaux pour lesquels la distinction des environnements chimiques est limitée avec les méthodes standards. L'analyse dite "des composantes principales" (*Principal Component Analysis method (PCA)*)<sup>[1]</sup> est un procédé mathématique statistique utile pour la description des fonctions chimiques dans le mélange d'agents biologiques, de polymères, ... Son application pour la reconnaissance des variations

de compositions des couches organiques à la surface des nanoparticules métalliques semble l'alternative à court terme la plus efficace à mettre en place.

Enfin, les propositions de nouveautés analytiques pour de tels nanosystèmes hybrides se doivent d'amener une plus-value à l'information extraite. Dans ce contexte, le nouvel équipement TOF-SIMS (Spectrométrie de masse d'ions secondaires à temps de vol) acquis récemment par l'équipe est incontestablement une alternative avec sa très grande sensibilité moléculaire. De nombreux exemples de la littérature rapportent le potentiel de cette technique pour déterminer la composition de surface de nanoparticules<sup>[2]</sup>. A la différence de la spectroscopie de photoélectrons XPS qui déduit indirectement la chimie des déplacements des énergies de liaison, la spectrométrie SIMS possède l'avantage de mesurer directement des fragments moléculaires identifiables en masse. Malheureusement et tout simplement parce que la spectrométrie SIMS dépend d'un processus de pulvérisation, elle endommage naturellement la surface des nanomatériaux et ce point sera à prendre en considération dans les interprétations à venir. Bien que de nombreux nanomatériaux et nanoparticules aient été examinés avec succès par le biais de la spectrométrie SIMS, il est bien établi maintenant que les nanostructures sont généralement pulvérisées à des taux différents de ceux des matériaux massifs<sup>[3]</sup>. La prise en main d'un tel soutien technologique nécessitera donc indéniablement des phases d'optimisation et d'adaptation à l'étude des systèmes nanométriques.

[1] K. M. Mc Evoy, M. J. Genet, C. C. Dupont-Gillain, *Anal. Chem.* **2008**, *80*, 7226.

[2] Y.-P. Kim, H. K. Shon, S. K. Shin, T. G. Lee, *Mass Spectrom. Rev.* **2015**, *34*, 237.

[3] M. P. Seah, *Surf. Interface Anal.* **2012**, *44*, 208.



# ANNEXES





Annexe A.1 : Tableau récapitulatif des produits utilisés

Nom	Abréviation	Formule brute	CAS	Pureté	Masse molaire (g/mol)	Fournisseur
Nitrate d'argent		$\text{AgNO}_3$	7761-88-8	$\geq 99,0\%$	169,87	Sigma Aldrich
Tri-citrate de sodium	cit	$\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	6132-04-3	$> 99\%$	294,10	Fischer Chemicals
Poly(vinyl-pyrrolidone)	PVP	$(\text{C}_6\text{H}_9\text{NO})_n$	9003-39-8		$\approx 10000$	Sigma Aldrich
Acide chloroaurique		$\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	16961-25-4	$\geq 99,9\%$	393,83	Sigma Aldrich
Hydroxyde de sodium		$\text{NaOH}$	1310-73-2		40	Sigma Aldrich
Chlorure d'argent		$\text{AgCl}$	7783-90-6	99,999%	143,32	Sigma Aldrich
Isopropanol		$\text{C}_3\text{H}_8\text{O}$	67-63-0	99,9 %	60,10	Sigma Aldrich
Hydroxyde d'ammonium		$\text{NH}_4\text{OH}$	1336-21-6	(28-30%)	35,05	Sigma Aldrich
Tétraéthoxysilane	TEOS	$\text{C}_8\text{H}_{20}\text{O}_4\text{Si}$	78-10-4	$\geq 99,0\%$	208,33	Sigma Aldrich
Bromure de cetyltriméthylammonium	CTAB	$\text{C}_{19}\text{H}_{42}\text{BrN}$	57-09-0	$> 99\%$	364,45	Acros Organics
N-(6-N-aminohexyl)-aminométhyl triéthoxysilane	greffon	$\text{C}_{13}\text{H}_{32}\text{N}_2\text{O}_3\text{Si}$	15129-36-9	95 %	292,49	ABCR
N,N-Diméthylformamide anhydre	DMF	$\text{C}_3\text{H}_7\text{O}$	68-12-2	$\geq 99,9\%$	73,10	Merck
Hydrate de Cucurbit[6]uril	CB6	$\text{C}_{36}\text{H}_{36}\text{N}_{24}\text{O}_{12} \cdot x\text{H}_2\text{O}$	80262-44-8		996,62	Sigma Aldrich
Gélatine (type A)	Gél		9000-70-8		50000-100000	Sigma Aldrich
Poly-L-lysine	PLL	$[(\text{C}_6\text{H}_{12}\text{ON}_2) \cdot \text{HBr}]_n$	25988-63-0		30000-70000	Sigma Aldrich
Silicates de sodium		27 % $\text{SiO}_2$ , 10% $\text{NaOH}$				Sigma Aldrich
Acide Chlorhydrique		$\text{HCl}$	7647-01-0	37 %	36,46	Sigma Aldrich



Annexe A.2 : Techniques de caractérisation

## Annexe A.2.i : Spectroscopie Photoélectronique à Rayonnement X

### I. Principe général de la photoémission

La Spectroscopie Photoélectronique à rayonnement X (XPS pour X-Ray Photoelectron Spectroscopy), appelée aussi ESCA (Electron Spectroscopy for Chemical Analysis) est une technique d'analyse d'extrême surface (de 5 à 10 nm) permettant d'explorer la structure chimique et électronique des matériaux. Elle est basée sur l'effet photoélectrique qui consiste en l'éjection d'un électron de cœur ou de valence d'un échantillon soumis à un rayonnement de photons X d'énergie  $h\nu$ . Les photoélectrons émis avec une énergie cinétique spécifique  $E_{cin}$  sont alors collectés et analysés. L'application de la loi de conservation de l'énergie permet de relier l'énergie cinétique  $E_{cin}$  à l'énergie de liaison  $E_L$  ou potentiel d'ionisation du photoélectron  $k$  par la relation :

$$h\nu + E_i^k(N) = E_f^k(N-1) + E_{cin}(k)$$

$$E_L(k) = E_f^k(N-1) - E_i^k(N) = h\nu - E_{cin}(k)$$

$E_i$  et  $E_f$  étant les énergies du système dans les états fondamentaux initial (neutre à  $N$  électrons) et final (ionisé à  $N-1$  électrons).

Le principe de la mesure consiste donc à déterminer les énergies cinétiques des photoélectrons émis pour en déduire les énergies de liaison. Généralement, on distingue les potentiels d'ionisation de cœur ( $\approx 30$  à  $1000$  eV) et de valence ( $\approx 0$  à  $30$  eV).

Après la photoionisation, le système final peut se relaxer selon deux processus complémentaires :

- La fluorescence X : un électron d'une orbitale plus externe comble la vacance laissée par le photoélectron et cette désexcitation se traduit par l'émission de rayons X
- L'effet Auger : un électron d'une orbitale plus externe comble la vacance laissée par le photoélectron et communique l'énergie libérée à un autre électron plus externe, éjecté à son tour de l'ion

### II. Expression de l'énergie de liaison

La dispersion des valeurs reportées pour les énergies de liaison des niveaux électroniques de composés semblables est souvent importante. Cette observation met en évidence la difficulté de mesurer des énergies de liaison absolues et montre l'intérêt de réaliser l'analyse d'échantillons de référence à partir du spectromètre et des conditions expérimentales utilisées dans le cadre de ce travail.

Dans le cas d'un solide conducteur, l'échantillon et le spectromètre sont en équilibre électrique ce qui entraîne l'égalisation de leurs niveaux de Fermi (Figure A.2.i.1). Le niveau du vide (noté N. V.) du spectromètre est séparé du niveau de Fermi (noté N. F.) de  $\Phi_{sp}$ , la fonction d'extraction du spectromètre.

Par convention, ce niveau N. V. correspond au zéro de l'échelle des énergies cinétiques  $E_{cin}$  dans le spectromètre.

Le principe de la mesure consiste donc à déterminer les énergies cinétiques  $E_{cin}$  des photoélectrons éjectés afin d'en déduire les énergies de liaison  $E_L$  suite à l'irradiation du matériau analysé. Le niveau de Fermi est utilisé comme niveau de référence pour la mesure des énergies de liaison dans le cas des solides, d'où:

$$E_L = h\nu - E_{cin} - \Phi_{sp}$$

En ce qui concerne les échantillons semi-conducteurs ou isolants, le problème est plus complexe<sup>[1-3]</sup>. Tout d'abord, les niveaux de Fermi de l'échantillon et du spectromètre ne coïncident pas nécessairement. De plus, la photoémission induit une charge de surface positive non homogène et non-compensée. Ainsi, à la sortie de l'échantillon, les électrons subissent l'influence du potentiel retardateur qui diminue leur énergie cinétique et élargit les pics. Un flux d'électrons de faible énergie (inférieure à 10 eV), produit par un canon (flood gun), permet d'uniformiser et de diminuer cette charge, mais le point de neutralisation est difficile à obtenir. Il s'en suit alors une différence entre la valeur d'énergie de liaison mesurée dans le spectromètre ( $E_L$  mesurée) et la valeur réelle dans l'échantillon ( $E_L$  exacte).

$$E_L(\text{mesurée}) = h\nu - E_{cin} - \Phi_{sp} \quad \text{dans le spectromètre}$$

$$E_L(\text{exacte}) = h\nu - E_{cin} - \Phi_e + \Phi^* \quad \text{par rapport à l'échantillon}$$

$$E_L(\text{exacte}) - E_L(\text{mesurée}) = \Phi^* + \Phi_{contact}$$

Avec  $\Phi^*$  l'énergie nécessaire pour amener l'électron du niveau du vide de l'échantillon au niveau du vide du spectromètre

Il est donc nécessaire d'opérer à une calibration interne. La raie 1s du carbone de contamination, toujours présent à la surface des échantillons, est souvent utilisée pour calibrer les spectres XPS, son énergie de liaison étant fixée à 285,0 eV.

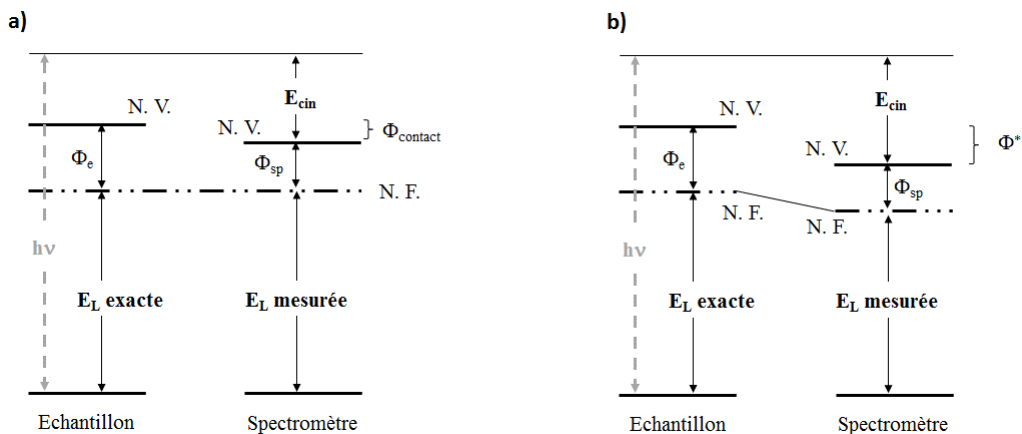


Figure A.2.i.1 : Diagrammes des niveaux d'énergie pour des expériences XPS (N.V. : niveau du vide, N.F. : niveau de Fermi) pour (a) un échantillon conducteur et (b) un échantillon isolant

### III. Facteurs influençant la position des raies

#### 1. Effets d'état initial

Les spectres XPS se présentent sous la forme de raies qui émergent d'un fond continu résultant des collisions inélastiques subies par certains électrons lors de leur trajet dans le solide. Chaque raie se caractérise par sa position ( $E_L$ ) sur l'échelle d'énergie, qui dépend des effets d'état initial et d'état final.

##### a. Le déplacement chimique : le modèle de potentiel

L'intérêt de la détermination de l'énergie de liaison d'un atome, dans une molécule donnée, réside dans la sensibilité de cette grandeur vis-à-vis de l'environnement chimique de l'atome considéré.

Lorsqu'un atome A est lié ou se trouve dans l'environnement d'un atome B plus électronégatif, la probabilité de présence des électrons autour de B augmente. Il est alors difficile d'extraire un électron de cœur de A retenu plus fortement par le potentiel positif créé autour de cet atome. Sur le spectre photoélectronique, un tel phénomène se traduit par un déplacement des positions des pics de cœur de A vers des positions énergétiques  $E_L$  plus élevées.

Les déplacements chimiques peuvent s'interpréter sur la base de propriétés liées à l'état initial en utilisant les modèles de potentiel. Dans ce cadre, l'expression commune pour traduire le déplacement chimique du niveau d'un atome A porteur d'une charge  $q_A \neq 0$  par rapport à sa position dans un atome A libre de charge nulle est :

$$\Delta E_L = kq_A + V_B$$

- le premier terme traduit la variation d'énergie potentielle électrostatique ressentie au niveau du cœur suite à une modification de la distribution électronique dans les couches de valence de l'atome A.

- le deuxième terme représente la différence dans le potentiel extra-atomique créé par les atomes voisins de l'atome A que l'on assimile à des charges ponctuelles ; on l'exprime souvent par :

$$V_B = e^2 \sum_{B \neq A} \frac{q_B}{r_{AB}}$$

Où  $r_{AB}$  est la distance entre l'électron de cœur de l'atome A et celui de l'atome B voisin.

Bien qu'ils ne considèrent que la polarisation dans l'état initial et ignorent les effets d'état final liés à la réorganisation du cortège électronique suite à l'éjection du photoélectron, ces modèles de potentiel ont été utilisés avec succès.

## b. Le couplage spin-orbite

A l'état initial, il existe également des interactions entre le moment cinétique intrinsèque de l'électron (le spin  $S$ ) et son moment orbital  $L$ . Ainsi, en termes de couplage de Russell Saunders, le moment angulaire total  $J$  d'un électron sur une couche donnée est défini par la relation :

$$J = L \pm S$$

Le couplage spin-orbite est donc à l'origine de l'éclatement des raies en deux composantes, sauf la raie  $s$  unique puisque  $L=0$  pour ce niveau. Les intensités de ces deux composantes sont fixées par la règle de multiplicité  $2J+1$ . Ainsi, pour le niveau de cœur  $2p$  de l'atome de silicium, la composante  $Si2p_{3/2}$  est théoriquement deux fois plus intense que la composante  $Si2p_{1/2}$  ; expérimentalement, ce rapport est voisin de 2. D'une manière générale, l'éclatement des pics d'un niveau électronique (différent du niveau  $s$ ) est une grandeur intrinsèque de l'élément étudié et unique pour chaque niveau électronique ; ainsi, l'éclatement entre les composantes  $Si2p_{3/2}$  et  $Si2p_{1/2}$  est généralement de 0,63 eV.

## 2. Effets d'état final

### a. La relaxation

Dans le cadre de l'approximation de Koopmans ou approximation des orbitales gelées, l'énergie de liaison ou potentiel d'ionisation correspond à la valeur opposée de l'énergie de l'orbitale dans l'état fondamental dont l'électron est extrait :

$$E_L(j) = -\varepsilon_j$$

Dans le cadre de cette approximation, on considère implicitement que les orbitales sont gelées, c'est-à-dire que la distribution spatiale des orbitales reste inchangée suite à la photoionisation.

En réalité, le système se relaxe vers un état plus stable. Cet effet d'état final correspond donc à une réorganisation des niveaux électroniques qui vise à diminuer l'énergie de l'état ionisé formé suite à la photoionisation. Le phénomène est suffisamment rapide ( $10^{-16}$  s) pour que l'électron émis « récupère » l'énergie gagnée. La relaxation est donc prise en compte dans la mesure. Ainsi, dans le cas d'un solide, l'expression détaillée de l' $E_L$  par rapport au niveau de Fermi s'écrit :

$$E_L = -\varepsilon - R_{intra} - R_{extra} - \Phi_{sp} - \Delta E_{relat.} - \Delta E_{corr.}$$

Avec

$R_{intra}$  la relaxation intra-atomique qui correspond à un réarrangement des électrons de l'atome lui-même

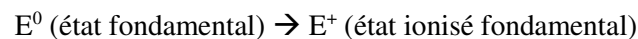
$R_{extra}$  la relaxation extra-atomique qui correspond à la contribution des électrons des atomes voisins

$\Delta E_{relat.}, \Delta E_{corr.}$  les différences d'énergie de corrections relativistes et de corrélation entre les états initial et final

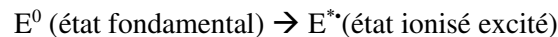
$\Phi_{sp}$  est la fonction de travail ou travail d'extraction du solide (différence entre le niveau du vide, référence pour l'obtention de la valeur théorique  $E$ , et le niveau de Fermi, zéro de l'échelle des énergies de liaison en XPS)

### **b. Raies additionnelles**

Lors du phénomène de photoionisation, le pic primaire (généralement le plus intense) correspond au passage d'un état fondamental neutre à un état fondamental ionisé :



Dans certains cas, des structures additionnelles sont observées. Elles apparaissent généralement à des énergies de liaison plus élevées que le pic primaire et correspondent au passage d'un état fondamental neutre à un état ionisé excité :



Parmi les raies additionnelles les plus fréquemment rencontrées, on trouve les structures en multiplet et les raies « shake up » ou « shake off » liées aux phénomènes intrinsèques d'état final.

#### **i. Structure en multiplet**

Dans le cas des systèmes à couches ouvertes, plusieurs états finals ont été caractérisés suite au couplage entre les électrons non appariés de valence et l'électron de cœur non apparié résultant de la photoémission. Cette interaction cœur-valence peut être relativement forte et complexifier le spectre. Ainsi, l'éjection d'un électron d'un niveau de cœur 2p de  $Fe^{3+}$  possédant des électrons d non appariés, conduit à deux états finals d'énergies différentes selon que le spin de l'électron célibataire de cœur est identique ou opposé aux électrons de valence non appariés.

#### **ii. Satellites multiélectroniques**

La photoémission d'un électron de cœur provoque un changement soudain du potentiel électrostatique ressenti par l'ensemble du cortège électronique externe. Il en résulte une relaxation de ces niveaux externes, pouvant conduire simultanément à l'émission de l'électron de cœur et à une excitation d'un électron de valence vers un niveau non occupé situé, dans l'état initial, au-dessus du niveau de Fermi (transition « shake up »). Lorsque l'électron de valence est éjecté dans le continuum, on parle alors de transition « shake off ». Dans ces deux cas, l'énergie  $\Delta E$  de transition (shake-up ou shake-off) concomitante à la photoémission est à retrancher de l'énergie cinétique du photoélectron qui est donc émis avec une énergie cinétique distincte de celle du pic principal (pic primaire) et inférieure de  $\Delta E$ .



### iii. Pics Auger

Il s'agit d'un processus de désexcitation qui suit la photoionisation primaire. Contrairement aux pics de photoionisation, l'énergie cinétique des raies Auger  $E_{\text{cin}}(\text{Auger})$  est indépendante de l'énergie  $h\nu$  des photons. Nous définissons alors une énergie de liaison apparente  $E_L^{\text{app}}$  à partir de la loi de conservation de l'énergie, celle-ci dépendant de l'énergie  $h\nu$  des photons dans le cas des raies Auger. De plus, leur déplacement chimique peut être plus important que celui des raies XPS primaires en raison de la formation d'un état final doublement ionisé, ce dernier pouvant être plus fortement affecté par les phénomènes de relaxation que l'état final simplement ionisé issu de la photoionisation primaire.

## IV. Facteurs influençant l'intensité des raies

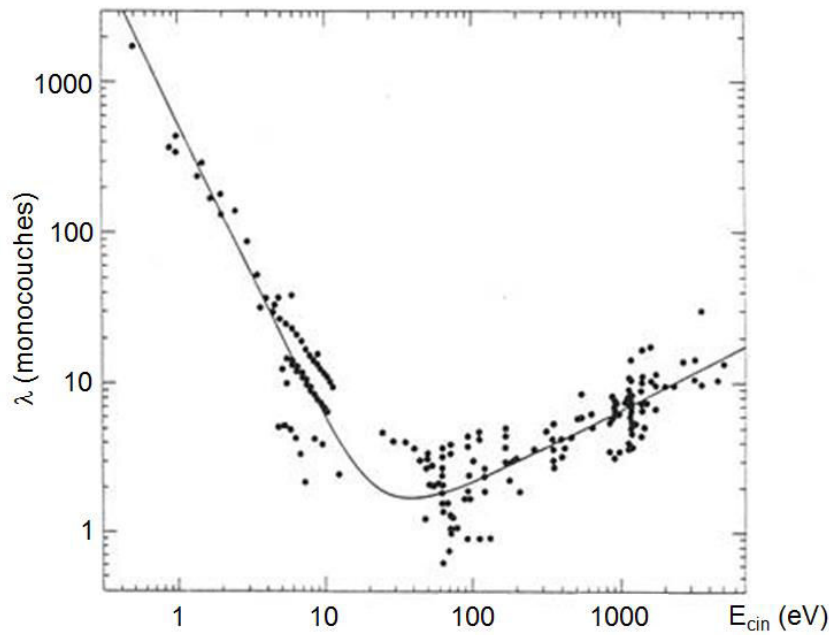
Indépendamment du flux incident de rayons X et de la concentration des éléments étudiés, l'intensité des raies photoélectroniques dépend essentiellement de deux facteurs : la section efficace de photoionisation  $\sigma$  et le libre parcours moyen  $\lambda$ . Ces paramètres difficiles à estimer numériquement font de la spectroscopie photoélectronique à rayonnement X une méthode d'analyse semi-quantitative.

### 1. La section efficace de photoionisation $\sigma$

La section efficace de photoionisation  $\sigma$  d'une orbitale donnée représente la probabilité qu'un électron associé à ce niveau soit éjecté sous l'impact d'un photon. Elle s'exprime en barns ( $1 \text{ barn} = 10^{-24} \text{ cm}^2$ ). Les sections efficaces ont été estimées pour la plupart des atomes par Scofield<sup>[4]</sup> par le biais de calculs Hartree-Fock-Slater relativistes pour les radiations  $K_\alpha$  du Mg (1254 eV) et de l'Al (1487 eV).

### 2. Le libre parcours moyen $\lambda$

Après la photoionisation, l'électron émis doit encore traverser une partie du solide avant d'être libéré dans le vide. Au cours de ce trajet, il est susceptible de subir des collisions inélastiques. Ainsi, on définit le libre parcours moyen  $\lambda$  comme la distance moyenne que peut parcourir le photoélectron dans la matière sans subir de telles collisions. L'intensité du signal photoélectronique est donc directement reliée à cette grandeur. Généralement, on estime que 95 % des photoélectrons atteignant le détecteur et donc contribuant aux pics du spectre (par opposition au fond continu) proviennent d'une épaisseur d'épaisseur égale à trois fois le libre parcours moyen  $\lambda$ . L'énergie cinétique du photoélectron et la nature de la cible influencent la valeur de  $\lambda$ .



**Figure A.2.i.2 : Variation du libre parcours moyen  $\lambda$  en fonction de l'énergie cinétique**

Un photoélectron émis d'un niveau de cœur, caractérisé par une énergie de liaison importante, possède une énergie cinétique moindre qu'un photoélectron issu d'un niveau de valence faiblement lié. Aussi, les électrons de valence proviennent d'une profondeur, typiquement 0 - 40 Å, sensiblement plus grande que les électrons de cœur (0 - 20 Å). Il s'ensuit que les bandes de valence sont plus représentatives du volume du composé, alors que les pics de cœur témoignent plutôt de la composition de l'extrême surface. Le libre parcours moyen  $\lambda$  conditionne donc la profondeur d'analyse et classe la spectroscopie de photoélectrons parmi les techniques de caractérisation de surface.

L'intervention d'un facteur  $\beta$ , qui rend compte du caractère anisotrope de la photoémission et d'un facteur H expérimental dépendant du spectromètre utilisé permet d'exprimer les rapports atomiques  $N_A/N_B$  de deux éléments en fonction des intensités de leur raies  $I_A$  et  $I_B$  :

$$\frac{N_A}{N_B} = \frac{I_A \sigma_B \lambda_B H_B \left[ 1 + \frac{\beta_B}{2} \left( \frac{3}{2} \sin^2 \theta - 1 \right) \right]}{I_B \sigma_A \lambda_A H_A \left[ 1 + \frac{\beta_A}{2} \left( \frac{3}{2} \sin^2 \theta - 1 \right) \right]}$$

Où  $\theta$  représente l'angle entre le flux de photons et la direction de l'analyseur

Pratiquement, l'utilisation de cette formule nécessite la connaissance de la relation entre le libre parcours moyen et l'énergie cinétique  $\lambda = (E_{\text{cin}})^n$  (la valeur de l'exposant n varie selon les auteurs entre 0,5 et 0,75<sup>[5,6]</sup>).

## V. Facteurs influençant la largeur des raies

La largeur  $\Delta E$  mesurée pour une raie de photoélectrons peut se décomposer de la façon suivante :

$$\Delta E = (\Delta E_{\text{appareil}}^2 + \Delta E_{\text{raie}}^2)^{1/2}$$

Où

$\Delta E_{\text{appareil}}$  est la contribution de l'appareillage à la largeur de la raie étudiée

$\Delta E_{\text{raie}}$  est la largeur naturelle de la raie de cœur étudiée.

### 1. Contribution de l'appareillage

Le terme  $\Delta E_{\text{appareil}}$  représente la contribution de d'appareillage à l'élargissement du pic dû à la fonction instrumentale et à la résolution de la source de rayons X.

### 2. Largeur naturelle de la raie

La largeur naturelle du niveau électronique dépendra quant à elle de :

L'état initial : la largeur pour un même niveau augmente avec le numéro atomique Z

Pour les éléments légers, elle ne vaut généralement que quelques dixièmes d'eV.

L'état final : la largeur d'une raie est liée au temps de vie moyen de l'état final par la relation d'incertitude d'Heisenberg :

$$\Delta E = \frac{\hbar}{\Delta t}$$

Lorsque la photoionisation affecte un niveau de cœur « profond », l'énergie totale du système à l'état final est très élevée et donc son temps de vie est très faible. En revanche, l'ionisation d'un niveau de cœur moins « profond » conduit à un état final moins instable, et donc son temps de vie est plus long. Dès lors, les raies associées à un niveau de cœur « profond » apparaîtront généralement avec une largeur sensiblement supérieure à celle des raies associées à un niveau de cœur moins « profond ».

Le terme  $\Delta t$  est en fait conditionné par la rapidité avec laquelle l'état final se désexcite par fluorescence X ou selon le phénomène Auger.

## VI. Spectres de valence

Le déplacement chimique des niveaux électroniques de cœur n'est que la conséquence de modifications de la structure électronique affectant les électrons de valence, lors de la formation de la liaison chimique. L'analyse des bandes de valence en XPS (énergies de liaison comprises entre 0 et 30 eV environ) permet d'approcher l'allure de la densité des états électroniques occupés du solide examiné. Généralement, c'est la forme du spectre plus que sa position exacte qui contient les informations les plus intéressantes ; la procédure la plus courante consiste lors de comparaisons (théorie–expérience par exemple) à ajuster les spectres par le premier maximum de la bande de valence.

Deux points méritent d'être signalés :

- les phénomènes de relaxation, de même que les effets multiélectroniques d'état final, sont moins importants que dans le cas des niveaux de cœur ;
- une véritable comparaison des spectres de valence expérimentaux avec les densités d'état théoriques nécessite une modulation par les sections efficaces de photoionisation qui sont variables en fonction de la nature de l'atome et de l'orbitale considérée.

La prise en compte des sections efficaces de photoionisation est le plus souvent effectuée dans le cadre du modèle de Gelius<sup>[7]</sup>. Cet auteur a montré qu'elles étaient proportionnelles au carré de l'intégrale de recouvrement entre les fonctions d'onde associées aux deux états final (ionisé) et initial (neutre). Moyennant certaines hypothèses on peut exprimer la section efficace  $\sigma_j$  associée à une orbitale moléculaire en une somme de termes purement atomiques  $\sigma_j^A$  :

$$\sigma_j = \sum_A \sigma_j^A$$

Il est encore possible sur la base du modèle LCAO d'exprimer chaque section efficace atomique en tenant compte des symétries :

$$\sigma_j^A = \sum_s P_{A,s}^j \sigma_{A,s}$$

$\sigma_j^A$  section efficace de l'atome A dans l'orbitale moléculaire j

$\sigma_{A,s}$  section efficace atomique de l'atome A de symétrie s (s= 1s, 2s, 2p, ...)

$P_{A,s}^j$  population exprimant la participation de l'orbitale de symétrie s concernant l'atome A dans l'orbitale moléculaire j

Soit encore :

$$\sigma_j = \sum_{A,s} P_{A,s}^j \sigma_{A,s}$$

De façon parallèle, on peut définir, dans le cas d'un solide, la section efficace en un point  $k$  comme :

$$\sigma_j(\vec{k}) = \sum_{A,S} P_{A,S}^j(\vec{k}) \sigma_{A,S}$$

Et finalement exprimer le DOS (*Density of States*) total sur la base des DOS partiels exprimés par type d'atome A et de l'orbitale o ( $DOS_{A,o}$ ) modulés par les sections efficaces de photoionisation variables selon l'atome A et l'orbitale o considérés ( $\sigma_{A,o}$ ) :

$$DOS_{total\ modul\acute{e}} = \sum_{A,o} \sigma_{A,o} \times DOS_{A,o}(E)$$

## VII. Traitement numérique des données XPS

Le spectre de photoélectrons enregistré sur un ordinateur se présente sous une forme digitalisée et échantillonnée. Il est la résultante d'opérations de convolution schématisée de la façon suivante :

$$\left( \begin{array}{c} \text{Fonction} \\ \text{d'excitation} \end{array} \right) \times \left( \begin{array}{c} \text{Distribution} \\ \text{des électrons} \\ \text{dans le solide} \end{array} \right) \times \left( \begin{array}{c} \text{Fonction pertes} \\ \text{d'énergie} \end{array} \right) \times \left( \begin{array}{c} \text{Fonction} \\ \text{spectromètre} \end{array} \right) = \left( \begin{array}{c} \text{Spectre} \\ \text{théorique} \end{array} \right)$$

Les méthodes de traitement numérique ont pour but de restituer avec le plus de précision possible la fonction de distribution des électrons dans le solide, qui contient les informations physiques intéressantes.

Différentes procédures peuvent être distinguées :

- opération de lissage
- soustraction du bruit de fond
- convolution ou résolution d'un spectre en plusieurs composantes
- comparaison, addition, soustraction de spectres expérimentaux
- calcul de dérivées

Afin d'extraire la contribution réelle d'un signal, il faut toujours éliminer les contributions parasites dues aux pertes d'énergie inélastiques des électrons dans le solide ; dans ce but, un bruit de fond (proportionnel à la surface) a été soustrait dans la plupart des cas, conformément à la proposition faite initialement par Shirley<sup>[8]</sup>.

Ces opérations ayant été réalisées, l'exploitation finale d'un spectre requiert, lorsqu'il existe plusieurs composantes qui se recouvrent, l'estimation des caractéristiques de chacune d'elles (intensité, énergie...).

La procédure générale consiste au départ :

- à préciser la nature de la fonction décrivant chaque composante ainsi que les paramètres associés (position énergétique, largeur de bande à mi-hauteur dans le cas de doublet, écart entre les composantes du doublet) ;
- à définir le nombre de composantes ;
- à effectuer une synthèse de ces pics pour obtenir un spectre recomposé qui sera comparé à la courbe expérimentale.

Dans cette étude, la fonction représentative de chaque composante correspond à une combinaison de fonctions à caractère gaussien, dérivée de la fonction du spectre, et à caractère lorentzien venant du processus photoélectronique lui-même (largeur naturelle du niveau associé au temps de vie de l'état ionisé) ; un mélange 70 % de fonction gaussienne, 30 % de fonction lorentzienne a été adopté conformément aux tests réalisés au laboratoire. L'ajustement entre le spectre synthétisé et la courbe expérimentale s'effectue par une méthode des moindres carrés.

Le choix au départ de différents paramètres tels la largeur de bande à mi-hauteur, l'écart entre les composantes des doublets (*etc.*) s'effectue en fonction de valeurs moyennes existant pour chaque type d'atome dans un environnement donné. Par ailleurs, le nombre de composantes peut être guidé par l'allure de la courbe expérimentale, selon le principe simple qui consiste à traduire cette donnée avec le nombre minimum de composantes.

L'utilisation du logiciel Casa XPS© facilite l'ensemble de ces procédures.

- [1] R. T. Lewis, M. A. Kelly, *J. Electron Spectrosc. Relat. Phenom.* **1980**, 20, 105.
- [2] T. E. Madey, C. D. Wagner, A. Joshi, *J. Electron Spectrosc. Relat. Phenom.* **1977**, 10, 359.
- [3] Y. Mizokawa, H. Iwasaki, R. Nishitani, S. Nakamura, *J. Electron Spectrosc. Relat. Phenom.* **1978**, 14, 129.
- [4] J. H. Scofield, *J. Electron Spectrosc. Relat. Phenom.* **1976**, 8, 129.
- [5] J. J. Quinn, *Phys. Rev.* **1962**, 126, 1453.
- [6] C. J. Powell, *Surf. Sci.* **1974**, 44, 29.
- [7] U. Gelius, *Electron Spectroscopy*, D.A. Shirley (ed), **1972**.
- [8] D. A. Shirley, *Phys. Rev. B* **1972**, 5, 4709.

## Annexe A.2.ii: La Résonance Magnétique Nucléaire

La RMN a été utilisée dans ce travail afin d'aller plus loin dans la caractérisation physico-chimique des nano-objets synthétisés. Cette technique permet en effet d'apporter des informations complémentaires à l'XPS notamment concernant les interactions intermoléculaires mises en jeu dans la formation des nanovalves.

### I. Principe général

La RMN est une technique non destructive, extrêmement riche et puissante qui permet de sonder la matière et d'extraire des informations structurales très locales sur les matériaux étudiés. Elle consiste à mesurer le comportement de l'aimantation nucléaire plongée dans un champ magnétique statique intense  $\vec{B}_0$  en réponse à un champ radio fréquence  $\vec{B}_1(t)$  plus faible. Les noyaux sont caractérisés par un moment cinétique de spin  $\vec{I}$  et un moment magnétique de spin  $\vec{\mu}$  qui sont reliés par la relation :

$$\vec{\mu} = \gamma \vec{I}$$

dans laquelle  $\gamma$  est le rapport gyromagnétique caractéristique du noyau considéré

Seuls les noyaux de spin  $I$  non nul peuvent être étudiés en RMN, les plus courants étant ceux de spin  $1/2$  comme  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{31}\text{P}$ ,  $^{29}\text{Si}$ .

Lorsqu'une population de spins nucléaires  $\vec{I}$  est placée dans un champ magnétique statique  $\vec{B}_0$ , le système est soumis à différentes interactions qui peuvent être externes (champ magnétique appliqué) ou internes (champ locaux dans l'échantillon). Afin de décrire ces couplages, entre les spins nucléaires et leur environnement, le concept d'Hamiltonien de spins nucléaire,  $\hat{H}$ , a été introduit par Abragam [réf]. Cet hamiltonien se décompose en deux termes : un terme relatif aux couplages externes et un terme relatif aux couplages internes :

$$\hat{H} = \hat{H}_{ext} + \hat{H}_{int}$$

#### 1. Couplage externe : effet Zeeman

En l'absence de champ magnétique, l'aimantation nucléaire est nulle et de ce fait l'ensemble des niveaux énergétiques ont la même valeur. En présence d'un champ magnétique statique  $\vec{B}_0$ , le couplage entre le moment magnétique du noyau et le champ magnétique  $\vec{B}_0$ , appelée effet Zeeman, implique une levée de dégénérescence du niveau d'énergie fondamental en  $2I+1$  niveaux séparés en énergie par :

$$\Delta E = \gamma \hbar B_0$$

Les états de spin sont donc quantifiés et les valeurs possibles du nombre quantique magnétique de spin  $m_I$  sont comprise entre  $-I$  et  $+I$  variant par pas d'une unité. Ainsi, pour un noyau de spin  $1/2$ , il y a deux états possibles avec  $m_I = +1/2$  (parallèle au champ  $\vec{B}_0$ , position la plus stable) et  $m_I = -1/2$  (antiparallèle au champ  $\vec{B}_0$ , position la moins stable).

Ainsi, la spectroscopie RMN consiste en l'observation des transitions entre les différents niveaux d'énergie possible qui ne peuvent être observées que si le système obéit à la loi de Bohr ( $\Delta E = h\nu$ ) et que  $\Delta m = \pm 1$ . Cette transition se traduit par l'observation d'une seule raie de résonance à la fréquence de résonance du noyau considéré  $\omega_0$ , appelé fréquence de Larmor, qui est proportionnelle au champ magnétique appliqué :

$$\omega_0 = 2\pi\nu = \gamma B_0$$

L'acquisition de signaux RMN nécessite également l'application d'un champ radiofréquence  $\vec{B}_1$  qui va aussi interagir avec les spins nucléaires. L'hamiltonien relatif aux couplages externes s'écrit donc :

$$\hat{H}_{ext} = \hat{H}_0 + \hat{H}_1$$

## 2. Principe d'une expérience RMN

Une expérience RMN comprend trois étapes principales (Figure A.2.ii.1) :

1. L'équilibre : en l'absence de perturbation, les spins nucléaires précessent autour de l'axe du champ magnétique  $\vec{B}_0$  à la fréquence de Larmor  $\omega_0$ . La répartition des spins sur les  $2I+1$  niveaux d'énergie obéit à la distribution statistique de Boltzmann et est à l'origine d'une aimantation résultante  $M_0$ , colinéaire à l'axe directeur de  $\vec{B}_0$ .
2. La perturbation : l'utilisation d'un champ alternatif radiofréquence  $\vec{B}_1$  qui oscille à la fréquence  $\omega_0$  dans un plan perpendiculaire à  $B_0$  induit une transition énergétique entre les niveaux. Les populations de spins parallèles et antiparallèles tendent à s'égaliser. L'application de ce champ magnétique radiofréquence pendant une durée  $\tau$  perturbe l'aimantation nucléaire macroscopique (colinéaire à  $B_0$  au départ) qui s'écarte de sa position d'équilibre d'un angle  $\theta = \gamma B_1 \tau$  selon l'axe  $y'$ . Ainsi, il est nécessaire de définir un nouveau référentiel contenant le champ  $B_1$  ( $x', y', z'$ ) tel que les axes  $z$  et  $z'$  soient confondus et que le nouveau repère tourne à la vitesse  $\omega_0$  autour de l'axe  $z$ .
3. La relaxation : lorsque le champ magnétique  $\vec{B}_1$  est coupé, le système tend progressivement à retrouver son état d'équilibre initial.



Ainsi, le signal mesuré décroît sous l'effet de deux mécanismes de relaxation :

- La relaxation longitudinale  $T_{1z}$ , dont l'évolution du signal suit une exponentielle croissante selon l'axe  $z$ . Elle est liée à la dynamique rapide de l'environnement moléculaire du noyau considéré et son étude donne des informations sur les mouvements moléculaires à l'échelle de la nanoseconde.
- La relaxation transversale  $T_2$  qui traduit l'évolution de l'aimantation par rapport à l'axe  $y$  et suit la forme d'une cosinusoïde d'argument  $(\omega_0 t)$ , convoluée par une exponentielle décroissante. Ce phénomène constitue le signal de précession libre des spins ou FID (Free Induction Decay). Elle donne des informations sur la dynamique lente des molécules ou de leur assemblage (à l'échelle de la microseconde ou de la seconde).

Le passage du domaine temporel au domaine fréquentiel est assuré par la transformée de Fourier qui conduit à l'obtention d'un spectre composé de raies dont la position en fréquence rend compte des couplages internes électriques et magnétiques des noyaux, et dont la largeur est associée à la dynamique et à l'orientation des molécules.

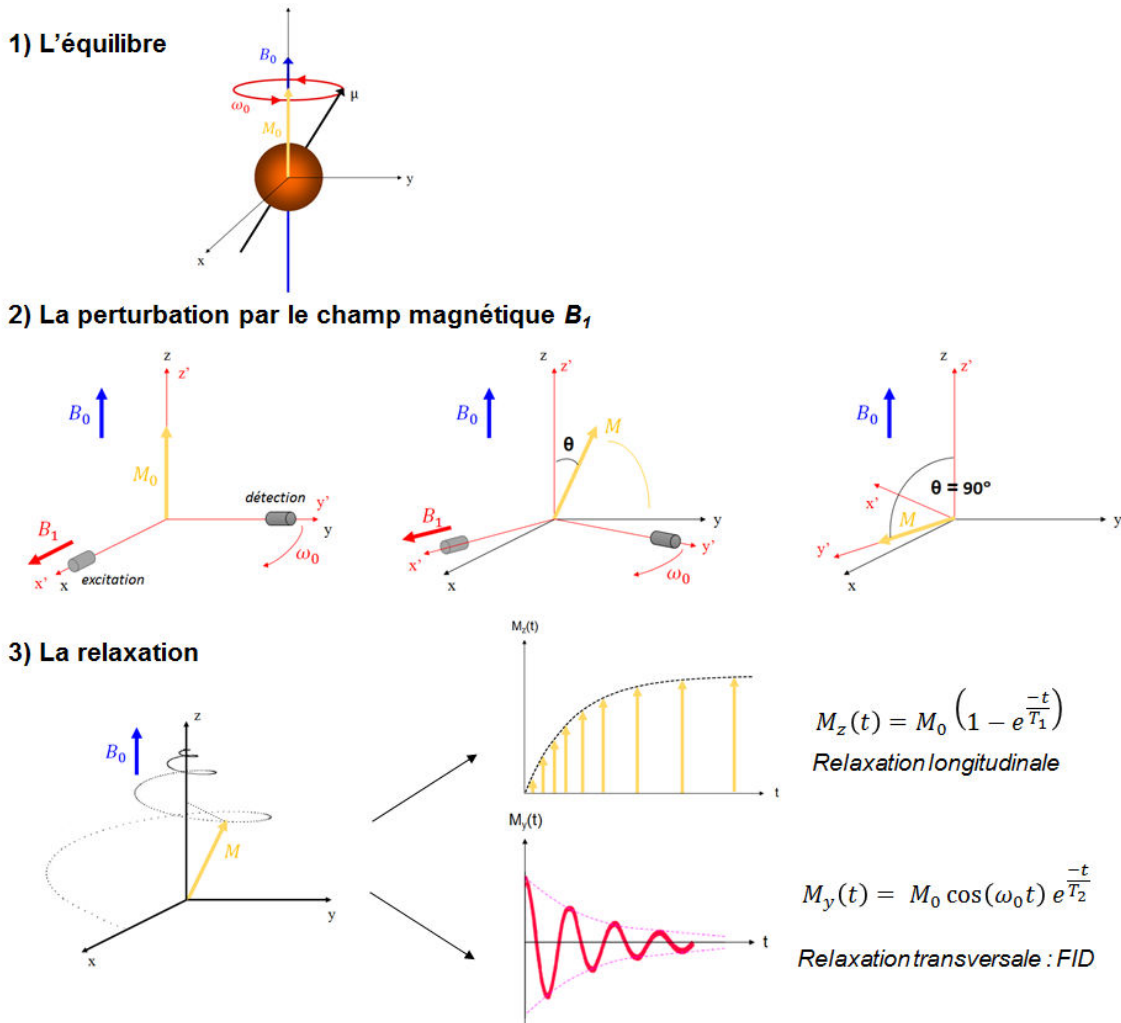


Figure A.2.ii.1 : Représentation des trois étapes principales de l'expérience RMN :  $x$ ,  $y$ , et  $z$  représente le référentiel du laboratoire et  $x'$ ,  $y'$  et  $z'$  le référentiel tournant)

### 3. Les couplages internes

L'effet Zeeman domine généralement mais d'autres interactions interviennent dans la description du système. Ainsi, ces couplages internes sont traités comme des perturbations des niveaux d'énergie Zeeman. Ils décrivent les interactions entre les moments magnétiques nucléaires et les champs locaux présents dans l'échantillon. L'hamiltonien  $\hat{H}_{int}$  se décompose de la manière suivante :

$$\hat{H}_{int} = \hat{H}_{\sigma} + \hat{H}_J + \hat{H}_D + \hat{H}_Q$$

- L'hamiltonien  $\hat{H}_{\sigma}$  représente le couplage entre le moment magnétique nucléaire et le champ magnétique local induit par la circulation des électrons autour du noyau sous l'effet du champ magnétique statique. Ce champ local contribue au champ total ressenti par le noyau ce qui implique que les fréquences de résonance sont différentes en fonction de l'environnement électronique du noyau considéré, et donc de la nature du groupement chimique auquel il appartient. Ce phénomène d'écrantage du nuage électronique est connu sous le nom d'anisotropie de déplacement chimique. Il dépend du champ  $B_0$  donc pour avoir une mesure indépendante du champ magnétique, et donc de l'appareillage utilisé, on exprime une différence en ppm, partie par millions par rapport à la valeur exacte de fréquence de résonance d'un composé de référence, le tétraméthylsilane (TMS,  $\text{Si}(\text{CH}_3)_4$ ) dans le cas du  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  et  $^{29}\text{Si}$  par exemple. C'est ce petit écart qui va permettre de caractériser l'environnement des noyaux étudiés.

$$\delta = \frac{(\nu_{éch} - \nu_{réf})}{\nu_{réf} \times 10^6}$$

- L'hamiltonien  $\hat{H}_J$  décrit les interactions spin-spin indirectes (appelées couplages J ou couplage scalaire) entre les moments magnétiques des noyaux d'une même molécule, via les électrons de liaison. Ces couplages J sont indépendants de la valeur du champ  $B_0$  et peuvent être homo ou hétéronucléaires. Ce couplage est responsable des structures en multiplets observées en RMN des liquides. En RMN du solide, ce couplage est négligé car il met en jeu des énergies beaucoup plus faible que les autres interactions (Tableau A.3.ii.1)
- L'hamiltonien  $\hat{H}_D$  exprime l'interaction directe entre deux dipôles magnétiques  $\mu_A$  et  $\mu_B$  associés respectivement aux noyaux A et B voisins dans l'espace. Cette interaction, aussi appelée couplage dipolaire, est indépendante de  $B_0$  et décroît rapidement ( $1/r^3$ ) avec la distance  $r_{AB}$ . Elle peut se produire entre deux noyaux de même nature (couplage homonucléaire) ou de nature différente (couplage hétéronucléaire).
- L'hamiltonien  $\hat{H}_Q$  n'existe que pour les noyaux de spin nucléaire supérieur à 1/2 qui possèdent un moment électrique quadripolaire  $eQ$  dû à une distribution non sphérique des charges autour du noyau. Ce moment électrique quadripolaire interagit avec le gradient de champ électrique local présent autour du noyau ce qui aura pour effet d'affecter les niveaux d'énergies des spins nucléaires.

Ces différentes interactions intervenant dans les coupages internes ne sont pas équivalentes et dépendent du noyau étudié et de la nature de l'échantillon. Les ordres de grandeur de ces interactions sont donnés en Hertz dans le tableau suivant (Tableau A.3.ii.1) pour des échantillons dits « liquides » (isotropes) et « solides » (couplages internes anisotropes).

**Tableau A.2.ii.1 : Ordre de grandeur des hamiltoniens (en hertz) pour des systèmes dits « solides » et « liquides »**

	Liquide (Hz)	Solide (Hz)
Zeeman	$10^8$	$10^8$
Spin-spin direct (D)	0	$10^4$
Spin-spin indirect (J)	$10^2$	$10^2$
Blindage électronique ( $\sigma$ )	$10^4$	$10^4$
Quadripolaire (Q)	0	$10^6$ (si $I > 1$ ) ou 0 (si $I < 1$ )

Un système est qualifié d'isotrope si ses propriétés physico-chimiques ne dépendent pas de la direction de mesure ; les mouvements moléculaires sont très rapides et toutes les orientations de la molécule sont équiprobables. C'est le cas des liquides, pour lesquels les temps de relaxation sont longs ( $\approx 4$ s ou plus) et les signaux RMN sont détectés sur une petite fenêtre de fréquences (entre 5 et 25 kHz à 500kHz).

Un système est qualifié d'anisotrope si à l'inverse ses propriétés physico-chimiques dépendent de la direction de mesure. Les mouvements moléculaires sont plus lents et certaines directions sont privilégiées. C'est le cas des monocristaux ou encore des poudres. Dans ce cas, les temps de relaxation sont beaucoup plus courts ( $\approx 1$ ms) et les signaux RMN peuvent s'étendre sur une large fenêtre de fréquences (de 25 à 500 kHz à 500 MHz).

Dans le cadre de cette étude, les nanoparticules ont été analysées à l'état solide qui constitue donc un milieu anisotrope soumis à l'ensemble des interactions vues précédemment (sauf interaction quadripolaire). Ces interactions magnétiques internes vont nous renseigner sur la structuration des systèmes.

## II. Techniques essentielles en RMN des solides

Le spectre RMN d'un échantillon solide statique en poudre est un spectre large, somme des contributions de l'ensemble des cristallites du fait de l'anisotropie du milieu (Figure A.3.ii.2).

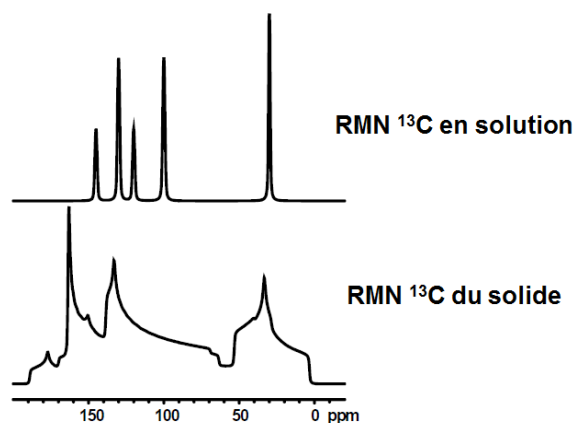


Figure A.2.ii.2 : Comparaison d'un spectre RMN  $^{13}\text{C}$  en solution et en solide d'une espèce chimique

De ce fait, l'étude RMN d'échantillons solides nécessite l'utilisation de techniques supplémentaires développées afin d'éliminer cette anisotropie et donc d'obtenir un spectre résolu.

### 1. La rotation à l'angle magique

Le couplage dipolaire qui correspond à l'interaction directe entre les dipôles magnétiques à travers l'espace devient prépondérant en RMN des solides. Il possède une dépendance angulaire en  $(3\cos^2\theta - 1)$  par rapport au champ magnétique statique.

L'interaction d'anisotropie de déplacement chimique, plus faible, contient également ce terme. La rotation très rapide de l'échantillon à  $\theta = 54,74^\circ$ , appelé angle magique (Magic Angle Spinning, MAS) par rapport au champ magnétique permet de moyenniser les interactions anisotropes (Figure A.3.ii.3) et donc de se rapprocher des conditions de la RMN des liquides.

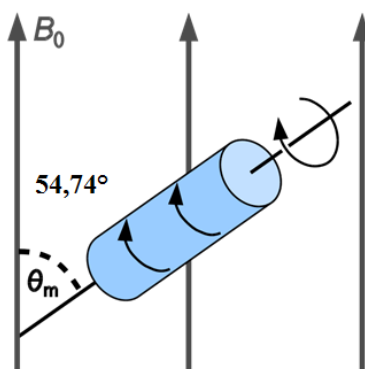


Figure A.2.ii.3 : Schématisation de la rotation à l'angle magique ( $\theta=54,74^\circ$ ) d'un rotor en RMN des solides

## 2. La polarisation croisée

La polarisation croisée (Cross Polarization, CP) est utilisée afin d'augmenter la sensibilité en mesurant le signal d'un noyau peu abondant (typiquement  $^{13}\text{C}$  ou  $^{29}\text{Si}$ ) par l'intermédiaire d'un noyau abondant voisin (typiquement  $^1\text{H}$  ou  $^{19}\text{F}$ ). Il s'agit d'exciter le noyau abondant et de faire un transfert de polarisation, via le couplage dipolaire, vers le noyau rare que l'on veut observer. Ce transfert de polarisation est d'autant plus efficace que les distances sont courtes et que la liaison est rigide entre les deux noyaux. Cette technique n'est donc pas quantitative. Elle permet non seulement un gain en sensibilité important, mais permet aussi de voir si des interactions existent entre ces types de noyaux.

## 3. Le découplage hétéronucléaire

Le découplage proton permet également augmenter l'intensité du signal obtenu par la suppression de l'interaction spin-spin indirects J entre les moments magnétiques des noyaux. Ainsi chaque type d'atome apparaît sous la forme d'un singulet sur le spectre RMN.

### III. Conditions de travail

L'ensemble des analyses RMN ont été réalisées en collaboration avec le Laboratoire de Physico-Chimie des Nano-Objets (LPCNO) et le Laboratoire de Chimie de Coordination (LCC) de Toulouse. Les expériences RMN  $^1\text{H}$  1D et 2D en solution ont été réalisées sur un spectromètre Bruker Avance 500 MHz équipé d'une sonde triple résonance 5 mm (TBI  $^1\text{H}$ ,  $^{31}\text{P}$ , BB). Les séquences 2D ROESY ont été enregistrées avec un temps de mixage de 300 ms. L'ensemble des mesures de diffusion ont été effectuées par l'acquisition de séquences de type DOSY (temps de relaxation a été ajusté à 3 s). Les expériences 2D DOSY ont été traitées avec l'application « eddosy » du logiciel Bruker TopSpin.

Les expériences en RMN des solides ont été réalisées sur un spectromètre Bruker Avance 400 équipé de sondes de 4 mm et 1,3 mm. Une rotation des échantillons à l'angle magique à des vitesses de 10 kHz et 60 kHz a été appliquée. Les expériences  $^1\text{H}$  MAS et  $^{29}\text{Si}$  MAS pulsées ont été enregistrées avec des temps de contact de 5 s et 60 s respectivement. Les spectres CP-MAS  $^{13}\text{C}$  et  $^{29}\text{Si}$  ont été enregistrés avec des temps de relaxation de 3 s et des temps de contact de 2 ms et 3 ms respectivement. L'acquisition des spectres  $^{13}\text{C}$  et  $^{29}\text{Si}$  est effectuée avec découplage des protons. Les expériences MAS 2D  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  à double quanta ont été enregistrées via la séquence back-to-back (BABA) à une fréquence de rotation de 60kHz. L'ensemble des déplacements chimiques sur les spectres RMN  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  et  $^{29}\text{Si}$  sont relatifs au TMS.