AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4
Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10
http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php
http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm

THÈSE

Présentée pour l'obtention du titre de :

DOCTEUR de L'UNIVERSITÉ DE LORRAINE

Spécialité : Chimie du Solide

Par :

Pierre Venturini

Synthèse et caractérisation de nanomatériaux hybrides innovants pour le biomédical

Soutenance publique le 15 Décembre 2017 à Nancy

Composition du jury :

Rapportrices :

M[me] Nadine Millot	Professeur – Université de Bourgogne
M[me] Fayna Mammeri	Maître de Conférences HdR – Université Paris Diderot

Examinateurs :

M[me] Laurence Motte	Professeur – Université Paris 13
M. Jean-Luc Six	Professeur – Université de Lorraine
M. Hervé Martinez	Professeur – Université de Pau et des Pays de l'Adour

Directeur et encadrants :

M. Franck Cleymand	Maître de Conférences HdR – Université de Lorraine
M. Jean-Charles Dupin	Maître de Conférences HdR – Université de Pau et des Pays de l'Adour
M[me] Solenne Fleutot	Maître de Conférences – Université de Lorraine

Institut Jean Lamour – UMR 7198 – Département N2EV – Équipe 401 DOLPHIN
Campus Artem - 2 Allée André Guinier - BP 50840 - 54011 Nancy Cedex

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier mesdames Nadine Millot et Fayna Mammeri pour avoir accepté de rapporter ce travail de thèse, ainsi que madame Laurence Motte, monsieur Jean Luc Six et monsieur Hervé Martinez pour avoir accepté de l'examiner.

Je veux également remercier Solenne Fleutot, Franck Cleymand et Jean-Charles Dupin qui m'ont encadré tout au long de ces trois ans et tout particulièrement Solenne pour les jours (et les nuits) de travail lors de la phase finale de correction du manuscrit.

Au cours de ce travail, j'ai été amené à utiliser un grand nombre de techniques pour lesquelles j'ai eu la chance d'avoir l'aide et le soutien de nombreuses personnes faisant partie du laboratoire.

Je remercie Sylvie Migot et Jaafar Ghanbaja qui ont assuré ma formation et m'ont fait profiter de leur expertise en microscopie électronique à transmission. Je remercie également Thomas Hauet, Stéphane Suire, Crosby Chang et Arnaud Hillion qui m'ont souvent aidé dans la réalisation ou dans l'interprétation des mesures magnétiques effectuées sur mes échantillons. Je pense également à Bernard Malaman qui a réalisé pour moi les mesures en spectroscopie Mössbauer ainsi qu'à Lionel Aranda qui m'a formé et conseillé pour la réalisation de mes mesures ATG. Je remercie Didier Rouxel qui m'a donné accès à l'appareil de mesure DLS ainsi que Camille Thevenot qui m'a appris à l'utiliser. Je n'oublie pas Sébastien Diliberto ainsi que Pascal Boulet qui m'ont donné l'accès et formé à l'utilisation des appareils de DRX de l'institut. Enfin, je remercie Sébastien Fontana qui a réalisé pour moi des mesures en BET sur mes échantillons.

Au cours de cette thèse, il m'a de nombreuses fois été donné de travailler non seulement avec des chercheurs de l'institut mais également avec des autres laboratoires. En premier lieu je veux bien sûr remercier à nouveau ici Hervé et Jean-Charles de l'institut IPREM de Pau qui ont non seulement rendu ma thèse possible en acceptant de la co-diriger et de la co-financer et m'ont également accueillis dans leur laboratoire pour y réaliser des mesures en XPS.

Je tiens aussi à remercier Cédric Carteret et Arnaud Di Bitteto du laboratoire LCPME qui m'ont ouvert leur porte et aidé à la réalisation de mesures en spectroscopie infrarouge et Raman.

Je remercie également Astrid Pinzano et Christel Henrionnet de l'institut IMOPA sans qui les tests en milieu biologique sur mes échantillons n'auraient pas été possibles.

Je veux de plus remercier Sébastien Pillet et El-eulmi Bendeif du laboratoire CRM2 qui ont réalisé pour moi des mesures en PDF.

Pendant la dernière année de ma thèse, j'ai également pu replonger dans le monde de la chimie organique pour la fonctionnalisation de mes nanoparticules. Je remercie Jean-Jacques Robin et Vincent Lapinte de l'ICGM qui m'ont accueilli à Montpellier pour la synthèse et le greffage de polymères innovants. Je remercie également Jean-Luc Six du LCPM qui m'a accueilli dans son laboratoire nancéen et aidé pour la modification des molécules greffées en surface de mes nanoparticules.

Dans un autre registre, je tiens ici à remercier mes anciens camarades de bureau : Charles, Anne-Sophie, Pascale et Allan avec qui j'ai pu passer dans la bonne humeur les deux premières années de ma thèse. Je salue et je remercie également tous les autres camarades doctorant (Joseph, Benjamin, Nicole, Christophe, Aurélien, Hiba, Fahad, Claudia…) qui ont fait régner une ambiance joyeuse sur le laboratoire pendant ces trois ans.

Enfin, je veux remercier ici mes parents ainsi que ma compagne Alexandrine pour leur soutien indéfectible et l'aide qu'ils ont pu m'apporter tout au long de ce périple.

Table des matières :

Introduction générale……..1

Chapitre 1 : État de l'art

1.1 Structures cristallines et propriétés magnétiques des oxydes de fer de type spinelle ……..9
1.1.1 Structures cristallines..... 10
1.1.2 Propriétés magnétiques..... 13

1.2 Principales méthodes de synthèse des nanoparticules de magnétite et maghémite ……..……..……...21
1.2.1 Synthèse hydrothermale 21
1.2.2 Synthèse en microémulsion..... 22
1.2.3 Décomposition thermique 22
1.2.4 Méthode polyols..... 22
1.2.5 Procédé Sol-Gel..... 23
1.2.6 Synthèse par co-précipitation 25

1.3 Principales méthodes de lavage et de sélection de taille des nanoparticules..…29
1.3.1 Dialyse..... 29
1.3.2 Centrifugation..... 30
1.3.3 Centrifugation avec gradient de viscosité..... 30
1.3.4 Ultrafiltration..... 31
1.3.5 Précipitation sélective en taille 32
1.3.6 Extraction 32
1.3.7 Séparation magnétique 33

1.4 Stabilisation des nanoparticules de magnétite et maghémite en solution……33
1.4.1 Comportement en solution des nanoparticules d'oxyde de fer..... 33
1.4.2 Principales méthodes de stabilisation..... 34
1.4.3 Stabilisation par des ligands citrates..... 35

1.5 Bilan……..…37

Références bibliographiques – Chapitre 1

Chapitre 2 : Synthèse et caractérisation des références

2.1. Synthèse des nanoparticules de référence……...45
2.1.1 Références de magnétite et de maghémite de 70 nm de diamètre..... 45

2.1.2 Références de magnétite et de maghémite de 14 nm de diamètre 48

2.2. Caractérisation des nanoparticules de référence.....49
2.2.1 Morphologie et taille. 49
2.2.2 Structures cristallines..... 53
2.2.3 Composition. 56
2.2.4 Propriétés magnétiques..... 62

2.3 Caractérisation des ligands citrates.....66
2.3.1 Spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier (FTIR)..... 66
2.3.2 Analyses thermogravimétriques (ATG) 67
2.3.3 Analyse en XPS du ligand.....68

2.4. Bilan.....69

Références bibliographiques – Chapitre 2

Chapitre 3 : Synthèse et caractérisation des nanoparticules d'oxyde de fer fonctionnalisées par des ligands citrates (NPs@Cit)

3.1 Synthèse et lavage des NPs@Cit.....75
3.1.1 Protocole standard de synthèse des NPs@Cit 75
3.1.2 Protocoles de lavage des NPs@Cit 78
3.1.3 Plan d'expérience 81

3.2 Influence des paramètres de synthèse sur la taille et la structure des NPs@Cit..82

3.3 Influence des paramètres de synthèse sur l'état d'agrégation des nanoparticules en solution aqueuse et le taux de ligand.....91
3.3.1 Comparaison MET/DLS : mesure du rayon hydrodynamique. 91
3.3.2 Caractérisation de la surface des nanoparticules 93
3.3.3 Mesure du taux de ligand 99
3.3.4 Relation entre taux de ligand et rayon hydrodynamique. 102

3.4 Influence de la taille et du taux de ligand sur la composition des NPs@Cit.....104

3.5 Influence de la taille et du taux de ligand sur les propriétés magnétiques.....116
3.5.1 Cycles d'aimantation en fonction du champ. 116
3.5.2 Mesure de l'aimantation en fonction de la température (ZFC/FC). 119

3.6 Bilan.....122

Références bibliographiques – Chapitre 3

Chapitre 4 : Interaction avec les cellules et perspectives de fonctionnalisation

4.1 Interaction avec les cellules des nano-systèmes NPs et NPs@Cit.....129
4.1.1 Étude de la stérilisation préalable aux tests biologiques 130
4.1.2 Étude de l'internalisation cellulaire..... 131
4.1.3 Étude de l'activité mitochondriale..... 137
4.1.4 Bilan 141

4.2 Modification de la couronne organique…….143
4.2.1 Utilisation de la couronne de citrate comme précurseur de fonctionnalisation..... 143
4.2.2 Synthèse et caractérisation des NPs d'oxyde de fer fonctionnalisées par des polyoxazolines (NPs@POx et NPs@POx-Acide)..... 148

Références bibliographiques – Chapitre 4

Conclusion générale……..…….....167

Annexes……..…….....173
A.1 Techniques de caractérisations…….....173
A.1.1 Méthodes et modes de mesures en DLS..... 173
A.1.2 Diffraction des rayons X (DRX) 174
A.1.3 Spectroscopie XPS 175
A.1.4 Mesures magnétiques 175

A.2 Tableau global des résultats…….....179

A.3 Aimantation à saturation des nanoparticules d'oxyde de fer de la littérature...…….....180

A.4 Quantification élementaire issue des données XPS.....181

Références bibliographiques – Annexes

Curriculum vitae……..……...….....185

Introduction générale

Les nanomatériaux et particulièrement les nanoparticules NPs ont connu un intérêt croissant ces trois dernières décennies grâce au développement de nouvelles méthodes de synthèse et à l'adaptation d'outils d'analyse avec des résolutions spatiales inférieures au micromètre.

La diminution à l'échelle nanométrique conduit intrinsèquement à l'augmentation du rapport surface sur volume qui exalte alors le comportement des atomes externes et les effets de surface. La caractéristique dimensionnelle (taille et surface spécifique des nanomatériaux) associée à l'état chimique de surface et à la composition des nanoparticules conduit à des propriétés magnétiques, optiques, catalytiques et biologiques différentes de celles des matériaux massifs ouvrant ainsi la voie à de nombreuses applications potentielles.

Parmi les différents types de nanoparticules développées ces dernières années (métaux, oxydes métalliques, silice, polymériques…), un intérêt scientifique important s'est développé autour des nanoparticules d'oxyde de fer superparamagnétiques (SPIONs) de structure spinelle. En effet, les propriétés magnétiques des SPIONs en font des candidats de choix pour bon nombre d'applications, notamment biomédicales. Dans ce domaine, en-dessous d'une taille généralement d'environ 20 nm, ces nanoparticules superparamagnétiques ne seront aimantées que sous l'effet d'un champ magnétique extérieur. En outre, l'absence de forces attractives magnétiques entre les NPs favorisera leur stabilité en suspension en limitant leur tendance à l'agglomération et à l'agrégation. La fonctionnalisation de surface des nanoparticules d'oxyde de fer peut être toutefois nécessaire pour améliorer la dispersion et la stabilité des nanoparticules en suspension aqueuse à pH physiologique, pour contrôler leur diamètre hydrodynamique moyen et pour apporter des fonctionnalités propres à l'application visée. On pourra ainsi fonctionnaliser les SPIONs à l'aide d'acide folique par exemple afin de cibler spécifiquement certaines cellules cancéreuses ayant des récepteurs folates surexprimés, comme cela est le cas pour le cancer du sein ou des ovaires notamment[1].

Parmi les applications biomédicales les plus répandues pour les nanoparticules d'oxyde de fer, on peut citer leur utilisation en tant qu'agents de contraste dans le domaine de l'Imagerie par Résonance Magnétique (IRM)[2]. Couramment utilisée dans le milieu biomédical, l'IRM est une technique d'imagerie non invasive, non radioactive et présentant une bonne résolution spatiale. Cette technique est basée sur la relaxation magnétique des spins nucléaires des

protons des molécules d'eau et de graisses omniprésentes dans les tissus biologiques chez l'être humain. Pour accentuer le contraste des images, il est courant d'utiliser des agents de contraste IRM qui auront des effets sur les temps de relaxation des moments magnétiques des protons qui les entourent. Les agents de contraste peuvent être divisés en deux grandes catégories :

- Les agents paramagnétiques ou agents de contraste positifs constitués de cations métalliques (le plus souvent du gadolinium sous forme de complexe Gd-DTPA (Magnevist®) ou Gd-DOTA (Dotarem®)) qui vont induire un hyper-signal conduisant à un éclaircissement de l'image.

- Les agents superparamagnétiques ou agents de contraste négatifs parmi lesquels on trouvera les nanoparticules d'oxyde de fer superparamagnétiques. Ces agents de contraste négatifs diminueront le signal IRM provoquant ainsi un assombrissement de l'image à leur voisinage. Les agents de contraste à base d'oxyde de fer commerciaux actuellement utilisés dans le domaine biomédical se divisent en deux catégories : SPIONs d'un diamètre inférieur à 150 nm injectés au patient (par exemple l'Endorem®) et les SPIONs d'un diamètre supérieur à 150 nm administrés par voie orale et servant exclusivement à l'imagerie gastro-intestinale.

L'utilisation des propriétés magnétiques des SPIONs n'est pas limitée à l'imagerie IRM. Leur capacité à être attirées par un champ magnétique extérieur peut également servir pour des applications *in vitro* comme la séparation ou le tri magnétique de matériel biologique[3]. Les SPIONs sont alors fonctionnalisées avec des agents de ciblage spécifiques à un type de cellules ou de bactéries. L'application d'un champ magnétique extérieur permet de séparer les entités marquées par les nanoparticules du reste de la solution. Ce même principe de séparation magnétique trouve également des applications dans le domaine environnemental avec l'objectif de séparer des polluants de l'eau. On pourra citer l'exemple d'une pollution aux métaux lourds[4].

D'autre part, les SPIONs peuvent également être utilisées dans le cadre de la thérapie par hyperthermie[5]. Le principe de cette thérapie repose sur l'application d'un champ magnétique alternatif à haute fréquence (de l'ordre de 100 kHz) qui provoque l'échauffement local des nanoparticules de 37°C à une température comprise entre 42°C et 46°C. Les cellules cancéreuses, plus sensibles à l'élévation de température que les cellules saines, sont alors

détruites, sans que les cellules saines ne soient endommagées si cette plage de températures n'est pas dépassée[6].

Ce travail de thèse a été réalisé dans le cadre d'une collaboration entre l'équipe Dolphin - Nanomatériaux pour la Vie de l'Institut Jean Lamour (IJL - UMR 7198 – CNRS – Université de Lorraine) à Nancy et l'Institut des sciences analytiques et de physico-chimie pour l'environnement et les matériaux (IPREM - UMR 5254 – CNRS - Université de Pau et des Pays de l'Adour) à Pau. Il constitue la première étude dans le domaine de la synthèse, fonctionnalisation et caractérisation de nanoparticules inorganiques au sein de l'équipe Dolphin – Nanomatériaux pour la Vie de l'IJL. Il s'agit également de la première collaboration entre cette équipe créée en 2013 et l'Équipe de Chimie Physique de l'IPREM pour une meilleure compréhension des relations composition/structure/propriétés magnétiques des nanoparticules d'oxyde de fer.

Dans ce contexte, nos travaux se sont orientés vers le développement d'une méthode de synthèse permettant d'obtenir des nanoparticules d'oxyde de fer magnétiques fonctionnalisées aux propriétés contrôlées et stables en milieu aqueux sans agrégation ni floculation. Nous avons ainsi opté pour une voie de synthèse dérivée de la co-précipitation permettant d'obtenir les SPIONs directement en suspension aqueuse et sans utilisation de solvants toxiques. Les nanoparticules synthétisées ont été fonctionnalisées au cours de la synthèse par un ajout de ligand *in situ* afin de stabiliser les SPIONs en solution aqueuse et d'éviter leur agglomération ou agrégation. Un plan d'expérience à deux variables a été établi dans le but d'optimiser la méthode de synthèse et le protocole de lavage des nanoparticules fonctionnalisées a également été optimisé.

Les SPIONs synthétisées ont ensuite été caractérisées par un large panel de techniques multi-échelles afin d'en définir clairement les paramètres physico-chimiques et les propriétés structurales et magnétiques. La collaboration des deux laboratoires initiée avec ce travail de thèse a permis une complémentarité des caractérisations pour une meilleure compréhension des relations composition/structure/propriétés. Les caractérisations morphologiques, structurales et magnétiques ont été réalisées au sein de l'IJL, tandis que l'expertise du laboratoire IPREM en caractérisation de surface et plus particulièrement en spectroscopie des photoélectrons X (XPS) a permis une caractérisation plus fine de la composition des

nanoparticules et de leur état de surface. L'interaction à l'interface oxyde de fer/ligand a été étudiée.

Afin d'évaluer le potentiel des nanoparticules fonctionnalisées synthétisées pour des applications biomédicales, leur interaction avec les cellules a été investiguée et comparée aux données obtenues pour des nanoparticules nues (non fonctionnalisées au cours de la synthèse). Ce volet du travail a fait l'objet d'une collaboration avec le laboratoire d'Ingénierie Moléculaire et de Physiopathologie Articulaire (IMoPA - UMR 7365 CNRS - Université de Lorraine) dont l'expertise en ingénierie cellulaire a permis d'évaluer l'internalisation et la cytotoxicité des nanoparticules fonctionnalisées développées dans cette étude.

Deux collaborations ont été développées avec le laboratoire de Chimie-Physique Macromoléculaire (LCPM - UMR 7365 CNRS - Université de Lorraine) et l'Institut Charles Gerhardt de Montpellier (ICGM – UMR 5253 CNRS – Université de Montpellier). Ces collaborations apportent une plus-value à ce travail en permettant d'envisager respectivement les premières perspectives de versatilité des nanoparticules fonctionnalisées par des citrates et de la méthode de synthèse optimisée. En effet, nous montrerons qu'il est envisageable, d'une part de modifier chimiquement la couronne de citrate greffée en surface des SPIONs afin de pouvoir utiliser cette coquille organique comme précurseur à une fonctionnalisation plus avancée et, d'autre part, d'adapter la méthode de synthèse développée avec les citrates à des ligands plus complexes comme les polymères bio-inspirés de type polyoxazoline qui présentent de nombreux intérêts dans le domaine biomédical.

Ce manuscrit est divisé en quatre chapitres :

Un premier chapitre bibliographique présente les propriétés structurales et magnétiques des nanoparticules d'oxydes de fer de type spinelle (magnétite et maghémite) avant de développer les principales méthodes de synthèse et de lavage rapportées dans la littérature. La stabilisation des SPIONs en solution aqueuse et plus particulièrement leur fonctionnalisation par des ligands citrates est abordée à la fin de ce chapitre.

Le deuxième chapitre est consacré à la synthèse et à la caractérisation de nanoparticules d'oxyde de fer de type magnétite et maghémite de référence ainsi qu'à la caractérisation des ligands citrates utilisés. Il a en effet été choisi d'enregistrer des données de référence à l'échelle nanométrique car, dans la littérature, la plupart de celles utilisées pour développer une réflexion proviennent en fait des matériaux massifs associés. Ces caractérisations nous

permettront de disposer de références nanométriques en termes de structure et de propriétés magnétiques qui serviront lors de la caractérisation de nos nanoparticules fonctionnalisées. La caractérisation des ligands servira quant à elle à déterminer la nature et la quantité de ligands greffés sur nos nanoparticules fonctionnalisées.

Le troisième chapitre est consacré à la synthèse et au lavage des SPIONs fonctionnalisées par des molécules de citrates ainsi qu'à leur caractérisation structurale et magnétique. L'influence des conditions de synthèse sur les paramètres physico-chimiques des nanoparticules obtenues est discutée après la proposition d'un plan d'expérience. Ce chapitre présente une étude fine des relations nanostructures /propriétés des nanoparticules. L'étude de la composition et de l'état de surface des nanoparticules fonctionnalisées est également développée dans ce chapitre.

Dans le quatrième chapitre, une première série de tests biologiques d'internalisation cellulaire et de cytotoxicité menés sur les nanoparticules de référence et les nanoparticules fonctionnalisées par des citrates sont présentés. Ce chapitre constitue une ouverture à des évolutions potentielles des nanoparticules fonctionnalisées synthétisées mais aussi à l'adaptabilité du protocole d'élaboration développé à de nouveaux systèmes.

La modification chimique de la couronne de citrate est enfin envisagée pour une versatilité des nano systèmes développés dans cette thèse.

La fonctionnalisation *in situ* des nanoparticules d'oxyde de fer par des ligands plus complexes est présentée montrant l'adaptabilité du protocole d'élaboration optimisé sur la base d'un plan d'expérience.

1. Sonvico, F., Mornet, S., Vasseur, S., Dubernet, C., Jaillard, D., Degrouard, J., Hoebeke, J., Duguet, E., Colombo, P. & Couvreur, P. Folate-Conjugated Iron Oxide Nanoparticles for Solid Tumor Targeting as Potential Specific Magnetic Hyperthermia Mediators: Synthesis, Physicochemical Characterization, and in Vitro Experiments. *Bioconjug. Chem.* **16,** 1181–1188 (2005).
2. Hilger, I. & Kaiser, W. A. Iron oxide-based nanostructures for MRI and magnetic hyperthermia. *Nanomed.* **7,** 1443–1459 (2012).
3. Hola, K., Markova, Z., Zoppellaro, G., Tucek, J. & Zboril, R. Tailored functionalization of iron oxide nanoparticles for MRI, drug delivery, magnetic separation and immobilization of biosubstances. *Biotechnol. Adv.* **33,** 1162–1176 (2015).
4. Ebner, A. D., Ritter, J. A., Ploehn, H. J., Kochen, R. L. & Navratil, J. D. New magnetic field-enhanced process for the treatment of aqueous wastes. *Sep. Sci. Technol.* **34,** 1277–1300 (1999).
5. Johannsen, M., Gneveckow, U., Eckelt, L., Feussner, A., Waldofner, N., Scholz, R., Deger, S., Wust, P., Loening, S. A. & Jordan, A. Clinical hyperthermia of prostate cancer using magnetic nanoparticles: Presentation of a new interstitial technique. *Int. J. Hyperthermia* **21,** 637–647 (2005).
6. Moroz, P., Jones, S. K. & Gray, B. N. Magnetically mediated hyperthermia: current status and future directions. *Int. J. Hyperth. Off. J. Eur. Soc. Hyperthermic Oncol. North Am. Hyperth. Group* **18,** 267–284 (2002).

Chapitre 1 : État de l'art 9

1.1 Structures cristallines et propriétés magnétiques des oxydes de fer de type spinelle 9

1.1.1 Structures cristallines 10

1.1.2 Propriétés magnétiques 13

1.2 Principales méthodes de synthèse des nanoparticules de magnétite et maghémite 21

1.2.1 Synthèse hydrothermale 21

1.2.2 Synthèse en microémulsion 22

1.2.3 Décomposition thermique 22

1.2.4 Méthode polyols 22

1.2.5 Procédé Sol-Gel 23

1.2.6 Synthèse par co-précipitation 25

1.3 Principales méthodes de lavage et de sélection de taille des nanoparticules 29

1.3.1 Dialyse 29

1.3.2 Centrifugation 30

1.3.3 Centrifugation avec gradient de viscosité 30

1.3.4 Ultrafiltration 31

1.3.5 Précipitation sélective en taille 32

1.3.6 Extraction 32

1.3.7 Séparation magnétique 33

1.4 Stabilisation des nanoparticules de magnétite et maghémite en solution 33

1.4.1 Comportement en solution des nanoparticules d'oxyde de fer 33

1.4.2 Principales méthodes de stabilisation 34

1.4.3 Stabilisation par des ligands citrates 35

1.5 Bilan 37

Références bibliographiques – Chapitre 1

Chapitre 1 : État de l'art

Dans ce premier chapitre bibliographique, les structures cristallines et propriétés magnétiques des nanoparticules d'oxyde de fer de structure spinelle seront présentées. Puis, les principales méthodes de synthèse et de lavage de ces nanoparticules seront abordées en s'attachant plus particulièrement à la description de la méthode de synthèse choisie pour cette étude. Enfin, la stabilisation des nanoparticules d'oxyde de fer en solution sera évoquée.

1.1 Structures cristallines et propriétés magnétiques des oxydes de fer de type spinelle

Les oxydes de fer présents à l'état naturel cristallisent selon quatre structures distinctes :
- L'hématite α-Fe_2O_3 qui cristallise dans une structure trigonale et un groupe d'espace $R\bar{3}ch$. Dans ce composé, le fer est au degré d'oxydation +III.
- La wüstite $Fe_{1-x}O$ qui présente une structure cubique selon le groupe d'espace $Fm\bar{3}m$. Ce composé est plus rare et se rencontre presque exclusivement dans les milieux réducteurs. Dans celui-ci, le fer est principalement au degré d'oxydation +II.
- La magnétite Fe_3O_4 qui cristallise dans une structure cubique selon le groupe d'espace $Fd\bar{3}m$. Dans cette structure cristallographique appelée spinelle, le fer est présent sous les degrés d'oxydation +II et +III.
- La maghémite γ-Fe_2O_3 qui présente une structure cubique ($Fd\bar{3}m$ ou $P4_132$) ou une structure tétragonale ($P4_12_12$) en fonction des conditions de synthèse. La structure de ce composé est apparentée à la structure spinelle, le fer étant cependant uniquement présent au degré d'oxydation +III. La maghémite est obtenue par oxydation douce de la magnétite.

C'est aux deux derniers de ces oxydes, la magnétite et la maghémite, que nous nous intéresserons, ces derniers présentant les propriétés magnétiques que nous recherchons.

1.1.1 Structures cristallines

1.1.1.1 Structure cristalline de la magnétite

La magnétite de formule chimique Fe_3O_4 cristallise dans une structure de type spinelle selon le groupe d'espace $Fd\bar{3}m$ et présente un paramètre de maille proche de 0,8396 nm à température ambiante (Fiche PDF 04-015-8200).

La structure spinelle a été décrite pour la première fois par W.H. Bragg et S. Nishikawa en 1915[1] et doit son nom au minéral $MgAl_2O_4$. Les spinelles ont pour formule chimique générale AB_2X_4 où A et B sont, dans le cas de la magnétite, des cations métalliques Fe^{2+} et Fe^{3+} et X les anions O^{2-}.

Plusieurs types de structure spinelle peuvent être décrits selon la répartition des cations A et B dans les sites interstitiels : La structure spinelle « directe », « inverse » ou une structure intermédiaire. La magnétite adopte une structure spinelle dite « inverse ». Considérant la magnétite, la maille élémentaire est constituée de 32 anions O^{2-} formant un réseau cubique à face centrée. Un huitième des 64 sites tétraédriques (notés A) générés par cet arrangement anionique sont occupés par les cations trivalents Fe^{3+} et la moitié des 32 sites octaédriques (notés B) sont occupés par les cations divalents Fe^{2+} et trivalents Fe^{3+} (figure I.1). La formule de la magnétite peut ainsi être écrite sous la forme $(Fe^{3+})^{tetra}[Fe^{2+}Fe^{3+}]^{octa}(O^{2-})_4$ afin de mieux représenter la position des ions Fe^{2+} et Fe^{3+} dans les différents sites de la structure.

La magnétite peut être partiellement oxydée. Elle est alors nommée « magnétite sous stœchiométrique » de formule chimique $Fe_{3-\delta}O_4$ où δ représente l'écart à la stœchiométrie de la magnétite. La magnétite totalement oxydée est nommée maghémite.

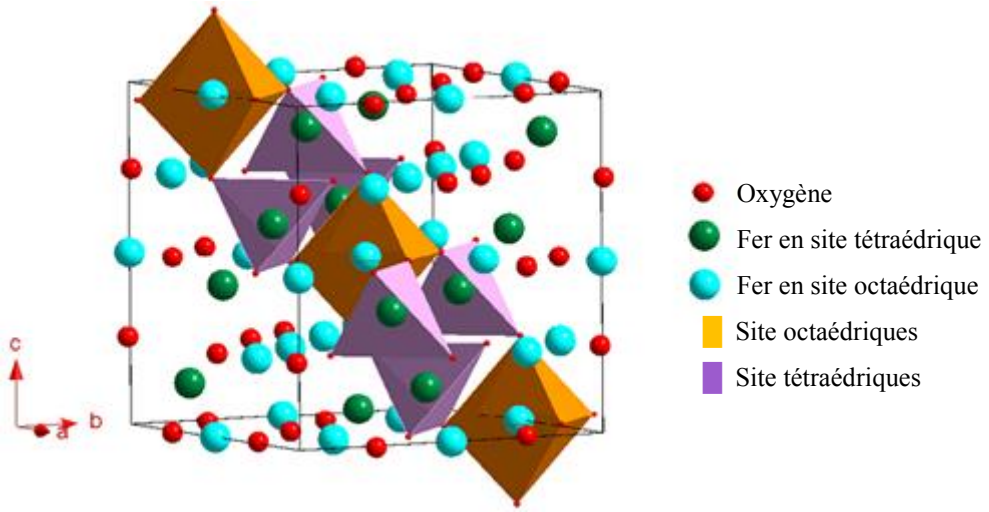


Figure I.1 : Représentation d'une maille de la structure cristallographique de la magnétite. Les octaèdres et les tétraèdres matérialisent l'un des plans (111) de la maille.

1.1.1.2 Structure cristalline de la maghémite

La maghémite γ-Fe_2O_3 est obtenue par oxydation complète de la magnétite. Les cations divalents Fe^{2+} sont remplacés par des cations trivalents Fe^{3+} et la neutralité électronique est assurée par l'apparition de lacunes cationiques notées □.

Trois distributions de lacunes cationiques ont été identifiées pour ce composé[2] en fonction des conditions d'élaboration (figure I.2). :

- Une répartition aléatoire des lacunes dans les sites octaédriques de la maille sans déformation (en jaune sur la figure I.2.A) avec la même probabilité de présence de la lacune et un taux d'occupation de 5/6. Dans ce cas, la structure cristallographique de la maghémite reste cubique et décrit le groupe d'espace $Fd\bar{3}m$. Son paramètre de maille de 0,8354 nm à température ambiante (Fiche PDF 04-013-7114) est légèrement réduit (Δ = - 0,0039 nm) par rapport à celui de la magnétite (cf. 1.1.1.1). Cette réduction traduit la légère contraction de la structure due à l'apparition des lacunes.
- Une répartition partiellement organisée des lacunes dans les sites octaédriques définis de la maille (en jaune sur la figure I.2.B) toujours sans déformation avec un taux d'occupation de ces octaèdres de 2/3. Les lacunes se situent préférentiellement dans des octaèdres définis de la maille avec une probabilité de présence de la lacune de 1/3. Le système cubique est toujours conservé mais le groupe d'espace $P4_132$ traduit un abaissement de symétrie. Son paramètre de maille est de 0,8346 nm à température ambiante (Fiche PDF 04-016-4344).
- Une répartition totalement organisée des lacunes. La symétrie s'abaisse de cubique à tétragonale ($P4_12_12$) et la mise en ordre des lacunes s'effectue dans une surstructure construite sur trois mailles cubiques superposées (figure I.2.C). Dans certains travaux[3], le groupe d'espace $P4_32_12$ est indiqué au lieu de $P4_12_12$. Cette différence traduit le sens de rotation choisi pour l'axe hélicoïdal 4_3 ou 4_1 mais la structure est identique. Les paramètres de maille de cette structure sont a = b = 0,83396 nm et c = 0,83221 nm à température ambiante (Fiche PDF 04-007-2135).

La formule chimique de la maghémite devient alors[4] :

- Pour le groupe d'espace $Fd\bar{3}m$: $(Fe^{3+})^{tétra}\ [Fe^{3+}_{5/3}\square_{1/3}]^{octa}(O^{2-})_4$
- Pour le groupe d'espace $P4_132$: $(Fe^{3+}_8)^{tétra}[Fe^{3+}_{4/3}\square_{8/3}\ Fe^{3+}_{12}]^{octa}(O^{2-})_{32}$
- Pour le groupe d'espace $P4_12_12$: $(Fe^{3+}_{24})^{tétra}[Fe^{3+}_{40}\square_8\ ]^{octa}(O^{2-})_{96}$

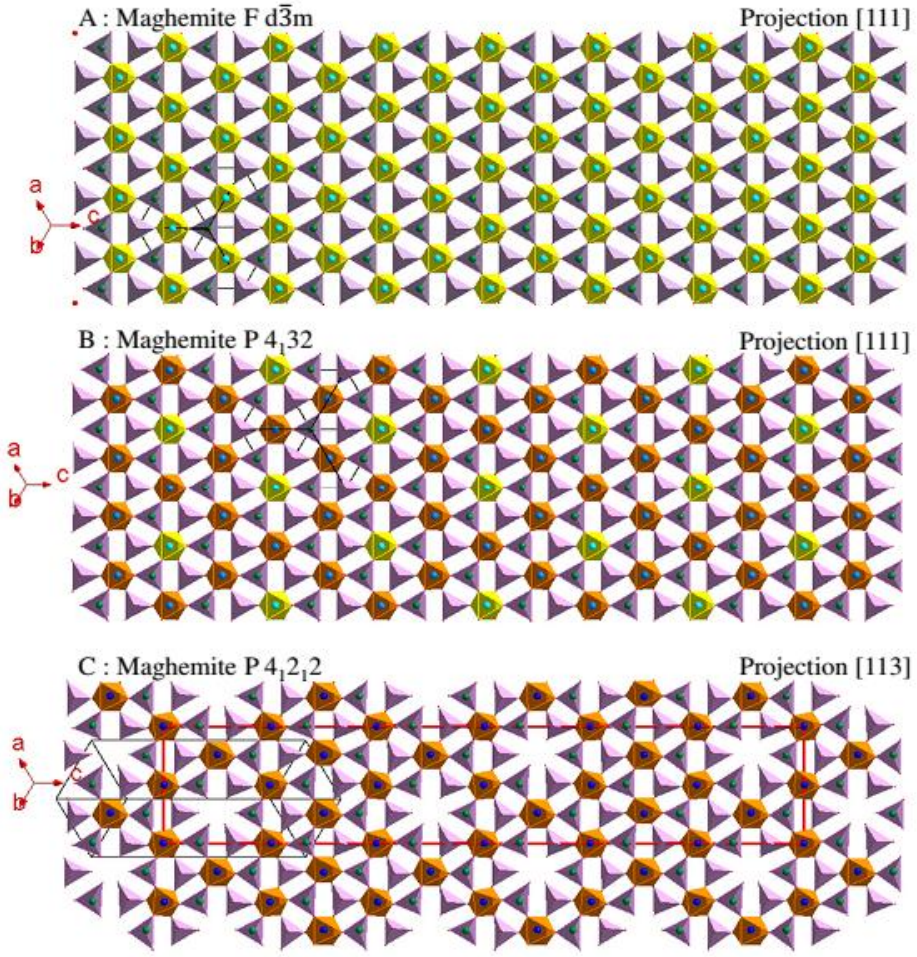


Figure I.2 : A) Projection [111] de la maghémite F d-3m. B) Projection [111] de la maghémite $P4_132$. C) Projection [113] de la maghémite P 4_12_12.

1.1.2 Propriétés magnétiques

1.1.2.1 Généralités sur le magnétisme

Les matériaux magnétiques sont caractérisés par trois grandeurs principales :

- Leurs moments magnétiques ($\vec{\mu}$) qui peuvent être assimilés à des dipôles provenant des moments orbitaux atomiques et de spin du matériau. Sous l'effet d'un champ magnétique extérieur imposé ($\vec{H}$), ils ont tendance à s'aligner dans la direction du champ ce qui induit au sein du matériau une aimantation ($\vec{M}$).
- Leur susceptibilité magnétique (χ) représentant la tendance des moments magnétiques du matériau à être alignés par la présence d'un champ magnétique extérieur et qui peut être définie par le rapport de l'aimantation sur le champ extérieur $\vec{M}/\vec{H}$.
- Leur aimantation à saturation (M_s) représentant la valeur maximale de l'aimantation que peut atteindre un matériau lorsque le champ magnétique extérieur augmente ; elle est donnée pour une température définie.

De manière générale, le champ est exprimé en Oersted, la susceptibilité magnétique ne présente pas d'unité et l'aimantation est exprimée en emu (terme utilisé pour les mesures magnétique signifiant « electromagnetism unit ») par gramme d'échantillon.

Il existe deux grandes familles de matériaux magnétiques : les matériaux magnétiques non-ordonnés (magnétisme non coopératif) et les matériaux magnétiques ordonnés (magnétisme coopératif).
Dans le premier cas, considérant les matériaux magnétiques non-ordonnés (magnétisme non coopératif), il n'y a pas d'arrangement spontané de leurs moments magnétiques et donc il n'y a ni ordre magnétique ni aimantation spontanée. On différencie alors :
- Le diamagnétisme qui est une propriété intrinsèque de la matière telle que $\chi < 0$. Les moments magnétiques avec application d'un champ extérieur vont avoir tendance à s'aligner dans le sens inverse de ce champ.
- Le paramagnétisme qui est une propriété due aux électrons libres des métaux ou aux électrons non appariés des ions telle que $\chi > 0$. Les moments magnétiques auront tendance à s'aligner dans le sens d'un champ extérieur appliqué.

Dans le second cas des matériaux magnétiques ordonnés (magnétisme coopératif), il y a un arrangement spontané de leurs moments magnétiques $\vec{\mu}$ même en l'absence de champ extérieur. Cet arrangement spontané peut être :

- Parallèle (ferromagnétisme) ; il en résulte une aimantation globale mesurable pour le matériau même en l'absence de champ magnétique extérieur.
- Antiparallèle avec compensation des moments magnétiques (antiferromagnétisme) ; il existe alors deux populations de moments magnétiques alignés antiparallèlement l'une par rapport à l'autre. Les deux populations de moments magnétiques se compensent intégralement et il n'y a pas d'aimantation globale mesurable en l'absence de champ magnétique extérieur dans ce type de matériau.
- Antiparallèle sans compensation des moments magnétiques (ferrimagnétisme) ; là aussi, une aimantation globale est mesurable pour le matériau même en l'absence de champ magnétique extérieur.

Une représentation schématique des cinq types de comportements magnétiques est présentée figure I.3.

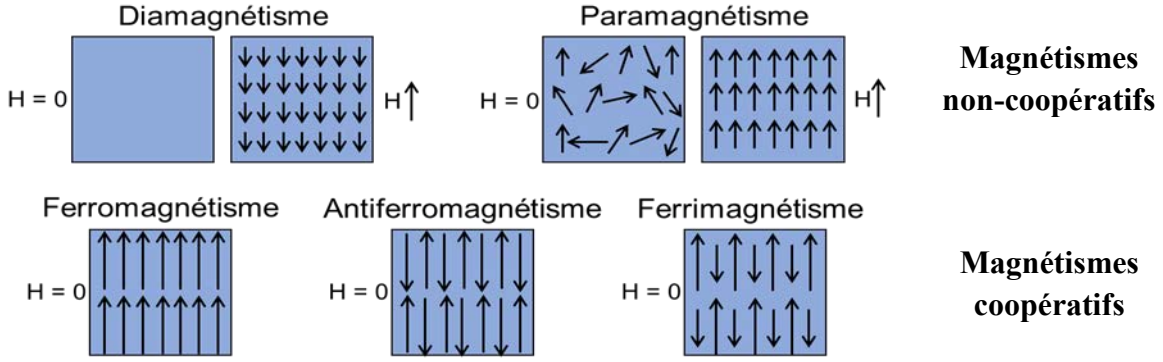


Figure I.3 : Illustration de l'arrangement des moments magnétiques au sein de matériaux ayant différents comportements magnétiques. Lorsque cela est nécessaire, le comportement avec ou sans la présence d'un champ extérieur H est précisé.

Dans les trois cas de magnétismes coopératifs, la susceptibilité est positive et plus élevée en valeur absolue que pour les matériaux paramagnétiques. Il convient également de signaler que l'ordre magnétique à longue distance n'est présent que pour une température inférieure à une valeur critique appelée la température de Curie (T_C) pour les composées ferromagnétiques et ferrimagnétiques ou pour une température inférieure à la température de Néel (T_N) pour les matériaux antiferromagnétiques. Si la température est supérieure à une de ces deux

températures critiques, l'agitation thermique devient suffisante pour supprimer l'aimantation spontanée, et le matériau devient alors paramagnétique.

La magnétite et la maghémite présentent un comportement ferrimagnétique[5] pour des températures inférieures à leurs températures de Curie, de l'ordre de 480°C et 645°C respectivement[5]. Les aimantations à saturation (M_s) sont de l'ordre de 92 emu/g pour la magnétite et 74 emu/g pour la maghémite[6]. Ces valeurs numériques sont reportées pour des matériaux massifs de magnétite et de maghémite.

1.1.2.2 Structuration en domaines magnétiques

Afin de diminuer l'énergie magnétostatique (aussi appelée énergie de forme), un matériau sous sa forme massive peut se diviser en domaines magnétiques appelés domaines de Weiss séparés par des parois appelées parois de Bloch[7]. À l'intérieur des domaines de Weiss, les spins sont antiparallèles sans compensation des moments magnétiques donnant lieu à une aimantation. Du fait de la variation d'aimantation d'un domaine à l'autre, le matériau ne présente pas d'aimantation macroscopique en l'absence de champ magnétique extérieur. Sous l'effet d'un champ magnétique, les parois de Bloch vont se déplacer élargissant les domaines qui présentent une orientation colinéaire au champ extérieur. Il y a alors une orientation progressive de tous les spins du matériau. Il est souvent nécessaire d'appliquer un champ magnétique extérieur important de l'ordre de plusieurs tesla afin d'orienter la totalité des spins magnétiques d'un matériau dans la même direction[7]. Ce phénomène est à l'origine de l'aimantation rémanente et de l'hystérèse observée lorsqu'on mesure l'aimantation $\vec{M}$ d'un matériau en fonction du champ magnétique extérieur $\vec{H}$ (figure I.4).

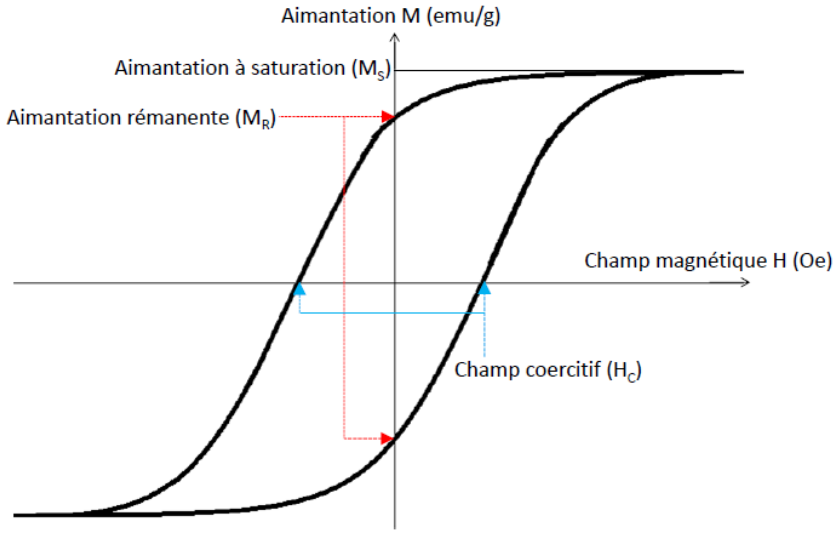


Figure I.4 : Cycle d'aimantation en fonction du champ appliqué pour un matériau ferro/ferrimagnétique massif.

Sur la figure I.4, l'aimantation du matériau atteint la valeur maximale M_S (ou aimantation à saturation) lorsque le champ imposé augmente suffisamment. Tous les spins magnétiques sont alors orientés dans la même direction. La courbe d'hystérèse permet également de mettre en évidence le caractère non instantané de l'orientation des spins magnétiques au sein d'un matériau massif induisant ainsi un retard de l'aimantation. Deux valeurs caractéristiques du matériau peuvent être définies :

- Le champ coercitif (H_C) qui correspond au champ magnétique imposé lorsque l'aimantation du matériau est nulle.
- L'aimantation rémanente (M_R) qui correspond à l'aimantation du matériau lorsque le champ extérieur est nul.

1.1.2.3 Principales sources d'anisotropies magnétiques

Anisotropie magnétocristalline

Au sein d'un cristal, le vecteur d'aimantation n'est pas isotrope, il existe des directions cristallographiques énergétiquement plus favorables pour l'alignement des spins magnétiques. Ces directions sont appelées axes de facile aimantation. Cette anisotropie de la structure cristalline est à l'origine de l'anisotropie magnétique. L'énergie nécessaire pour dévier le vecteur d'aimantation par rapport à une direction de facile aimantation est l'énergie d'anisotropie magnétocristalline notée (E_{an}^{magn}) et définie par :

$$E_{an}^{magn} = K_1 V \sin^2\theta + K_2 V \sin^4\theta \qquad \textbf{[Équation I.1]}$$

avec K_1 et K_2 les constantes d'anisotropie du matériau du premier ordre et θ l'angle entre la direction de l'aimantation et l'axe de facile aimantation.

Pour la magnétite à température ambiante, K_1 = - 1,35 x 10^4 J.m^{-3}, K_2 = - 0,28 x 10^4 J.m^{-3} et la direction de facile aimantation est la direction [111] [8,9].

Pour la maghémite à température ambiante, K_1 = - 2,5 x 10^4 J.m^{-3}, K_2 est négligeable devant K_1 et la direction de facile aimantation est la direction [110][10]. Dans le cas d'une particule magnétique mono domaine, le terme prédominant est le terme d'ordre 2^7 et on réduit ainsi l'expression de l'énergie d'anisotropie magnétocristalline à :

$$E_{an}^{magn} = KV \sin^2\theta \qquad \textbf{[Équation I.2]}$$

Anisotropie de surface

L'anisotropie magnétique de surface est liée à la rupture de la symétrie à la surface des particules entraînant la formation de défauts dans la structure cristallographique et la baisse du nombre de plus proches voisins pour les atomes de l'extrême surface. Un effet maintenant bien connu dit de « spin canting » provoque la réorientation des spins magnétiques des atomes de surface de manière perpendiculaire à cette dernière et entraîne ainsi une baisse notable de l'aimantation à saturation du matériau[11]. Cette source d'anisotropie est d'autant plus importante que les matériaux magnétiques sont de petites tailles car le rapport surface/volume augmente. Cette source d'anisotropie devient prépondérante dans le cas de nanoparticules. L'énergie associée à cette anisotropie de surface s'écrit :

$$E_{an}^{surf} = K_s V \sin^2\alpha \qquad \textbf{[Équation I.3]}$$

Anisotropie de forme

L'anisotropie magnétique de forme provient de l'interaction entre la distribution des moments magnétiques au sein du matériau et le champ démagnétisant propre à tout matériau. Dans les faits, elle aura tendance, dans le cas d'un matériau aux dimensions anisotropes, à orienter le champ dans la direction de la plus grande dimension (L'aimantation d'un cylindre de section négligeable et de hauteur infinie sera par exemple orientée dans la direction de la hauteur.).

Pour une sphère, cette anisotropie est ainsi négligeable en raison d'une uniformité tridimensionnelle.

1.1.2.4 Évolution des propriétés magnétiques dans le cas des nanoparticules

La réduction de taille, par exemple d'un matériau 3D vers des matériaux 1D ou 0D modifie un certain nombre de propriétés magnétiques. Lorsque la taille des matériaux devient inférieure à un diamètre critique D_C (figure I.5), la création des parois de Bloch devient énergétiquement défavorable et ces dernières disparaissent pour minimiser l'énergie magnétostatique. On parle alors de « mono domaine ». Dans le cas de nanoparticules, le diamètre critique peut être calculé par l'expression :

$$D_C = 4\,\gamma\ /\ \mu_0\, N_{MD}\, M_S^2 \qquad \textbf{[Équation I.4]}$$

où γ est l'énergie de création d'une paroi de Bloch, μ_0 la perméabilité du vide, M_S l'aimantation à saturation du matériau et N_{MD} le facteur démagnétisant pour un mono domaine. Pour des nanoparticules mono domaine de magnétite et de maghémite, D_C est de l'ordre de 30 nm [12,7].

En-dessous de cette taille critique, les propriétés magnétiques des nanoparticules de magnétite ou de maghémite varient également. En considérant une nanoparticule mono domaine de diamètre inférieur à D_C, son comportement magnétique va évoluer en fonction du rapport entre l'énergie d'anisotropie totale E_{an}^{tot} et l'énergie d'activation thermique E_{therm} avec :
$E_{an}^{tot} = K_{an}^{tot}.V$ où K_{an}^{tot} est la somme de l'anisotropie magnétocristalline et de l'anisotropie de surface et V le volume moyen des nanoparticules,
et $E_{therm} = k_B.T$ où k_B est la constante de Boltzmann et T la température.

On peut distinguer deux cas :

- $E_{an}^{tot} > E_{therm}$. Les moments magnétiques des domaines ferrimagnétiques sont bloqués dans la direction de facile aimantation. Une rotation de ces moments magnétiques par application d'un champ extérieur entraîne alors une rotation mécanique de l'ensemble de la nanoparticule. La nanoparticule présente alors un comportement ferrimagnétique dans le cas de la magnétite.
- $E_{an}^{tot} < E_{therm}$. L'agitation thermique est plus importante que l'énergie d'anisotropie magnétique totale et le moment magnétique est libre de tourner librement. Ce comportement magnétique est appelé superparamagnétisme.

En considérant ces deux cas, il est possible de constater par le rapport présenté en équation I.5 que pour une température donnée (par exemple la température ambiante), le sens du rapport sera dépendant du volume moyen V des nanoparticules et donc de leur taille.

$$E_{an}^{tot} / E_{therm} = K_{an}^{tot}. V / k_B. T \qquad \textbf{[Équation I.5]}$$

Si le diamètre de la particule est suffisamment petit (< D_0), l'énergie d'anisotropie magnétocristalline devient inférieure à l'énergie thermique à l'ambiante. L'aimantation peut alors se renverser spontanément et la particule présente un comportement superparamagnétique (figure I.5). Pour la magnétite et la maghémite, le diamètre limite à partir duquel les nanoparticules présentent un comportement superparamagnétique est de l'ordre de 20 nm[2,13].

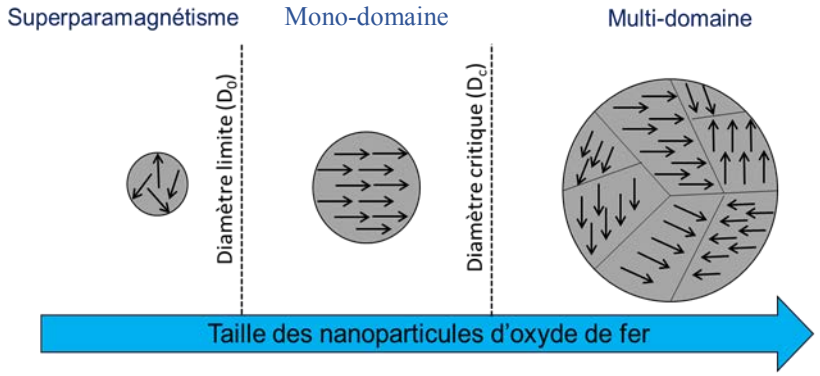


Figure 1.5 : Évolution de l'organisation magnétique des nanoparticules en fonction de leurs diamètres.

1.1.2.5 Temps de relaxation

Lorsque l'énergie nécessaire pour retourner l'aimantation devient inférieure à l'énergie thermique ambiante, les nanoparticules d'oxyde de fer (magnétite et maghémite) ont un comportement superparamagnétique. Le temps de relaxation τ correspondant à l'inverse de la probabilité de basculement des spins magnétiques est alors défini par la loi de Néel-Brown[11] :

$$\tau = \tau_0 . exp(\frac{E_{an}^{tot}}{k_B T}) \qquad \textbf{[Équation I.6]}$$

où τ_0 est le temps caractéristique de la relaxation de l'ordre de 10^{-9} s [7,9,14,15].

Le temps de relaxation augmente lorsque l'énergie d'anisotropie totale augmente et il diminue lorsque la température augmente. Le temps d'observation du phénomène est dépendant du temps caractéristique de mesure τ_m. On distingue deux cas :

- Si $\tau >> \tau_m$, le moment magnétique de la particule apparaît comme bloqué et la particule adopte un comportement ferrimagnétique.

- Si $\tau << \tau_m$, le moment magnétique de la particule se retourne un grand nombre de fois pendant la mesure et la moyenne des moments est nulle. La particule présente un comportement superparamagnétique.

Pour un temps de mesure donné et un volume V défini, le comportement magnétique va dépendre de la température. On peut ainsi définir la température de blocage T_B pour une particule de volume V comme la température à laquelle $\tau = \tau_m$. Cette température de blocage peut être exprimée, si le champ est faible ou nul, par la relation:

$$T_B = \frac{K_{an}^{tot}.V}{k_B \ln(\frac{\tau m}{\tau o})} \qquad \textbf{[Équation I.7]}$$

Pour les mesures magnétiques, il est commun de prendre les valeurs usuelles de $\tau_0 = 10^{-9}$ s et $\tau_m = 100$s. Cette équation devient alors:

$$T_B = \frac{K_{an}^{tot}.V}{25.k_B} \qquad \textbf{[Équation I.8]}$$

Cette expression étant dépendante du volume des nanoparticules et par conséquent de leur diamètre, une distribution de taille au sein d'un échantillon entraînera une distribution des temps de relaxation et de fait, une distribution des températures de blocage.

Enfin, signalons également que plusieurs études ont montré que ces équations (Équations I.6 et I.7) ne sont valables que dans le cas de nanoparticules isolées les unes des autres et donc sans interactions dipolaires entre elles. En effet, ces interactions dipolaires qui peuvent être écrites selon l'équation I.9, lorsqu'elle sont présentes au sein de l'échantillon, pourront être responsables d'un déplacement de la température de blocage moyenne vers les hautes températures[14–16].

$$E_d = \frac{\mu_0}{4\,\pi\, r^3}(\overrightarrow{m_1}.\overrightarrow{m_2} - (3/r^2)(\overrightarrow{m_1}\vec{r})(\overrightarrow{m_2}\vec{r})) \qquad \textbf{[Équation I.9]}$$

avec $\overrightarrow{m_1}$ et $\overrightarrow{m_2}$ les moment magnétique portés par deux nanoparticules et $\vec{r}$ le vecteur représentant la distance entre les deux NPs.

Les valeurs numériques associées aux propriétés magnétiques des deux oxydes de fer magnétite et maghémite présentées tableau I.1 sont relativement proches. Il s'agit de deux matériaux ferrimagnétiques mais la présence de lacunes cationiques dans la structure de la

maghémite entraîne la diminution de son aimantation à saturation. Avec une taille contrôlée des nanoparticules inférieure au diamètre limite D_0, ces deux oxydes adoptent un comportement superparamagnétique qui permet à l'aimantation du matériau de se retourner spontanément ouvrant la voie à un grand nombre d'applications.

Type d'oxyde	Aimantation à saturation	Diamètre critique monodomaine	Diamètre limite superparamagnétisme
Magnétite	92 emu/g	30 ± 5 nm	20 ± 5 nm
Maghémite	74 emu/g	30 ± 5 nm	20 ± 5 nm

Tableau I.1: Résumé des propriétés magnétiques des oxydes de fer magnétite et maghémite.

1.2 Principales méthodes de synthèse des nanoparticules de magnétite et maghémite

Depuis les premières synthèses de nanoparticules d'oxyde de fer magnétiques dans les années 80, un grand nombre de méthodes de synthèses ont été développées (tableau I.2) pour contrôler leurs tailles et leurs morphologies[17–32]. Le contrôle de ces paramètres physicochimiques dépendra de la voie de synthèse utilisée. La maîtrise de la séparation des étapes de germination et de croissance des nanoparticules via le contrôle du pH dans le cas de la co-précipitation (qui sera décrite en détail à la fin de cette partie)[20–23] ou le contrôle de la température dans le cas de synthèses hydrothermales[24,25,33], par décomposition thermique [28–30] ou par le procédé polyols [31,32,34] permettront ainsi la modulation de la taille et de la morphologie des nanoparticules. Dans le cas des synthèses par microémulsion[26,27] ou encore par voie sol-gel[35,36], le contrôle de la taille des nanoparticules est assuré par la limitation de l'espace laissé à la croissance de celles-ci.

1.2.1 Synthèse hydrothermale

La méthode dite hydrothermale [24,25,33]se basant sur la précipitation de nanoparticules à partir de précurseurs ferreux et ferriques par élévation du pH a été développée dans les années 90. Un mélange d'ions ferreux, d'ions ferriques et d'une base est scellé en bombe hydrothermale et placé à l'étuve pour une période de temps allant de plusieurs heures à plusieurs jours. Ce traitement permet l'obtention de nanoparticules d'oxyde de fer magnétiques mieux cristallisées et présentant généralement des tailles moyennes de l'ordre de 15 à 1000 nm (tableau I.2). Il est également possible d'améliorer la cristallinité de nanoparticules synthétisées préalablement grâce à un traitement hydrothermal.

1.2.2 Synthèse en microémulsion

La méthode de synthèse dite « en microémulsion » est parfois appelée précipitation en micelles inverses[26,27]. Le principe est de synthétiser les nanoparticules dans un espace confiné afin de mieux contrôler leur taille. Ces espaces confinés sont ici des microgouttes de phase aqueuse entourées d'une monocouche de tensio-actifs permettant la dispersion des nanoparticules dans une phase organique comme du cyclohexane par exemple dans les travaux de Z.H. Zhou et coll.[51]. Les précurseurs ferreux et ferriques sont dissous dans les microgouttes d'eau d'une première solution biphasée (phase aqueuse/phase organique) tandis que la base est mise en solution dans les microgouttes d'une seconde solution biphasée (phase aqueuse/phase organique). Le mélange vigoureux des deux solutions biphasées favorisera ensuite leur contact. C'est lors du contact entre microgouttes que la précipitation des nanoparticules en milieu confiné aura lieu. Cette méthode permet d'obtenir des nanoparticules d'oxyde de fer bien dispersées en phase organique, de forme sphérique, cubique ou en aiguille et de tailles comprises entre 2 et 80 nm (tableau I.2).

1.2.3 Décomposition thermique

La décomposition thermique est une autre méthode de synthèse de nanoparticules d'oxyde qui s'est particulièrement développée depuis les années 2000[28–30]. Son principe repose sur la décomposition de précurseurs organométalliques (par exemple l'oléate de fer ou le stéarate de fer pour la synthèse de nanoparticules d'oxyde de fer) [30] au sein d'un solvant organique à haut point d'ébullition [30] et en présence d'un agent de stabilisation tensio-actif [30]. Un intérêt certain de cette méthode de synthèse est le contrôle étroit de la taille de 3 à 500 nm. La morphologie des nanoparticules d'oxyde de fer peut également être contrôlée (sphères, cubes, bipyramides, tétrapodes …) (tableau I.2). En revanche, cette méthode rend obligatoire l'utilisation de solvant organique et donc de procédures de lavage et d'échanges de ligands complexes pour des applications en solution aqueuse.

1.2.4 Méthode polyols

La méthode de synthèse dite « des polyols » repose comme la méthode précédente sur la décomposition par élévation de la température d'un précurseur ferrique (généralement l'acétylacétonate de fer III)[31,32,34]. Elle consiste en l'hydrolyse à haute température du précurseur ferrique au sein d'un milieu de polyols (éthylène glycol, di (tri/tétra) éthylène glycol). Ces polyols servent alors à la fois de solvant, d'agent réducteurs réduisant une partie

des ions Fe^{3+} issus du précurseur en Fe^{2+} et de surfactant stabilisant les nanoparticules formées au cours de la synthèse. Les nanoparticules d'oxyde de fer bien isolées obtenues par cette méthode sont sphériques et mesurent entre 6 et 100 nm (tableau I.2). Cette méthode peut également être réalisée en bombe, on parle alors de méthode polyols solvothermale[37].

1.2.5 Procédé Sol-Gel

Le procédé sol-gel est une autre méthode développée depuis les années 90[35,36]. Elle consiste à hydrolyser une solution d'alcoxyde métallique pour obtenir une solution colloïdale (appelée le « sol ») ensuite condensée et polymérisée pour donner le gel humide. C'est en séchant et broyant ce gel que les nanoparticules sont obtenues, souvent après une étape de recuit pour éliminer la matrice organique. Cette synthèse peut également être assistée par micro-ondes pour obtenir des nanoparticules mieux cristallisées[38] et de taille précisément contrôlée de 4 à 200 nm. Il est cependant parfois difficile d'éliminer les résidus de matrice solide (tableau I.2).

Méthode	Avantages	Inconvénients	- Forme, taille - Aimantation à saturation
Co-précipitation[20–23]	- Sels ferreux et ferriques, réactifs peu onéreux. - Conditions douces. - Production à grande échelle envisageable. - Modification de surface aisée. - Synthèse en milieu aqueux.	- Distribution de taille large. - Oxydation non contrôlée. - Faible reproductibilité. - Agrégation des NPs.	- Sphère 10-55 nm - 16 à 82 emu/g
Co-précipitation Hydrothermale [24,25]	- Contrôle accru de la taille. - Distribution de taille étroite. - Milieu aqueux.	- Haute température. - Temps de synthèse long. - Agrégation des NPs possible.	- Sphère 12-40 nm Disque 250-1000 nm - 53 à 82 emu/g
Microémulsions[26,27]	- Contrôle accru de la taille. - Distribution de taille étroite. - Taille et forme ajustables. - Particules bien isolées.	- Faible rendement de réaction. - Mauvaise cristallinité. - Difficultés de lavage des surfactants.	- Cube, sphère 2-30 nm Aiguilles 20-80 nm
Décomposition thermique[28–30]	- Distribution de taille étroite. - Haute cristallinité. - Particules bien isolées.	- Solvants organiques. - Haute température. - Transfert de phase requis si applications en milieu aqueux. - Faible rendement de réaction.	- Cube, sphère, triangle, tétrapode. 3-500 nm - 20 à 82 emu/g
Milieu polyol[31,32]	- Réduction de sels métalliques. - Distribution de taille étroite. - Particules bien isolées.	- Haute température. - Difficultés de lavage des surfactants.	- Sphère 6-100 nm - 50 à 69 emu/g
Sol-Gel[35,36]	- Condition douces. - Distribution de taille étroite. - Haute cristallinité.	- Temps de synthèse long. - La matrice solide peut s'avérer difficile à éliminer.	- Sphère 4-200 nm - 47 à 62 emu/g

Tableau I.2 : Récapitulatif des avantages, inconvénients et caractéristiques morphologiques et aimantations à saturation des nanoparticules d'oxyde de fer magnétiques synthétisées par les principales méthodes de synthèse.

1.2.6 Synthèse par co-précipitation

La co-précipitation est la première méthode de synthèse de nanoparticules développée par R. Massart dans les années 80[20] et encore actuellement la plus utilisée[14,21,39–49] par les équipes travaillant sur les nanoparticules d'oxydes de fer magnétiques. Elle repose sur la précipitation conjointe en milieu aqueux d'ions ferreux et ferriques par ajout de base comme l'ammoniaque ou l'hydroxyde de sodium. Cette méthode a pour principaux avantages d'être facile à mettre en œuvre, même à grande échelle, et de permettre la synthèse des nanoparticules de forme quasi-sphérique et de taille allant de 10 à 100 nm directement en solution aqueuse (tableau I.2). Cette méthode n'est cependant pas exempte d'inconvénients. Il est courant que les nanoparticules synthétisées par cette méthode s'agrègent rapidement à pH neutre et que le contrôle de la taille des nanoparticules reste assez limité.

Les cations ferreux Fe^{2+} et ferriques Fe^{3+} sont stables en milieu acide et précipitent lorsque la basicité du milieu augmente pour former l'oxyde de fer selon l'équation I.10[1]:

$$Fe^{2+}_{(aq)} + 2\ Fe^{3+}_{(aq)} + 8\ OH^-_{(aq)} \rightarrow Fe_3O_{4\,(s)} + 4\ H_2O_{(l)} \quad \textbf{[Équation I.10]}$$

Cependant, du fait d'une importante réactivité de surface et de leurs petites tailles, les nanoparticules d'oxyde de fer formées vont pouvoir partiellement s'oxyder en maghémite en présence de dioxygène selon l'équation I.11 :

$$4\ Fe_3O_{4(s)} + O_{2\,(g)} \rightarrow 6\ \gamma\text{-}Fe_2O_{3(s)} \quad \textbf{[Équation I.11]}$$

La formation des nanoparticules lors de la synthèse par co-précipitation se déroule en quatre étapes décrites par le modèle de V.K Lamer [50] (figure I.6) :

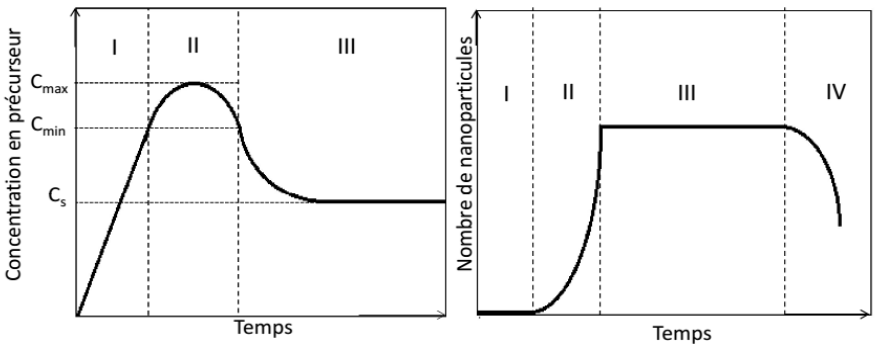


Figure I.6 : Diagrammes de Lamer représentant la concentration en complexes aqua-hydroxo précurseurs ainsi que le nombre de nanoparticules dans le milieu réactionnel en fonction du temps. On peut distinguer sur ces diagrammes les différentes étapes de la réaction.

- Étape I : Formation par polycondensation inorganique de complexes aqua-hydroxo de charge nulle dont la concentration va augmenter avec le pH du milieu réactionnel : $[Fe_2(OH)_4(H_2O)_8]^0$ pour les ions Fe^{2+} et $[Fe_2(OH)_6(H_2O)_6]^0$ pour les ions Fe^{3+}.
- Étape II : Nucléation qui commence lorsque la concentration des précurseurs atteint une valeur critique de sursaturation (C_{min}). Il y a alors apparition de germes dans le milieu. Ces germes, très petits, ont tendance à se redissoudre facilement. Le processus de formation et de redissolution très rapide des germes va se poursuivre tandis que la concentration en précurseur augmente. Une fois un seuil critique atteint, des germes stables sont créés et il s'ensuit une brusque diminution de la concentration en précurseur dans le milieu de synthèse. Si la concentration de précurseur repasse en-dessous de la valeur minimale (C_{min}), la formation de nouveaux germes est bloquée.
- Étape III : Croissance des germes stables en solution. Elle s'effectue par addition de précurseur en surface des germes par olation/oxolation. La croissance se poursuit tant que la concentration en précurseur est supérieure à la solubilité du solide (des nanoparticules) dans le milieu. Il est à noter que récemment, D. Faivre et coll.[51] ont proposé un modèle de croissance des nanoparticules de magnétite. Selon ce modèle, des nanoparticules primaires d'une taille avoisinant le nanomètre seraient formées à un stade intermédiaire. Ces nanoparticules primaires s'agrégeraient ensuite pour former les nanoparticules finales.
- Étape IV : Vieillissement. Il s'agit de la dernière étape importante pour les caractéristiques finales des nanoparticules synthétisées. Une restructuration des nanoparticules formées notamment par la cristallisation de phases jusqu'alors amorphes peut se produire lors de cette étape. L'agrégation éventuelle des nanoparticules ainsi que le mûrissement d'Ostwald au cours duquel les plus petites particules se dissolvent au profit des plus grosses peuvent également intervenir au cours de cette étape. Ces deux processus ont tous deux comme moteur la réduction de l'énergie de surface des nanoparticules.

En considérant ce modèle de V .K. Lamer[50], il apparaît que la séparation marquée entre les phases II et III c'est-à-dire entre la nucléation et la croissance est un facteur essentiel pour le contrôle de la taille des nanoparticules obtenues. Il est donc préférable que l'étape de nucléation soit très courte afin que tous les germes soient générés en même temps et que l'étape suivante de croissance soit plus longue. En effet, en considérant un système fermé, le nombre de germes obtenus lors de la phase de nucléation déterminera le nombre de particules qui pourront croître. La taille des particules obtenues en fin de phase III sera quant à elle

déterminée par la quantité de précurseur initialement introduite divisée par le nombre de germes formés en phase II.

Une autre façon de mieux contrôler la taille des nanoparticules obtenues en fin de synthèse passe par la limitation de l'effet de la phase IV notamment en limitant le mûrissement d'Ostwald. E.C Vreeland et coll.[52] ont réussi à compenser la consommation de précurseur requise pour la croissance des nanoparticules par addition de précurseur en continu au cours de la synthèse. Ils ont ainsi réussi à maintenir constante la concentration en précurseur (située entre C_{min} et C_s afin que ni nucléation ultérieure ni mûrissement d'Ostwald ne surviennent. La croissance des nanoparticules est ainsi prévisible, ce qui permet d'obtenir des nanoparticules de la taille voulue.

La forme et la taille des nanoparticules obtenues par co-précipitation peuvent être ajustées de manière relativement efficace par le contrôle de plusieurs paramètres de la synthèse.
R. Massart, V. Cabuil et coll.[21,53] qui comptent parmi les pionniers de cette méthode de synthèse de nanoparticules d'oxyde de fer magnétiques ont menés des études approfondies sur l'influence de différents paramètres tels que la base utilisée (NH_4OH, CH_3NH_2, NaOH, KOH), le pH de précipitation, l'ajout de cations dans le milieu ($N(CH_3)_4^+$, $CH_3NH_3^+$, Li^+, Na^+, K^+, NH_4^+), et le ratio Fe^{2+}/Fe^{3+} sur la taille et la polydispersité des nanoparticules synthétisées. Ils ont notamment montré que, par l'ajustement de tous ces paramètres, ils pouvaient obtenir des échantillons ayant des tailles contrôlées comprises entre 4,2 et 16,6 nm. Ils ont également mis en évidence que certaines conditions, notamment le ratio de Fe^{2+}/Fe^{3+} introduit et le pH de précipitation des nanoparticules, pouvaient conduire à la formation d'une deuxième phase constituée de l'oxyhydroxyde α-FeOOH, communément appelée goethite, non magnétique en plus des oxydes magnétiques.
J.P. Jolivet, E. Tronc et coll.[23,54] ont également beaucoup étudié les paramètres de synthèse pouvant influencer la taille et la monodispersité des nanoparticules. Ils ont notamment montré que par l'ajustement de la force ionique du milieu et du pH au cours de la synthèse de nanoparticules par co-précipitation, ils pouvaient obtenir des nanoparticules de taille contrôlée allant de 2 à 15 nm. Ils ont ainsi pu définir les meilleures conditions pour obtenir des lots de particules de taille homogène soit un pH de précipitation compris entre 8,5 et 12,0 et une force ionique du milieu comprise entre 0,5 et 3,0 mol/L. Cette équipe a également prolongé les études autour de l'influence du ratio Fe^{2+}/Fe^{3+} sur le rendement en matériaux magnétiques.

Ils ont montré que : pour un ratio de 0,3, les deux phases que sont le mélange maghémite/magnétite et la goethite coexistaient ; pour un ratio supérieur à 3,5, la goethite n'est plus présente mais la magnétite formée n'est toutefois pas stœchiométrique ; pour un ratio de 0,5, la magnétite se rapproche de la stœchiométrie et la taille ainsi que la composition des nanoparticules deviennent plus homogènes.
Parallèlement à cette influence marquée du ratio molaire Fe^{2+}/Fe^{3+} sur la composition des nanoparticules formées, L. Babes et coll.[55] ont observé que la taille moyenne des nanoparticules augmentait avec le ratio Fe^{2+}/Fe^{3+}. Ils ont également établi que les nanoparticules formées conservaient des propriétés magnétiques intéressantes uniquement pour des ratios molaire Fe^{2+}/Fe^{3+} compris entre 0,4 et 0,6.
D'autre part, D.K. Kim et coll.[56] ont montré une influence de la présence ou de l'absence d'oxygène dans le milieu réactionnel sur la taille des nanoparticules obtenues. En effet, les particules obtenues lors d'une synthèse sous azote sont relativement plus petites que celles obtenues lors d'une synthèse sous air.

En conclusion, la synthèse de nanoparticules d'oxyde de fer par co-précipitation est une méthode de synthèse permettant d'obtenir rapidement des grandes quantités de nanoparticules. Elle est simple dans sa mise en œuvre mais ses paramètres sont complexes. Elle présente l'intérêt de produire des nanoparticules en solution aqueuse et sans utilisation de solvants toxiques. Par l'ajustement de plusieurs paramètres de synthèse, il est possible d'obtenir des nanoparticules de composition et de taille voulues.

Cependant, si la monodispersité des échantillons peut être améliorée par l'ajustement des paramètres de synthèse, cette dernière reste moins bonne que pour d'autres méthodes de synthèse plus complexes (la décomposition thermique, par exemple). De plus, les nanoparticules synthétisées ont une forte tendance à l'agrégation en solution aqueuse sans traitement ultérieur. Cette tendance va considérablement limiter les applications envisageables surtout dans le domaine biomédical.

Ces deux principaux défauts que sont la polydispersité et l'agrégation des nanoparticules obtenues pourraient être limités par la stabilisation des nanoparticules en solution aqueuse. La fonctionnalisation des nanoparticules d'oxyde de fer par l'ajout d'un ligand au cours de la

synthèse ou après celle-ci dans le but de les stabiliser en solution aqueuse fera l'objet de la fin de ce chapitre.

1.3 Principales méthodes de lavage et de sélection de taille des nanoparticules

Depuis que la synthèse de nanoparticules pour diverses applications s'est développée, un grand nombre de procédés de lavage (ou purification) des nanoparticules ont également été mis au point. Ces procédés ont parfois un second objectif consistant au fractionnement des nanoparticules en fonction de leur taille ou à la suppression des agrégats éventuels en plus des autres éléments indésirables[57–60]. Dans cette partie, les principales méthodes existantes relatives au lavage et au tri par taille des NPs d'oxyde de fer magnétiques seront présentées considérant leurs principes et mécanismes principaux ainsi que leurs caractéristiques respectives.

1.3.1 Dialyse

La purification par dialyse est une méthode de purification souvent utilisée, particulièrement en biochimie. Elle consiste à placer l'échantillon à purifier dans un tube de dialyse constitué d'une membrane semi-perméable ne permettant le passage que des molécules dont le poids moléculaire est inférieur à une certaine valeur (appelée seuil de coupure). Ce tube de dialyse est ensuite introduit lui-même dans un récipient d'eau ultrapure d'un volume largement supérieur à celui du tube (en général 100 à 1000 fois supérieur). Sous l'effet du gradient de concentration en espèces chimiques (telles que des molécules de ligand libres ou des ions provenant des précurseurs) existant de part et d'autre de la membrane, les espèces suffisamment petites vont migrer au travers de la membrane et diffuser afin de se répartir de manière uniforme dans tout le volume disponible. Ainsi, la concentration en impuretés à éliminer dans le tube contenant l'échantillon est divisée d'un facteur correspondant au facteur entre le volume du tube de dialyse rempli d'échantillon et le volume total du récipient d'eau ultrapure. La purification de l'échantillon peut encore être améliorée par la répétition de cette manipulation. Cette méthode de lavage est souvent jugée comme une des moins agressives pour les échantillons car elle n'implique pas de stress physique important ni de difficultés particulières pour récupérer l'échantillon après purification. Cependant, elle est très longue en terme de durée (la diffusion étant un processus lent, les dialyses sont souvent faites sur des durées de plusieurs jours) pour des volumes d'échantillon traités assez faibles. Dans une récente étude, L.K. Mireles et coll.[61,62] ont montré que la purification de nanoparticules

d'oxyde de fer par cette méthode pourtant considérée comme « douce » provoquait des changements dans la chimie de surface des nanoparticules. De plus, A. Lassenberger et coll.[62] ont également montré que la dialyse de nanoparticules d'oxyde de fer pendant 72h provoquait une diminution du taux de ligand en surface qui entraînait l'agrégation des nanoparticules.

1.3.2 Centrifugation

La centrifugation classique est une des méthodes les plus couramment utilisées pour le lavage des nanoparticules[59,60]. Elle consiste à insérer l'échantillon dans des tubes à centrifugation et à leur appliquer un mouvement de rotation extrêmement rapide. Sous l'effet de la force centrifuge, les objets les plus lourds de la solution (généralement les nanoparticules que l'on veut purifier) s'accumulent au culot des tubes tandis que les ions parasites et le ligand en excès va rester en solution dans le surnageant. Le lavage par centrifugation s'effectue en règle générale par une succession de plusieurs phases de centrifugation suivies de la remise en solution des nanoparticules accumulées au culot des tubes. Par l'ajustement de la vitesse de rotation de la centrifugeuse ainsi que du temps de centrifugation, il est possible de faire de la sélection de taille sur des échantillons de nanoparticules dont on veut augmenter la monodispersité. Cette méthode est simple à mettre en œuvre et permet de supprimer les ions et les molécules de ligand libres des échantillons efficacement. Toutefois, le fort stress physique infligé aux nanoparticules et la succession d'agrégation forcée qu'elles subissent peut conduire à la diminution de la stabilité colloïdale des échantillons si les phases de centrifugation sont trop rapides (en vitesse de rotation) ou trop longues (en durée). De plus, un autre point à souligner est que les éventuels agrégats formés lors de la synthèse seront également récupérés dans le culot sauf si une première centrifugation à faible vitesse est effectuée en premier lieu pour les éliminer de l'échantillon.

1.3.3 Centrifugation avec gradient de viscosité

Ce type de lavage par centrifugation est basé sur le même principe que la centrifugation classique, mais en y ajoutant un fractionnement des tailles de nanoparticules présentes en solution grâce à un gradient de viscosité dans le milieu. L'échantillon est cette fois introduit dans la partie supérieure d'un tube préparé au préalable par une succession d'ajout de liquides de densité et de viscosité décroissante en partant du fond du tube. Cette succession d'ajouts a pour but d'obtenir un tube en partie rempli et présentant un gradient de viscosité depuis le fond du tube très visqueux jusqu'au haut du tube où la viscosité est proche de celle de l'eau.

Cette succession de liquides de densité et de viscosité décroissante peut être obtenue par exemple par des mélanges eau/Polyvinylepyrrolidone (PVP)[63] ayant un pourcentage massique de PVP décroissant au fil des ajouts ou encore par des mélanges eau/éthylène glycol (EG)[64] en commençant à remplir le tube avec de l'EG pur pour finir par de l'eau pure. Cette modification de la méthode permet de séparer plus efficacement les populations de tailles différentes au sein d'un échantillon, les plus grosses nanoparticules, plus lourdes, s'enfonçant plus loin dans le liquide à viscosité plus importante. Cette méthode améliorée offre de meilleurs résultats en terme de sélection de taille que la centrifugation classique, cependant la préparation préalable des tubes la rend beaucoup plus complexe et longue à mettre en application (en particulier si plusieurs centrifugations successives sont nécessaires). De plus, il est parfois difficile de récupérer les nanoparticules présentes dans les phases liquides ayant des viscosités élevées et d'éliminer complètement ces liquides visqueux de l'échantillon par la suite.

1.3.4 Ultrafiltration

Le lavage et le fractionnement en taille des nanoparticules par ultrafiltration consiste à faire passer les nanoparticules au travers d'une membrane poreuse ayant une taille de pores contrôlée ne laissant ainsi passer que les espèces dont le poids moléculaire est inférieur à une limite propre à la membrane (appelée seuil de coupure)[57,60,65,66]. La gravité uniquement peut permettre le passage de la solution au travers de la membrane. Une légère surpression de gaz imposée sur la partie supérieure du dispositif de filtration peut également être appliquée. Cette méthode peut être utilisée simultanément à la centrifugation à l'aide de tubes de centrifugation spécifiques munis de membranes poreuses. Cette méthode, surtout lorsqu'elle est assistée par la centrifugation, permet de débarrasser efficacement l'échantillon des petites molécules ou ions qui peuvent passer au travers de la membrane. En revanche, comme dans le cas de la dialyse, Lassenberger et coll.[62] ont montré que le taux de ligand (PEG) en surface des NPs était drastiquement réduit par la répétition des ultrafiltrations, ce qui entraînait l'agrégation rapide des nanoparticules en solution. De plus, on peut constater avec cette méthode une perte d'une partie des nanoparticules qui restent accrochées en surface de la membrane, ce qui les rend très difficilement récupérables.

1.3.5 Précipitation sélective en taille

La méthode de lavage et de fractionnement de taille dite SSP « Size Selective Precipitation » peut s'appliquer conjointement à d'autres méthodes comme la séparation magnétique ou la centrifugation. Elle repose en fait sur la déstabilisation des nanoparticules en solution par l'ajustement de différents facteurs. La déstabilisation des NPs peut être effectuée par l'ajustement du pH de la solution[21], de la force ionique par le rajout d'ion (par exemple chlorures) en solution[67] ou encore par le mélange entre bon et mauvais solvants qui dépendra de la fonctionnalisation de surface des nanoparticules à trier. Si la déstabilisation des nanoparticules est suffisante, il peut alors y avoir floculation ou agrégation des nanoparticules devenant faciles à récupérer par filtration classique. Il est également possible d'observer une transition dite « liquide-gaz » avec l'apparition de deux phases distinctes dans la solution[21,67,68] ; la phase inférieure la plus concentrée contiendra les plus grosses nanoparticules. L'ajustement des paramètres du milieu (pH, force ionique, nature du solvant…) peut ne pas se révéler suffisant pour déstabiliser complétement les nanoparticules. Une déstabilisation partielle peut cependant favoriser la purification des nanoparticules par des méthodes telles que la centrifugation ou la séparation magnétique.

1.3.6 Extraction

L'extraction est une méthode très utilisée en chimie organique pour séparer des entités ayant des affinités différentes avec deux solvants donnés (généralement un solvant organique apolaire et l'eau). Contrairement à la SSP par mélange de solvant dont le but était uniquement de modifier la stabilité des nanoparticules pour provoquer leur floculation, les deux solvants sélectionnés ne doivent pas être miscibles et doivent former deux phases distinctes (eau/chloroforme par exemple)[57,69,70]. Les nanoparticules seront dispersées dans l'une des deux phases du mélange après agitation et décantation alors que les impuretés resteront dans la seconde phase. Dans le cas des nanoparticules d'oxyde de fer fonctionnalisées par des ligands en surface, l'affinité avec un solvant ou un autre sera due essentiellement à la nature des ligands qui les recouvrent. Ainsi des nanoparticules fonctionnalisées par de l'acide oléique ou un autre ligand doté de longues chaînes carbonées auront plutôt tendance à migrer vers la phase organique constituée d'un solvant apolaire alors que des nanoparticules fonctionnalisées par des petites molécules chargées comme des citrates migreront plutôt vers la phase aqueuse, un solvant polaire. Cette méthode de lavage est simple à réaliser et est

principalement utilisée pour purifier les nanoparticules dont la fonctionnalisation les stabilise en solvant organique. Les résidus de synthèse seront alors solubilisés dans la phase aqueuse.

1.3.7 Séparation magnétique

La séparation magnétique est par définition utilisable uniquement pour des nanoparticules magnétiques. Elle consiste à attirer les nanoparticules au sein d'une solution via l'application d'un champ magnétique (souvent via un aimant permanent)[58,68,71,72]. Les plus grosses nanoparticules seront plus facilement attirées par le champ magnétique, d'autant plus si elles sont agglomérées sous forme de cluster. Les très petites NPs totalement isolées et stabilisées en solution par des ligands de surface seront plus difficilement attirées. Le tri de taille des nanoparticules peut selon ce principe être effectué par la modulation du temps d'exposition de l'échantillon au champ magnétique (par exemple, une exposition très brève de quelques dizaines de secondes visera uniquement à retirer les gros agrégats de la solution). Dans le cas où le champ ne serait pas provoqué par un aimant permanent mais par un électro-aimant, une modulation de la puissance du champ magnétique est possible pour attirer des nanoparticules d'une taille minimale donnée[71,73]. L'un des avantages de cette méthode de séparation et de lavage est d'être extrêmement simple à mettre en œuvre et efficace pour éliminer les ions libres et les ligands en excès. Elle permet également l'élimination d'éventuels sous-produits non magnétiques pouvant apparaître lors de la synthèse de nanoparticules d'oxyde de fer en fonction des conditions d'élaboration (comme des hydroxydes ou des oxyhydroxydes). Dans une étude récente, Lassenberger et coll.[62] ont montré que lors de lavages par séparation magnétique répétés d'un même échantillon de nanoparticules, le taux de ligand dans l'échantillon avait tendance à diminuer significativement lors des premiers lavages, signe de l'élimination des ligands libres. Cependant, à l'inverse des lavages par dialyse et filtration qu'ils ont également expérimentés, le taux de ligand dans l'échantillon se stabilise après les premiers lavages à une valeur suffisamment élevée pour conserver la stabilité des nanoparticules en solution et éviter leur agrégation.

1.4 Stabilisation des nanoparticules de magnétite et maghémite en solution

1.4.1 Comportement en solution des nanoparticules d'oxyde de fer

Comme nous l'avons vu précédemment, les nanoparticules d'oxyde de fer magnétiques issues de la co-précipitation ont tendance à s'agréger en solution aqueuse à pH neutre. La rupture de

la continuité cristalline à la surface des nanoparticules d'oxydes de fer laisse apparaître des atomes de fer porteurs de charges partielles. Ces atomes de surface se comportent comme des acides de Lewis et vont pouvoir réagir avec des donneurs d'électrons. Ainsi, les ions fer de surface vont se lier en milieu aqueux avec les molécules d'eau[21] qui se dissocient pour former une couche d'hydroxyde en surface des nanoparticules. En fonction du pH de la solution, les groupements hydroxyde -OH se protoneront en groupements $-OH_2^+$ ou se déprotoneront en groupements $-O^{-1}$. Ainsi, la surface des nanoparticules d'oxyde de fer sera chargée positivement, chargée négativement ou neutre en fonction du pH du milieu. Le point isoélectrique, c'est-à-dire le pH auquel la surface des nanoparticules d'oxyde de fer est neutre électriquement en solution aqueuse est compris entre 6,8 et 7,4[21,74]. Aux alentours de ces valeurs de pH ($5,0<pH<9,0$), la charge de surface des nanoparticules n'est plus assez importante pour que les répulsions électrostatiques empêchent leur agrégation sous l'effet des forces de Van der Waals. Les nanoparticules d'oxyde de fer perdent alors leur stabilité dans l'eau et floculent. Dans la mesure où la plupart des applications biologiques nécessitent des nanoparticules stables à pH ≈ 7, il convient de limiter leur agrégation en fonctionnalisant leur surface par des ligands organiques ou des coquilles inorganiques, augmentant ainsi les répulsions inter-particulaires.

1.4.2 Principales méthodes de stabilisation

La fonctionnalisation de surface des nanoparticules d'oxyde de fer magnétiques peut avoir deux objectifs distincts : d'une part la stabilisation des nanoparticules pour éviter leur agrégation dans un milieu donné, d'autre part, la volonté de rendre ces nanoparticules fonctionnelles pour une application donnée. Dans cette partie, nous ne traiterons que de la fonctionnalisation de surface des nanoparticules à des fins de stabilisation. De manière générale, la stabilisation des nanoparticules en solution passe par la création de répulsions entres les particules. Les deux principaux types de répulsions qui peuvent être induites par la fonctionnalisation de surface des nanoparticules sont les répulsions électrostatiques et les répulsions par encombrement stérique.

Les répulsions électrostatiques peuvent êtres induites par le greffage de petites molécules chargées, l'encapsulation dans des liposomes constitués d'une double couche de tensio-actifs ayant une tête chargée ou l'utilisation d'autres matériaux inorganiques comme la silice ou l'or. Les répulsions par gêne stérique peuvent être induites par le greffage en surface des

nanoparticules de polymères soit par simple adsorption soit par greffage du polymère via une fonction terminale.

Les principaux types de fonctionnalisation (figure I.7) décrits dans la littérature sont[75] :

- la fonctionnalisation par des polymères adsorbés comme le dextran[76,77], le PVA[78,79] ou le chitosan[80,81](figure I.7.A).
- la fonctionnalisation par des petites molécules chargées comme des carboxylates[82,83], des phosphonates[84] ou des sulfonates[85](figure I.7.B).
- la fonctionnalisation par des coquilles inorganiques le plus souvent des métaux nobles comme l'argent et l'or[86] ou encore de la silice[87,88](figure I.7.C).
- la fonctionnalisation par des polymères greffés par les fonctions terminales comme le PEG-COOH[89,90] ou la polyethylenimine[91](figure I.7.D).
- l'encapsulation dans des liposomes dans le cas des doubles couches d'acide gras (acide oléique par exemple)[92](figure I.7.E).

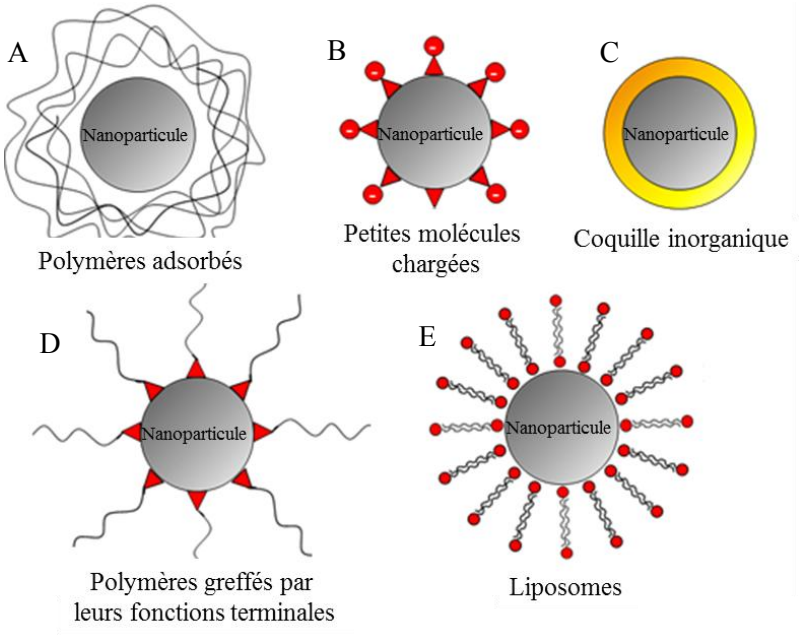


Figure I.7 : Schéma représentatif des principaux modes de fonctionnalisation des nanoparticules d'oxyde de fer magnétiques.

1.4.3 Stabilisation par des ligands citrates

Les citrates font partie des premières molécules utilisées pour la stabilisation des nanoparticules d'oxydes de fer magnétiques[48,49,82,93]. L'acide citrique est un acide tricarboxylique α-hydroxylé de formule $C_6H_8O_7$ (M = 192 g.mol^{-1}) ne présentant pas de toxicité pour les mammifères[94]. Couramment utilisé comme acidifiant dans l'industrie

alimentaire (code E330), il est également produit dans les cellules de tous les organismes aérobies lors du cycle de Krebs par condensation de l'oxaloacétate et de l'acétyl-coenzyme A. L'acide citrique est un triacide faible qui possède donc trois pKa distincts et dont 4 formes différentes sont prédominantes en fonction du pH (figure I.8).

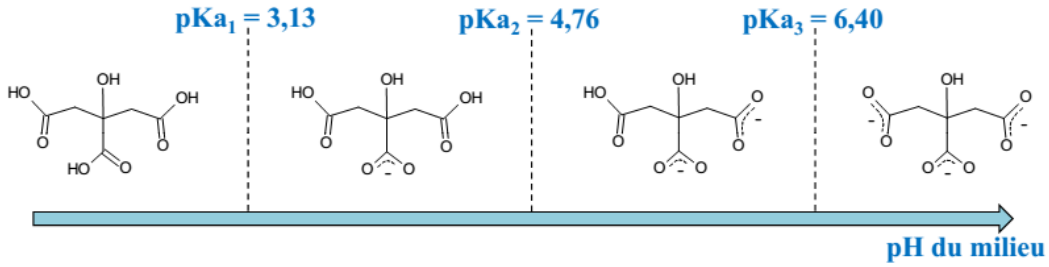


Figure I.8 : Évolution de l'espèce prédominante de l'acide citrique en fonction de l'évolution du pH de la solution.

Si le pH de la solution est inférieur au pKa_1, l'acide citrique entièrement protoné est l'espèce qui prédomine en solution, avec l'augmentation du pH, les groupements acides carboxyliques vont progressivement se déprotoner en carboxylates jusqu'à donner la forme citrate lorsque le pH est supérieur au pKa_3. Les ions citrates vont pouvoir s'adsorber via une ou deux fonctions carboxylates en surface des nanoparticules d'oxyde de fer. Les fonctions carboxylates chargées négativement non liées à la surface des nanoparticules et en périphérie des nanoparticules fonctionnalisées entraîneront les répulsions électrostatiques empêchant l'agrégation des nanoparticules. Ce principe de stabilisation des nanoparticules à pH 7 par des acides carboxyliques est couramment utilisé dans la littérature[95]. Plusieurs modes d'interactions entre citrates et nanoparticules en fonction du nombre de groupement carboxylates complexés et du type d'interaction entre le groupement et la surface des nanoparticules peuvent être envisagés (figure I.9).

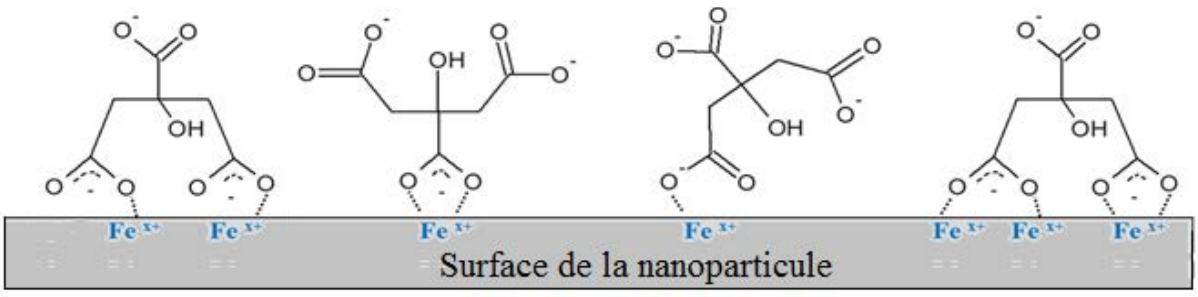


Figure I.9 : Schéma de plusieurs modes de liaison possibles entre les ligands citrates et la surface d'une nanoparticule d'oxyde de fer.

Lorsque les nanoparticules d'oxyde de fer sont fonctionnalisées par des citrates, le point isoélectrique pour lequel l'agrégation des nanoparticules intervient baisse de pH ≈ 7 pour des nanoparticules nues à pH ≈ 5[21]. Les nanoparticules ainsi fonctionnalisées sont stabilisées et ne s'agrègent pas au pH biologique, ce qui facilite grandement leur utilisation dans le domaine biomédical. L'utilisation des citrates comme ligand ne se limite pas à la seule stabilisation des nanoparticules. Par leurs nombreux groupes fonctionnels -COOH libres en solution, ils pourront servir de support à une fonctionnalisation ultérieure. Bishop et coll.[96] ont par exemple modifié des citrates pour remplacer le groupement hydroxyde par un groupement alcyne ouvrant ainsi la voie à des modifications ultérieures par la réaction de cyclo-addition d'Huisgen aussi appelée «chimie de clic»[97].

1.5 Bilan

Compte tenu des considérations bibliographiques exposées dans ce chapitre, la méthode de synthèse par co-précipitation permettant d'obtenir des nanoparticules d'oxyde de fer magnétiques directement en milieu aqueux de manière simple et en grande quantité a été choisie. Afin de s'affranchir de certains défauts inhérents à cette méthode de synthèse comme la forte tendance des nanoparticules synthétisées à s'agréger, celle-ci a été modifiée par un ajout de ligand dans le milieu réactionnel. Le ligand choisi est le citrate en raison de sa forte affinité avec la surface des nanoparticules d'oxyde de fer et de sa non-toxicité.

Une méthode de purification des nanoparticules synthétisées a également due être mise en place et perfectionnée. L'ultracentrifugation a été choisie pour purifier les suspensions de nanoparticules car elle permet d'éliminer rapidement et simplement la plupart des résidus de synthèse indésirables, tels que la base en excès et les réactifs non consommés. Une seconde méthode de purification sera également appliquée, la séparation magnétique. Celle-ci permet de s'affranchir d'éventuels oxydes ou hydroxydes non magnétiques formés au cours de la synthèse pour ne garder que les nanoparticules d'oxyde de fer magnétiques.

Références bibliographiques – Chapitre 1 :

1. Bragg, W. H. The Structure of Magnetite and the Spinels. *Nature* **95,** 561–561 (1915).
2. Teja, A. S. & Koh, P.-Y. Synthesis, properties, and applications of magnetic iron oxide nanoparticles. *Prog. Cryst. Growth Charact. Mater.* **55,** 22–45 (2009).
3. Brice Basly. Conception et caractérisation de nano-objets magnétiques pour l'imagerie par résonance magnétique (IRM). (Strasbourg, 2010).
4. Walid Baaziz. Synthèse et caractérisation des nanoparticules spinelles et coeur-coquille à base d'oxyde de fer et de cobalt. (Starsbourg, 2011).
5. Schwertmann, U. & Cornell, R. M. *Iron oxides in the laboratory: preparation and characterization*. (Wiley-VCH, 2000).
6. Ho, D., Sun, X. & Sun, S. Monodisperse Magnetic Nanoparticles for Theranostic Applications. *Acc. Chem. Res.* **44,** 875–882 (2011).
7. Arnaud Hillion. Études des propriétés magnétiques d'assemblées de nanoparticules de Co, FeRh et FeAu. (Lyon 1, 2012).
8. Skumryev, V., Blythe, H. J., Cullen, J. & Coey, J. M. D. AC susceptibility of a magnetite crystal. *J. Magn. Magn. Mater.* **196,** 515–517 (1999).
9. Ozdemir O, D. D. *Rock magnetism : fundamentals and frontiers*. **Cambridge university press,** (1997).
10. Valstyn, E., Morrish, A. & Hanton, J. Ferromagnetic Resonance of Single-Domain Particles. *Phys. Rev.* **128,** 2078- (1962).
11. Neel, L. *anisotropie Magnetique Superficielle Et Surstructures Dorientation. *J. Phys. Radium* **15,** 225–239 (1954).
12. Zijlstra, H. *Permanent magnet; theory in Ferromagnetic materials, Vol.3 (ed. E. P. Wohlfarth), North Holland, Amsterdam, the Netherlands, 1982*.
13. Chatterjee, J., Haik, Y. & Chen, C.-J. Size dependent magnetic properties of iron oxide nanoparticles. *J. Magn. Magn. Mater.* **257,** 113–118 (2003).
14. Sreeja, V. & Joy, P. A. Effect of inter-particle interactions on the magnetic properties of magnetite nanoparticles after coating with dextran. *Int. J. Nanotechnol.* **8,** 907–915 (2011).
15. Sreeja, V., Jayaprabha, K. N. & Joy, P. A. Water-dispersible ascorbic-acid-coated magnetite nanoparticles for contrast enhancement in MRI. *Appl. Nanosci.* **5,** 435–441 (2015).
16. Jayaprabha, K. N. & Joy, P. A. Citrate modified beta-cyclodextrin functionalized magnetite nanoparticles: a biocompatible platform for hydrophobic drug delivery. *Rsc Adv.* **5,** 22117–22125 (2015).
17. Laurent, S., Forge, D., Port, M., Roch, A., Robic, C., Elst, L. V. & Muller, R. N. Magnetic iron oxide nanoparticles: Synthesis, stabilization, vectorization, physicochemical characterizations, and biological applications. *Chem. Rev.* **108,** 2064–2110 (2008).
18. Gupta, A. K. & Gupta, M. Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. *Biomaterials* **26,** 3995–4021 (2005).
19. Sheng-Nan, S., Chao, W., Zan-Zan, Z., Yang-Long, H., Venkatraman, S. S. & Zhi-Chuan, X. Magnetic iron oxide nanoparticles: Synthesis and surface coating techniques for biomedical applications. *Chin. Phys. B* **23,** 037503 (2014).
20. Massart, R. Preparation of Aqueous Magnetic Liquids in Alkaline and Acidic Media. *Ieee Trans. Magn.* **17,** 1247–1248 (1981).
21. Lefebure, S., Dubois, E., Cabuil, V., Neveu, S. & Massart, R. Monodisperse magnetic nanoparticles: Preparation and dispersion in water and oils. *J. Mater. Res.* **13,** 2975–2981 (1998).
22. Lee, J., Isobe, T. & Senna, M. Preparation of ultrafine Fe3O4 particles by precipitation in the presence of PVA at high pH. *J. Colloid Interface Sci.* **177,** 490–494 (1996).
23. Vayssieres, L., Chaneac, C., Tronc, E. & Jolivet, J. P. Size tailoring of magnetite particles formed by aqueous precipitation: An example of thermodynamic stability of nanometric oxide particles. *J. Colloid Interface Sci.* **205,** 205–212 (1998).
24. Ge, S., Shi, X., Sun, K., Li, C., Uher, C., Baker, J. R., Holl, M. M. B. & Orr, B. G. Facile Hydrothermal Synthesis of Iron Oxide Nanoparticles with Tunable Magnetic Properties. *J. Phys. Chem. C* **113,** 13593–13599 (2009).

25. Daou, T. J., Pourroy, G., Begin-Colin, S., Greneche, J. M., Ulhaq-Bouillet, C., Legare, P., Bernhardt, P., Leuvrey, C. & Rogez, G. Hydrothermal synthesis of monodisperse magnetite nanoparticles. *Chem. Mater.* **18,** 4399–4404 (2006).
26. Zhou, Z. H., Wang, J., Liu, X. & Chan, H. S. O. Synthesis of Fe3O4 nanoparticles from emulsions. *J. Mater. Chem.* **11,** 1704–1709 (2001).
27. Lee, Y., Lee, J., Bae, C. J., Park, J. G., Noh, H. J., Park, J. H. & Hyeon, T. Large-scale synthesis of uniform and crystalline magnetite nanoparticles using reverse micelles as nanoreactors under reflux conditions. *Adv. Funct. Mater.* **15,** 503–509 (2005).
28. Hyeon, T., Lee, S. S., Park, J., Chung, Y. & Bin Na, H. Synthesis of highly crystalline and monodisperse maghemite nanocrystallites without a size-selection process. *J. Am. Chem. Soc.* **123,** 12798–12801 (2001).
29. Pauly, M., Pichon, B. P., Albouy, P.-A., Fleutot, S., Leuvrey, C., Trassin, M., Gallani, J.-L. & Begin-Colin, S. Monolayer and multilayer assemblies of spherically and cubic-shaped iron oxide nanoparticles. *J. Mater. Chem.* **21,** 16018–16027 (2011).
30. Baaziz, W., Pichon, B. P., Fleutot, S., Liu, Y., Lefevre, C., Greneche, J.-M., Toumi, M., Mhiri, T. & Begin-Colin, S. Magnetic Iron Oxide Nanoparticles: Reproducible Tuning of the Size and Nanosized-Dependent Composition, Defects, and Spin Canting. *J. Phys. Chem. C* **118,** 3795–3810 (2014).
31. Cai, W. & Wan, J. Facile synthesis of superparamagnetic magnetite nanoparticles in liquid polyols. *J. Colloid Interface Sci.* **305,** 366–370 (2007).
32. Arndt, D., Zielasek, V., Dreher, W. & Baeumer, M. Ethylene diamine-assisted synthesis of iron oxide nanoparticles in high-boiling polyolys. *J. Colloid Interface Sci.* **417,** 188–198 (2014).
33. Thomas, G., Demoisson, F., Boudon, J. & Millot, N. Efficient functionalization of magnetite nanoparticles with phosphonate using a one-step continuous hydrothermal process. *Dalton Trans. Camb. Engl. 2003* **45,** 10821–10829 (2016).
34. Fouineau, J., Brymora, K., Ourry, L., Mammeri, F., Yaacoub, N., Calvayrac, F., Ammar-Merah, S. & Greneche, J.-M. Synthesis, Mössbauer Characterization, and Ab Initio Modeling of Iron Oxide Nanoparticles of Medical Interest Functionalized by Dopamine. *J. Phys. Chem. C* **117,** 14295–14302 (2013).
35. HongZhang, Q., Biao, Y., ChengKui, L. & Wei, L. Synthesis and characterization of water-soluble magnetite nanocrystals via one-step sol-gel pathway. *Sci. China-Phys. Mech. Astron.* **54,** 1239–1243 (2011).
36. Raja, K., Jaculine, M. M., Jose, M., Verma, S., Prince, A. a. M., Ilangovan, K., Sethusankar, K. & Das, S. J. Sol-gel synthesis and characterization of alpha-Fe2O3 nanoparticles. *Superlattices Microstruct.* **86,** 306–312 (2015).
37. Xu, Y., Zhuang, L., Lin, H., Shen, H. & Li, J. W. Preparation and characterization of polyacrylic acid coated magnetite nanoparticles functionalized with amino acids. *Thin Solid Films* **544,** 368–373 (2013).
38. Sciancalepore, C., Rosa, R., Barrera, G., Tiberto, P., Allia, P. & Bondioli, F. Microwave-assisted nonaqueous sol-gel synthesis of highly crystalline magnetite nanocrystals. *Mater. Chem. Phys.* **148,** 117–124 (2014).
39. Ramos Guivar, J. A., Sanches, E. A., Bruns, F., Sadrollahi, E., Morales, M. A., López, E. O. & Litterst, F. J. Vacancy ordered γ-Fe2O3 nanoparticles functionalized with nanohydroxyapatite: XRD, FTIR, TEM, XPS and Mössbauer studies. *Appl. Surf. Sci.* **389,** 721–734 (2016).
40. Saikia, C., Das, M. K., Ramteke, A. & Maji, T. K. Effect of crosslinker on drug delivery properties of curcumin loaded starch coated iron oxide nanoparticles. *Int. J. Biol. Macromol.* **93,** 1121–1132 (2016).
41. Mascolo, M. C., Pei, Y. & Ring, T. A. Room Temperature Co-Precipitation Synthesis of Magnetite Nanoparticles in a Large pH Window with Different Bases. *Materials* **6,** 5549–5567 (2013).
42. El Ghandoor, H., Zidan, H. M., Khalil, M. M. H. & Ismail, M. I. M. Synthesis and Some Physical Properties of Magnetite (Fe3O4) Nanoparticles. *Int. J. Electrochem. Sci.* **7,** 5734–5745 (2012).
43. Drbohlavova, J., Hrdy, R., Adam, V., Kizek, R., Schneeweiss, O. & Hubalek, J. Preparation and Properties of Various Magnetic Nanoparticles. *Sensors* **9,** 2352–2362 (2009).

44. Nath, S., Kaittanis, C., Ramachandran, V., Dalal, N. S. & Perez, J. M. Synthesis, Magnetic Characterization, and Sensing Applications of Novel Dextran-Coated Iron Oxide Nanorods. *Chem. Mater.* **21,** 1761–1767 (2009).
45. Fazilati, M. Folate decorated magnetite nanoparticles: Synthesis and targeted therapy against ovarian cancer. *Cell Biol. Int.* **38,** 154–163 (2014).
46. Illes, E., Szekeres, M., Kupcsik, E., Toth, I. Y., Farkas, K., Jedlovszky-Hajdu, A. & Tombacz, E. PEGylation of surfacted magnetite core-shell nanoparticles for biomedical application. *Colloids Surf. -Physicochem. Eng. Asp.* **460,** 429–440 (2014).
47. Maurizi, L., Bisht, H., Bouyer, F. & Millot, N. Easy route to functionalize iron oxide nanoparticles via long-term stable thiol groups. *Langmuir ACS J. Surf. Colloids* **25,** 8857–8859 (2009).
48. Milosevic, I., Motte, L., Aoun, B., Li, T., Ren, Y., Sun, C. & Saboungi, M.-L. Effects of coating spherical iron oxide nanoparticles. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj.* **1861,** 3621–3626 (2017).
49. Mazuel, F., Espinosa, A., Luciani, N., Reffay, M., Le Borgne, R., Motte, L., Desboeufs, K., Michel, A., Pellegrino, T., Lalatonne, Y. & Wilhelm, C. Massive Intracellular Biodegradation of Iron Oxide Nanoparticles Evidenced Magnetically at Single-Endosome and Tissue Levels. *ACS Nano* **10,** 7627–7638 (2016).
50. Lamer, V. & Dinegar, R. Theory, Production and Mechanism of Formation of Monodispersed Hydrosols. *J. Am. Chem. Soc.* **72,** 4847–4854 (1950).
51. Baumgartner, J., Dey, A., Bomans, P. H. H., Le Coadou, C., Fratzl, P., Sommerdijk, N. A. J. M. & Faivre, D. Nucleation and growth of magnetite from solution. *Nat. Mater.* **12,** 310–314 (2013).
52. Vreeland, E. C., Watt, J., Schober, G. B., Hance, B. G., Austin, M. J., Price, A. D., Fellows, B. D., Monson, T. C., Hudak, N. S., Maldonado-Camargo, L., Bohorquez, A. C., Rinaldi, C. & Huber, D. L. Enhanced Nanoparticle Size Control by Extending LaMer's Mechanism. *Chem. Mater.* **27,** 6059–6066 (2015).
53. Massart, R., Dubois, E., Cabuil, V. & Hasmonay, E. Preparation and Properties of Monodisperse Magnetic Fluids. *J. Magn. Magn. Mater.* **149,** 1–5 (1995).
54. Jolivet, J., Belleville, P., Tronc, E. & Livage, J. Influence of Fe(ii) on the Formation of the Spinel Iron-Oxide in Alkaline-Medium. *Clays Clay Miner.* **40,** 531–539 (1992).
55. Babes, L., Denizot, B., Tanguy, G., Le Jeune, J. J. & Jallet, P. Synthesis of iron oxide nanoparticles used as MRI contrast agents: A parametric study. *J. Colloid Interface Sci.* **212,** 474–482 (1999).
56. Kim, D. K., Zhang, Y., Voit, W., Rao, K. V. & Muhammed, M. Synthesis and characterization of surfactant-coated superparamagnetic monodispersed iron oxide nanoparticles. *J. Magn. Magn. Mater.* **225,** 30–36 (2001).
57. Kowalczyk, B., Lagzi, I. & Grzybowski, B. A. Nanoseparations: Strategies for size and/or shape-selective purification of nanoparticles. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **16,** 135–148 (2011).
58. Mori, Y. Size-Selective Separation Techniques for Nanoparticles in Liquid. *KONA Powder Part. J.* **32,** 102–114 (2015).
59. Robertson, J. D., Rizzello, L., Avila-Olias, M., Gaitzsch, J., Contini, C., Magon, M. S., Renshaw, S. A. & Battaglia, G. Purification of Nanoparticles by Size and Shape. *Sci. Rep.* **6,** 27494 (2016).
60. Costo, R., Bello, V., González-Carreño, T., Veintemillas-Verdaguer, S. & Wang, D. Size sorting of ultrasmall magnetic nanoparticles and their aggregates behaviour. *Mater. Res. Bull.* **48,** 4294–4300 (2013).
61. Mireles, L.-K., Sacher, E., Yahia, L., Laurent, S. & Stanicki, D. Washing effect on superparamagnetic iron oxide nanoparticles. *Data Brief* **7,** 1296–1301 (2016).
62. Lassenberger, A., Bixner, O., Gruenewald, T., Lichtenegger, H., Zirbs, R. & Reimhult, E. Evaluation of High-Yield Purification Methods on Monodisperse PEG-Grafted Iron Oxide Nanoparticles. *Langmuir* **32,** 4259–4269 (2016).
63. Qiu, P. & Mao, C. Viscosity Gradient as a Novel Mechanism for the Centrifugation-Based Separation of Nanoparticles. *Adv. Mater.* **23,** 4880–4885 (2011).
64. Bonaccorso, F., Zerbetto, M., Ferrari, A. C. & Amendola, V. Sorting Nanoparticles by Centrifugal Fields in Clean Media. *J. Phys. Chem. C* **117,** 13217–13229 (2013).

65. Akthakul, A., Hochbaum, A. I., Stellacci, F. & Mayes, A. M. Size Fractionation of Metal Nanoparticles by Membrane Filtration. *Adv. Mater.* **17,** 532–535 (2005).
66. Sweeney, S. F., Woehrle, G. H. & Hutchison, J. E. Rapid Purification and Size Separation of Gold Nanoparticles via Diafiltration. *J. Am. Chem. Soc.* **128,** 3190–3197 (2006).
67. Snoswell, D. R. E., Duan, J., Fornasiero, D. & Ralston, J. The selective aggregation and separation of titania from a mixed suspension of silica and titania. *Int. J. Miner. Process.* **78,** 1–10
68. Goloverda, G., Jackson, B., Kidd, C. & Kolesnichenko, V. Synthesis of ultrasmall magnetic iron oxide nanoparticles and study of their colloid and surface chemistry. *J. Magn. Magn. Mater.* **321,** 1372–1376 (2009).
69. Hollamby, M. J., Eastoe, J., Chemelli, A., Glatter, O., Rogers, S., Heenan, R. K. & Grillo, I. Separation and Purification of Nanoparticles in a Single Step. *Langmuir* **26,** 6989–6994 (2010).
70. Shen, Y., Weeranoppanant, N., Xie, L., Chen, Y., Lusardi, M. R., Imbrogno, J., Bawendi, M. G. & Jensen, K. F. Multistage extraction platform for highly efficient and fully continuous purification of nanoparticles. *Nanoscale* **9,** 7703–7707 (2017).
71. Forge, D., Gossuin, Y., Roch, A., Laurent, S., Elst, L. V. & Muller, R. N. Development of magnetic chromatography to sort polydisperse nanoparticles in ferrofluids. *Contrast Media Mol. Imaging* **5,** 126–132 (2010).
72. Halverson, D. & Friedman, G. Magnetic Field Assisted Fractionation of Nonmagnetic Colloids in Ferrofluid. *IEEE Trans. Magn.* **43,** 2692–2694 (2007).
73. Ogrady, K., Stewardson, H., Chantrell, R., Fletcher, D., Unwin, D. & Parker, M. Magnetic Filtration of Ferrofluids. *Ieee Trans. Magn.* **22,** 1134–1136 (1986).
74. Bacri, J., Perzynski, R., Salin, D., Cabuil, V. & Massart, R. Ionic Ferrofluids - a Crossing of Chemistry and Physics. *J. Magn. Magn. Mater.* **85,** 27–32 (1990).
75. Hola, K., Markova, Z., Zoppellaro, G., Tucek, J. & Zboril, R. Tailored functionalization of iron oxide nanoparticles for MRI, drug delivery, magnetic separation and immobilization of biosubstances. *Biotechnol. Adv.* **33,** 1162–1176 (2015).
76. Berry, C. C., Wells, S., Charles, S. & Curtis, A. S. G. Dextran and albumin derivatised iron oxide nanoparticles: influence on fibroblasts in vitro. *Biomaterials* **24,** 4551–4557 (2003).
77. Jiang, W. Q., Yang, H. C., Yang, S. Y., Horng, H. E., Hung, J. C., Chen, Y. C. & Hong, C. Y. Preparation and properties of superparamagnetic nanoparticles with narrow size distribution and biocompatible. *J. Magn. Magn. Mater.* **283,** 210–214 (2004).
78. Shan, G. B., Xing, J. M., Luo, M. F., Liu, H. Z. & Chen, J. Y. Immobilization of Pseudomonas delafieldii with magnetic polyvinyl alcohol beads and its application in biodesulfurization. *Biotechnol. Lett.* **25,** 1977–1981 (2003).
79. Mahmoudi, M., Simchi, A., Imani, M., Milani, A. S. & Stroeve, P. Optimal Design and Characterization of Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles Coated with Polyvinyl Alcohol for Targeted Delivery and Imaging. *J. Phys. Chem. B* **112,** 14470–14481 (2008).
80. Unsoy, G., Yalcin, S., Khodadust, R., Gunduz, G. & Gunduz, U. Synthesis optimization and characterization of chitosan-coated iron oxide nanoparticles produced for biomedical applications. *J. Nanoparticle Res.* **14,** 964 (2012).
81. Lopez-Cruz, A., Barrera, C., Calero-DdelC, V. L. & Rinaldi, C. Water dispersible iron oxide nanoparticles coated with covalently linked chitosan. *J. Mater. Chem.* **19,** 6870–6876 (2009).
82. Bee, A., Massart, R. & Neveu, S. Synthesis of Very Fine Maghemite Particles. *J. Magn. Magn. Mater.* **149,** 6–9 (1995).
83. Andreas, K., Georgieva, R., Ladwig, M., Mueller, S., Notter, M., Sittinger, M. & Ringe, J. Highly efficient magnetic stem cell labeling with citrate-coated superparamagnetic iron oxide nanoparticles for MRI tracking. *Biomaterials* **33,** 4515–4525 (2012).
84. Sahoo, Y., Pizem, H., Fried, T., Golodnitsky, D., Burstein, L., Sukenik, C. N. & Markovich, G. Alkyl phosphonate/phosphate coating on magnetite nanoparticles: A comparison with fatty acids. *Langmuir* **17,** 7907–7911 (2001).
85. Eskandari, H. & Shariati, M. R. Dodecylbenzene sulfonate-coated magnetite nanoparticles as a new adsorbent for solid phase extraction-spectrophotometric determination of ultra trace amounts of ammonium in water samples. *Anal. Chim. Acta* **704,** 146–153 (2011).

86. Xu, Z., Hou, Y. & Sun, S. Magnetic core/shell Fe3O4/Au and Fe3O4/Au/Ag nanoparticles with tunable plasmonic properties. *J. Am. Chem. Soc.* **129,** 8698–+ (2007).
87. Klotz, M., Ayral, A., Guizard, C., Menager, C. & Cabuil, V. Silica coating on colloidal maghemite particles. *J. Colloid Interface Sci.* **220,** 357–361 (1999).
88. Liu, H.-M., Wu, S.-H., Lu, C.-W., Yao, M., Hsiao, J.-K., Hung, Y., Lin, Y.-S., Mou, C.-Y., Yang, C.-S., Huang, D.-M. & Chen, Y.-C. Mesoporous silica nanoparticles improve magnetic labeling efficiency in human stem cells. *Small* **4,** 619–626 (2008).
89. Gupta, A. K. & Wells, S. Surface-modified superparamagnetic nanoparticles for drug delivery: Preparation, characterization, and cytotoxicity studies. *Ieee Trans. Nanobioscience* **3,** 66–73 (2004).
90. Zhang, Y., Kohler, N. & Zhang, M. Q. Surface modification of superparamagnetic magnetite nanoparticles and their intracellular uptake. *Biomaterials* **23,** 1553–1561 (2002).
91. Schweiger, C., Pietzonka, C., Heverhagen, J. & Kissel, T. Novel magnetic iron oxide nanoparticles coated with poly(ethylene imine)-g-poly(ethylene glycol) for potential biomedical application: Synthesis, stability, cytotoxicity and MR imaging. *Int. J. Pharm.* **408,** 130–137 (2011).
92. Tombacz, E., Bica, D., Hajdu, A., Illes, E., Majzik, A. & Vekas, L. Surfactant double layer stabilized magnetic nanofluids for biomedical application. *J. Phys.-Condens. Matter* **20,** 204103 (2008).
93. Maurizi, L., Bouyer, F., Paris, J., Demoisson, F., Saviot, L. & Millot, N. One step continuous hydrothermal synthesis of very fine stabilized superparamagnetic nanoparticles of magnetite. *Chem. Commun. Camb. Engl.* **47,** 11706–11708 (2011).
94. Bart. A. Heldreth, M. M. F. Final Report : On the Safety Assessment of Citric Acid, Innorganic Citrate Salts, and Alkyl Citrate Esters as Used in Cosmetics. (2012).
95. Cheng, C.-M., Kou, G., Wang, X.-L., Wang, S.-H., Gu, H.-C. & Guo, Y.-J. Synthesis of carboxyl superparamagnetic ultrasmall iron oxide (USPIO) nanoparticles by a novel flocculation-redispersion process. *J. Magn. Magn. Mater.* **321,** 2663–2669 (2009).
96. Bishop, L. M., Yeager, J. C., Chen, X., Wheeler, J. N., Torelli, M. D., Benson, M. C., Burke, S. D., Pedersen, J. A. & Hamers, R. J. A Citric Acid-Derived Ligand for Modular Functionalization of Metal Oxide Surfaces via 'Click' Chemistry. *Langmuir* **28,** 1322–1329 (2012).
97. Huisgen, R. Kinetics and Mechanism of 1,3-Dipolar Cycloadditions. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2,** 633–645 (1963).

Chapitre 2 : Synthèse et caractérisation des références 45

2.1 Synthèse des nanoparticules de référence 45

2.1.1 Références de magnétite et de maghémite de 70 nm de diamètre 45

2.1.2 Références de magnétite et de maghémite de 14 nm de diamètre 48

2.2 Caractérisation des nanoparticules de référence 49

2.2.1 Morphologie et taille 49

2.2.2 Structures cristallines 53

2.2.3 Composition et surface 56

2.2.4 Propriétés magnétiques 62

2.3 Caractérisation des ligands citrates 66

2.3.1 Spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier (FTIR) 66

2.3.2 Analyses thermogravimétriques (ATG) 67

2.3.3 Analyse en XPS du ligand 68

2.4 Bilan 69

Références bibliographiques – Chapitre 2

Chapitre 2 : Synthèse et caractérisation des références

Les données bibliographiques relatives aux caractérisations des oxydes de fer magnétiques sont multiples et il est parfois difficile de discerner les données provenant de magnétite et de maghémite nanoparticulaires de celles provenant de matériaux massifs. Par ailleurs, il existe selon la littérature, un diamètre limite pour les NPs de l'ordre de 20 nm pour lequel les nanoparticules d'oxydes de fer passe d'un comportement superparamagnétique à un comportement ferrimagnétique[1–3].

Dans le cadre de la description et de l'étude des nanoparticules fonctionnalisées par des ligands citrates synthétisées dans cette étude, il nous a paru nécessaire d'établir nos propres données clairement définies. En ce sens, des nanoparticules de magnétite pure et de maghémite pure ont été synthétisées avec deux diamètres moyens différents, 14 nm et 70 nm. Deux méthodes de synthèse ont été utilisées :

- L'oxydation partielle d'une solution de sulfate de fer (II) en milieu basique décrite par I. David et A. Welch en 1956[4].
- La co-précipitation en milieu basique décrite par R. Massart et coll. en 1981[5].

Dans un souci de simplification, ces échantillons seront notés par la suite « **magn70** », « **magh70** », « **magn14** » et « **magh14** » pour les nanoparticules de magnétite de 70 nm, de maghémite de 70 nm, de magnétite de 14 nm et de maghémite de 14 nm respectivement. Les échantillons ainsi définis présentés dans ce chapitre seront de ce fait considérés comme des références dans la suite de ce travail. Avec le même souci d'établir une base claire de références, la caractérisation du ligand citrate utilisé dans ce travail de thèse sera également présentée dans ce chapitre.

2.1 Synthèse des nanoparticules de référence

2.1.1 Références de magnétite et de maghémite de 70 nm de diamètre

Afin d'obtenir des références de magnétite et de maghémite de taille nanométrique, c'est à dire inférieure à 100 nm, des nanoparticules de magnétite de 70 nm (Magn70) ont été synthétisées par la méthode d'oxydation partielle du sulfate de fer (II) en milieu basique décrite par I. David et A. Welch[4]. Cette méthode de synthèse a été citée dans l'ouvrage du Pr U. Schwertmann et du Dr R.M. Cornell « Iron Oxides in the laboratory»[6] comme étant la meilleure manière d'obtenir des particules de magnétite pure d'une taille nanométrique.

2.1.1.1 Synthèse de nanoparticules de magnétite de 70 nm pure (magn70)

L'obtention de nanoparticules de magnétite pure nécessite de se prémunir de l'oxydation. Ainsi, préalablement à la synthèse, toute l'eau ultrapure utilisée, que ce soit pour la dissolution des précurseurs ou pour les lavages en fin de réaction est désoxygénée par un bullage important de diazote pendant une demi-heure. De plus, la réaction de co-précipitation en milieu basique est réalisée dans un ballon fermé sous atmosphère inerte (bullage constant de diazote dans la solution) et l'évacuation de la surpression de gaz est laissée possible par l'utilisation d'une soupape à eau empêchant le dioxygène extérieur de pénétrer dans le ballon. 8,00 ± 0,01 g de sulfate de fer (II) heptahydraté ($FeSO_4$, 7 H_2O. CAS : 7782-63-0) ont été dissous dans 60 mL d'eau ultrapure dégazée (tableau II.1). La solution obtenue est verte claire, son pH est de 1,00 ±0,25. Cette dernière est ensuite portée à $T_{mélange}$ = 80°C dans un bain marie d'huile avec agitation magnétique et bullage d'azote pour éviter l'oxydation prématurée du fer (II) en fer (III).

Un mélange contenant 4,49 ± 0,01 g d'hydroxyde de potassium (KOH. CAS : 1310.58.3) et 0,65 ± 0,01 g de nitrate de potassium (KNO_3. CAS : 7757.79.1) dans 20 mL d'eau ultrapure est ajouté progressivement à la solution (tableau II.1).

Une oxydation partielle des ions fer (II) par les ions nitrates intervient selon les réactions d'oxydoréduction II.1 et II.2 et se différencie selon la valeur du pH.

Il est à noter la précipitation de Fe_3O_4 à partir des ions Fe^{2+} et Fe^{3+} en solution avec l'augmentation du pH conformément à la réaction II.3.

$$3\ Fe^{2+}_{(aq)} + NO_3^-{}_{(aq)} + 4\ H^+_{(aq)} \rightarrow 3\ Fe^{3+} + NO_{(g)} + 2\ H_2O_{(l)} \qquad \textbf{[Équation II.1]}$$

En milieu acide (début de l'ajout)

$$3\ Fe^{2+}_{(aq)} + NO_3^-{}_{(aq)} + 2\ H_2O_{(l)} \rightarrow 3\ Fe^{3+} + NO_{(g)} + 4\ OH^-_{(aq)} \qquad \textbf{[Équation II.2]}$$

En milieu basique (fin de l'ajout)

$$Fe^{2+}_{(aq)} + 2\ Fe^{3+}_{(aq)} + 8\ OH^-_{(aq)} \rightarrow Fe_3O_{4\,(s)} + 4\ H_2O_{(l)} \qquad \textbf{[Équation II.3]}$$

La solution est maintenue à $T_{mélange}$ = 80°C sous agitation pendant 60 minutes (t = 0 étant la fin de l'ajout de KOH/KNO_3) puis refroidie lentement durant 120 minutes, tout en maintenant l'agitation et le flux d'azote dans le ballon.

Réactifs	Masse molaire ($g.mol^{-1}$)	Masse introduite (g)	Quantité de matière (mmol)
$FeSO_4$, 7 H_2O	278,01	8,00 ± 0,01	28,78 ± 0,10
KNO_3	101,10	0,65 ± 0,01	6,43 ± 0,10
KOH	56,11	4,49 ± 0,01	80,02 ± 1,00

Tableau II.1 : Masses molaires, masses introduites et nombres de moles des réactifs introduits dans le milieu réactionnel pour la synthèse de magnétite par oxydation partielle des ions fer II.

Les nanoparticules sont récupérées selon la méthode de séparation magnétique, décrite dans la partie bibliographique (I.3), à l'aide d'un puissant aimant permanent en alliage néodyme-fer-bore appliqué sur la paroi pendant 5 minutes. Les nanoparticules sont ensuite remises en solution dans de l'eau ultrapure dégazée et dispersées par sonication et agitation mécanique puis, de nouveau séparées par l'aimant. Ce cycle est répété trois fois afin d'éliminer les traces de précurseurs n'ayant pas réagi ainsi que les éventuels coproduits formés. Un aliquot de la solution est prélevé en fin de lavage afin de préparer les échantillons pour la microscopie électronique à transmission (MET) et la diffusion dynamique de la lumière (DLS).

Les nanoparticules de magnétite une fois lavées sont séchées dans un dessiccateur sous vide contenant du silicagel pendant 3 jours avec regénération quotidienne du silicagel. La poudre sèche obtenue, de couleur noire, est stockée dans un dessiccateur sous vide ou sous azote afin d'éviter l'oxydation ultérieure du produit. Cette poudre sera caractérisée par diffraction des rayons X (DRX) et par spectroscopie Raman. Une partie de cette poudre est placée en ampoule scellée sous vide pour être analysée par spectroscopie XPS. Cette précaution est prise car ces analyses seront réalisés plusieurs mois plus tard, dans un autre laboratoire.

*2.1.1.2 Synthèse de nanoparticules de maghémite de 70 nm pure (**magh70**)*

Les nanoparticules de maghémite de 70 nm de diamètre (magh70) sont obtenues par oxydation totale du fer II présent dans les NPs magn70 synthétisées en 2.1.1.1.

1 g de NPs magn70 est placé dans un creuset d'alumine laissé pendant deux heures dans un four tubulaire porté à la température de 250°C sous atmosphère d'air. La poudre, devenue de couleur ocre, est conservée dans les mêmes conditions que l'échantillon magn70 pour éviter les contaminations extérieures ainsi qu'une hydratation excessive de l'échantillon par l'eau atmosphérique.

2.1.2 Références de magnétite et de maghémite de 14 nm de diamètre

Les nanoparticules Magn14 ont été synthétisées par la méthode de co-précipitation en milieu basique comme décrit dans le premier chapitre (I.1.3). Dans le présent chapitre, seules les conditions expérimentales seront précisées. Le but de la synthèse de ces deux autres références est de disposer de nanoparticules de magnétite et de maghémite pure plus proches du point de vue de la taille, de la morphologie et de la méthode de synthèse de celles synthétisées dans la suite de ce travail.

2.1.2.1 Synthèse de nanoparticules de magnétite de 14 nm pure (magn14)

Les précautions prises citées précédemment concernant les problèmes relatifs à l'oxydation ont été bien évidemment conservées.

Le chlorure de fer (II) tetrahydraté ($FeCl_2$, 4 H_2O. CAS : 13478-10-9) et le chlorure de fer (III) hexahydraté ($FeCl_3$, 6 H_2O. CAS : 10025-77-1) sont dissous dans 40 mL d'eau ultrapure dégazée et introduits dans le ballon avec un rapport $n(Fe^{2+}) / n(Fe^{3+})$ = ½ (2,00 ± 0,01 g de $FeCl_2$, 4 H_2O et 5,00 ± 0,01 g de $FeCl_3$, 6 H_2O) (tableau II.2). Ce rapport correspond à celui de la magnétite pure de formule $Fe^{2+}Fe_2^{3+}O^{2-}_4$. Un léger excès (≈10%) d'ions ferreux est introduit dans le cas où le réactif ferreux aurait été légèrement oxydé avant la réaction (au cours de son stockage par exemple).

Réactifs	**Masse molaire ($g.mol^{-1}$)**	**Masse introduite (g)**	**Quantité de matière (mmol)**
$FeCl_2$, 4 H_2O	198,81	2,00 ± 0,01	10,10 ± 0,10
$FeCl_3$, 6 H_2O	270,30	5,00 ± 0,01	18,50 ± 0,10
NH_4OH	35,05	13,65 ± 0,01	389,44 ± 1,00

Tableau II.2 : Masses molaires, masses introduites et nombres de moles de réactifs introduits dans le milieu réactionnel pour la synthèse de nanoparticules de magnétite par co-précipitation.

La solution initiale contenant les ions ferreux et ferriques est de couleur jaune orangée, son pH est à ce stade de 1,50 ± 0,25. Elle est ensuite chauffée à $T_{mélange}$ = 80°C dans un bain marie d'huile tout en restant sous agitation et sous bullage de diazote.

La germination des nanoparticules de magnétite est déclenchée par l'ajout rapide de 15mL (soit 13,65 ± 0,01 g) d'une solution d'hydroxyde d'ammonium (NH_4OH, 25% NH_3. CAS : 1336-21-6) au milieu réactionnel faisant augmenter le pH du mélange à 9,50 ±0,25. Un changement instantané de couleur de la solution intervient, celle-ci devient noire.

L'équation de réaction de formation des nanoparticules de magnétite est :

$$FeCl_{2\,(aq)} + 2\,FeCl_{3\,(aq)} + 8\,NH_4OH_{\,(aq)} \rightarrow Fe_3O_{4\,(s)} + 4\,H_2O_{\,(l)} + 8\,NH_4Cl \quad \textbf{[Équation II.4]}$$

Le mélange est ensuite maintenu à 80°C sous agitation et bullage de diazote pendant 90 minutes pour permettre la croissance des nanoparticules.

À t = 90 min après l'introduction de NH_4OH, le chauffage est arrêté et la solution contenant les nanoparticules est laissée sous agitation et flux de diazote pendant deux heures jusqu'à son retour à température ambiante afin de permettre la croissance des nanoparticules formées jusqu'à épuisement total du réactif.

À t = 210 min, les nanoparticules de magnétite (sous forme de poudre) sont récupérées, lavées et conservées de la même façon que pour magn70. La poudre est de couleur noire comme pour magn70.

*2.1.2.2 Synthèse de nanoparticules de maghémite de 14 nm pure **(magh14)***

Les nanoparticules magh14 ont été obtenues par traitement thermique de magn14 en suivant le même protocole que pour magh70 (2.1.1.2). La poudre de nanoparticules magh14 obtenue est de couleur ocre.

2.2 Caractérisation des nanoparticules de référence

Les techniques classiques de caractérisation des nanoparticules ayant largement été rapportées dans de nombreuses revues et thèses, nous avons pris le parti de ne pas les incorporer dans le corps du manuscrit. Le lecteur pourra néanmoins retrouver en annexe 1 une description succincte de celles utilisées dans le cadre de ce travail.

2.2.1 Morphologie et taille

Les NPs ont initialement été caractérisées par microscopie électronique à transmission (MET) à l'aide d'un microscope CM200 (FEI/Philips) opérant à une tension d'accélération de 200 kV.

Une goutte de suspension très diluée (≈ 0,1 mg/ml) contenant les nanoparticules à caractériser est déposée sur une grille de cuivre recouverte d'un film de carbone (EMS CF200-Cu). La grille est ensuite laissée à l'air libre pendant 5 minutes jusqu'à l'évaporation du solvant.

Plusieurs clichés à différents grandissements ont été pris de façon systématique pour chaque échantillon et des histogrammes de distribution de taille ont été réalisés par mesure manuelle sur un lot de 200 nanoparticules en utilisant le logiciel ImageJ[7]. L'indice de polydispersité qui représente la dispersion en tailles d'un échantillon est quant à lui calculé en faisant le rapport de l'écart-type sur le diamètre moyen de l'échantillon. Plus cet indice est faible, plus l'échantillon peut être considéré comme monodisperse.

Les morphologies des NPs magn14 et magh14 (figure II.1) sont similaires et peuvent être assimilées à des formes sphériques ce qui est conforme aux observations de la littérature pour la synthèse par co-précipitation de tels systèmes[5,8–11].

Bien que la forme de la majorité des NPs reste quasi-sphérique dans le cas de magn70 et magh70 (figure II.2), certaines NPs présentent des troncatures.

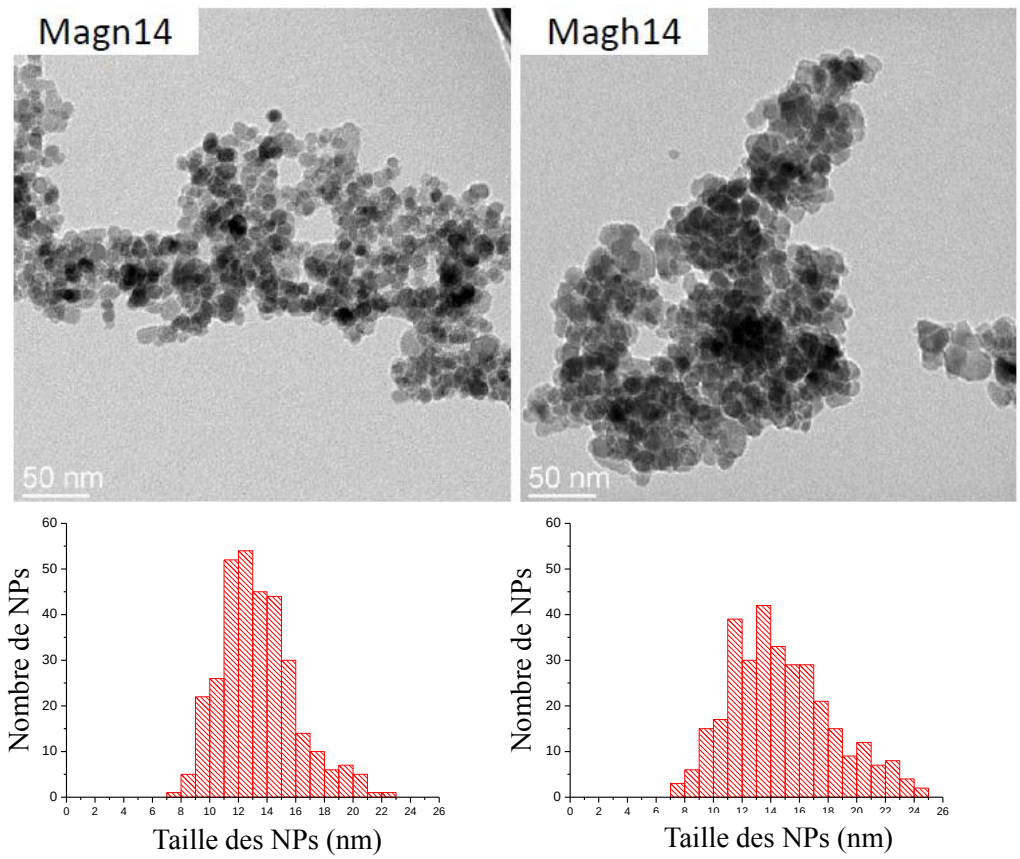


Figure II.1 : Micrographies METet histogrammes des distributions de tailles des NPs pour magn14 et magh14.

Sur toutes les micrographies, les nanoparticules présentent une tendance à l'agrégation assez marquée ce qui est cohérent pour des nanoparticules d'oxyde de fer nues à pH = 7.

Les nanoparticules de magnétite synthétisées par les deux voies de synthèses utilisées, la méthode David et Welch pour magn70 et la méthode de Massart pour magn14, présentent des diamètres moyens de l'ordre de 69,6 ± 21,4 nm et 13,4 ± 3,2 nm respectivement (tableau II.3). Ces valeurs sont en accord avec celles rapportées communément pour l'oxydation partielle de David et Welch et la co-précipitation de Massart, soit respectivement : 50 à 200 nm[6] et 12 nm[12–15].

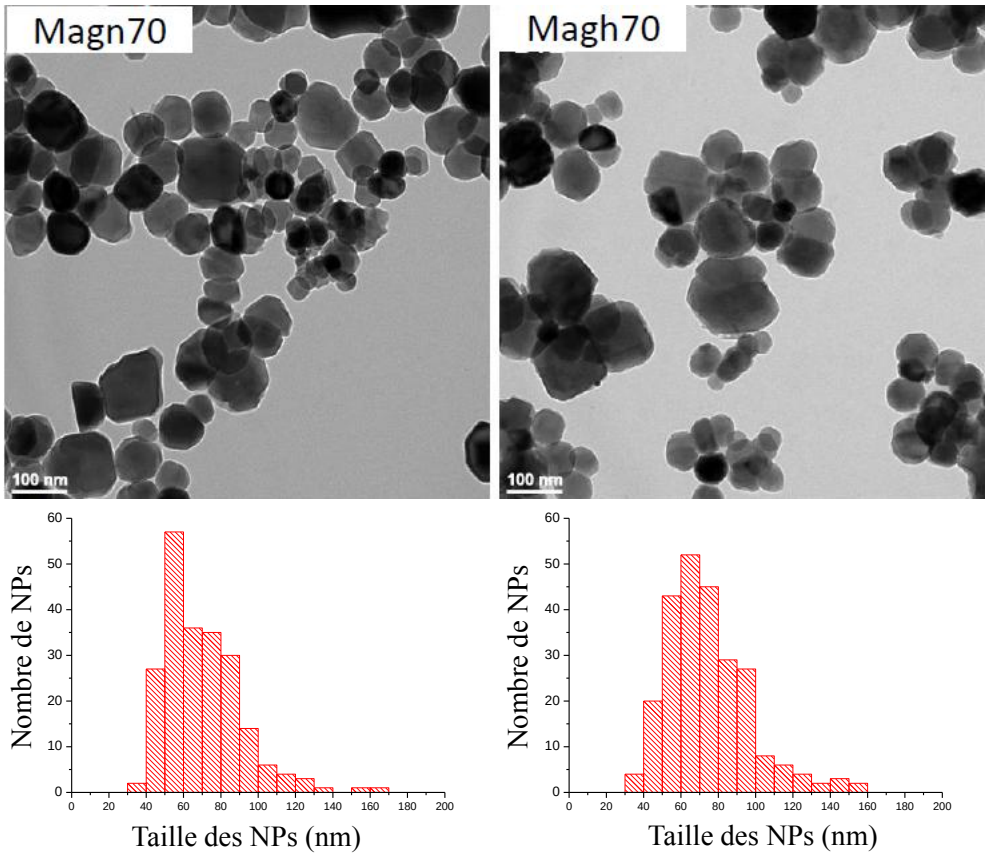


Figure II.2 : Micrographies METet histogrammes des distributions de tailles des NPs pour magn70 et magh70.

Pour les deux familles de NPs, si on considère les écarts-types des distributions, le traitement thermique appliqué pour obtenir la maghémite n'affecte pas le diamètre moyen de manière significative surtout si on compare l'augmentation du diamètre aux écarts-types des distributions. En effet, le passage de magn14 à magh14 s'accompagne d'une hausse de 1,4 nm du diamètre moyen pour des écarts-types de 2,6 nm et 3,7 nm. Et le passage de magn70 à magh70 s'accompagne d'une hausse de 4,7 nm du diamètre moyen pour des écarts-types des deux distributions de 20,6 nm et 22,1 nm. Cette observation est en adéquation avec des

exemples de la littérature indiquant qu'un traitement thermique modéré ne modifie pas significativement le diamètre moyen et la morphologie des nanoparticules d'oxyde de fer[16,17].

Échantillon	Diamètre moyen (nm)	Écart-type de la distribution (nm)	Indice de polydispersité
Magn14	13,4	2,6	0,19 ± 0,01
Magh14	14,8	3,7	0,25 ± 0,01
Magn70	69,6	20,6	0,30 ± 0,01
Magh70	74,3	22,1	0,30 ± 0,01

Tableau II.3 : Valeurs des diamètres moyens, écarts type et indices de polydispersité des échantillons de référence de magnétite et de maghémite.

Sur les clichés de microscopie électronique de magn70, il semble apparaître sur certaines nanoparticules un contraste de surface. L'origine de celui-ci peut être interprétée de deux manières différentes. Il peut s'agir d'une simple confusion visuelle pouvant provenir de la superposition de deux nanoparticules ou du focus de l'image MET qui peut dans certains cas faire apparaître des contours plus brillants ou plus sombre aux NPs. Une autre possibilité serait la présence potentielle d'une couche plus oxydée à l'extrême surface des nanoparticules. Cette interrogation a pu être levée grâce aux mesures magnétiques présentées en partie 2.2.4 qui ont démontré l'absence de couche de surface de composition différente.

Des mesures de diffusion dynamique de la lumière (DLS) permettant de mesurer le rayon hydrodynamique d'objets en suspension ont été réalisées en utilisant un appareil ZetaSizer Nano ZS. Les mesures sont effectuées sur des suspensions de nanoparticules fortement diluées à 0,1 mg/mL et à un pH de 7,0. Un exemple de mesure DLS pondérée en volume réalisée sur l'échantillon magn14 est présenté sur la figure II.3.

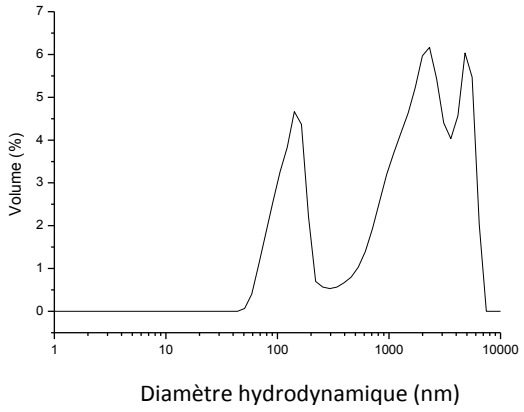


Figure II.3 : Mesure DLS en volume effectuée sur l'échantillon magn14.

Globalement, trois populations de diamètres hydrodynamiques différenciés sont présentes en suspension: 140, 2150 et 5100 nm. Ces valeurs très importantes de diamètre hydrodynamique

comparativement aux résultats de diamètre moyen des NPs mesuré en MET pour le même échantillon (13,4 ± 2,6 nm) sont typiques d'échantillons s'agrégeant rapidement en suspension. Ces données sont confirmées par des observations visuelles montrant une sédimentation rapide des NPs en suspension à pH neutre. Cette sédimentation est d'autant plus rapide que la taille initiale des NPs est grande : quelques minutes pour magn14 et magh14, quelques secondes pour magn70 et magh70 (dans le cas de ces deux derniers échantillons, la sédimentation est tellement rapide qu'elle rend impossible les mesures en DLS). L'agrégation des nanoparticules nues à pH = 7,0 est un comportement connu dû à l'absence de charge de surface[8]. Un greffage de ligand permettrait de les rendre plus stables en suspension à pH = 7,0 grâce à des répulsions stériques ou électrostatiques. Cette solution a été envisagée avec des ions citrates comme ligand dans la suite de ce manuscrit.

2.2.2 Structures cristallines

Les diffractogrammes des rayons X des nanoparticules de référence (figure II.4) ont été enregistrés grâce à un diffractomètre INEL CPS120 à rayonnement CoK_α (λ = 0,1789 nm) afin d'éviter les problèmes de fluorescence qui interviennent si on utilise un rayonnement au cuivre CuK_α sur des nanoparticules d'oxyde de fer. Les diffractogrammes ont été indexés avec les données cristallographiques des structures $Fd\bar{3}m$ (Fiche PDF 04-015-8200), $P4_132$ (Fiche PDF 04-016-4344) et $P4_12_12$ (Fiche PDF 04-007-2135).

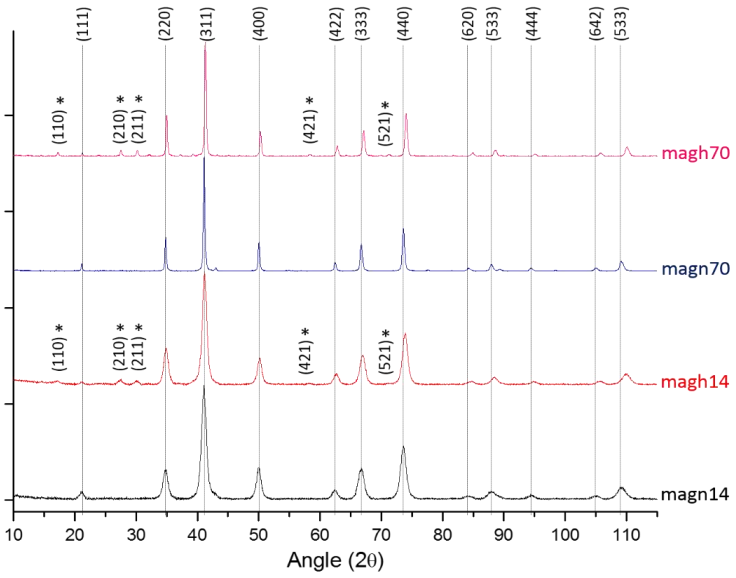


Figure II.4: Diffractogrammes des rayons X des échantillons magn14, magh14, magn70 et magh70. Les pics indexés par les lignes en pointillés correspondent aux raies de diffraction de la structure $Fd\bar{3}m$ de la magnétite. Les pics supplémentaires signalés par des astérisques sont propres à la structure $P4_132$ caractéristique de la maghémite avec des lacunes partiellement organisées.

Si la grande majorité des raies de diffraction sont communes à tous les diffractogrammes, celles de faibles intensités signalées par des astérisques sont propres à la maghémite dont les lacunes sont partiellement organisées ($P4_132$). Les raies de diffraction caractéristiques de la sur-structure tétragonale ($P4_12_12$) présentée dans le chapitre I (figure I.2) ne sont pas observables. Les lignes verticales en pointillés représentent les positions des raies de diffraction de la magnétite $Fd\bar{3}m$ et permettent de visualiser le décalage entre les raies de la magnétite et celles de la maghémite. En plus de l'identification via le diffractogramme des raies de la magnétite et de la maghémite, il est également possible de constater l'absence de raies d'autres composés cristallisés et ainsi de confirmer l'élimination des sous-produits de la réaction (NH_4Cl par exemple) par le lavage des nanoparticules.

La structure cristalline des échantillons ainsi que l'absence d'impuretés sont par ailleurs confirmées par la réalisation et l'indexation de clichés de diffraction électronique lors de l'analyse microscopique (MET) des échantillons (figure II.5).

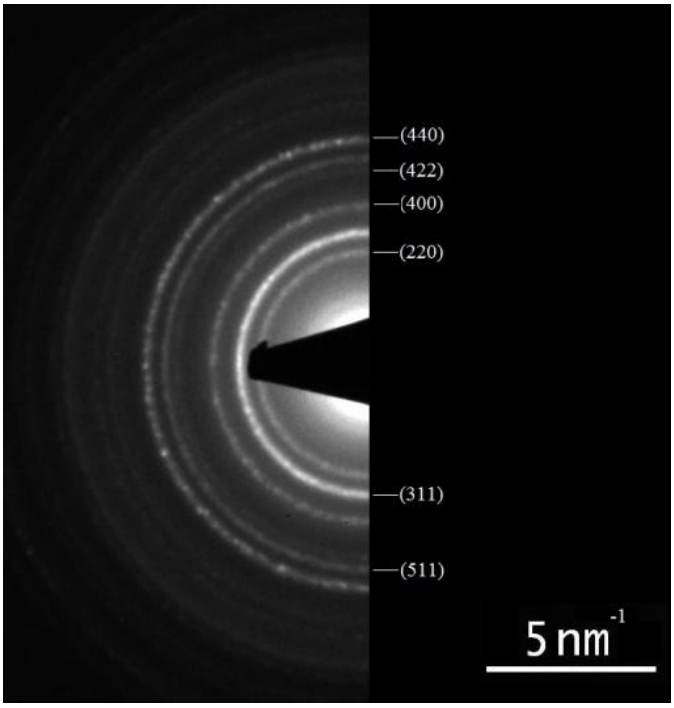


Figure II.5: Exemple de cliché de diffraction électronique réalisé grâce au MET et indexé avec les données cristallographiques de la structure spinelle $Fd\bar{3}m$.

Le calcul du paramètre de maille pour les quatre références (tableau II.4) permet de constater que les paramètres de maille de magh14 et magh70 sont inférieurs à ceux de magn14 et magn70. Cet écart dans le paramètre de maille explique le décalage vers les hauts angles des

raies de diffraction des échantillons magh70 et magh14. Signalons également que les paramètres de maille calculés sont légèrement décalés par rapport aux paramètres de maille théoriques de la magnétite massive et de la maghémite massive respectivement égaux à 8,396 ± 0,001 Å et 8,338 ± 0,001 Å. Ce décalage pourrait être dû à la difficulté de régler précisément la hauteur de l'échantillon dans le montage expérimental du diffractomètre utilisé (réglage manuel par alignement de deux pointeurs laser), qui entraîne de fait une erreur angulaire. Le diffractomètre utilisé est en effet essentiellement optimisé pour la vérification rapide des phases en présence dans l'échantillon, de l'absence d'impureté cristallisées et du calcul de la taille des cristallites mais pas pour l'analyse fine des paramètres de mailles des échantillons. Suite à l'acquisition des données expérimentales, l'utilisation du logiciel FullProf permet de fixer précisément la position des raies de diffraction avant un traitement par le logiciel UFIX permettant de corriger le déplacement « Inel » inhérent à la position en z du porte-échantillon du diffractomètre.

Un agrandissement graphique sur la zone angulaire allant de 20 à 45 degrés des échantillons magn70 et magh70 est présenté sur la figure II.6. Celui-ci permet de mieux visualiser l'apparition des raies caractéristiques de la maghémite avec lacunes cationiques partiellement organisées ($P4_132$). En outre, cet agrandissement permet également de bien visualiser le décalage existant entre les raies de la magnétite et celles de la maghémite dû à la modification du paramètre de maille.

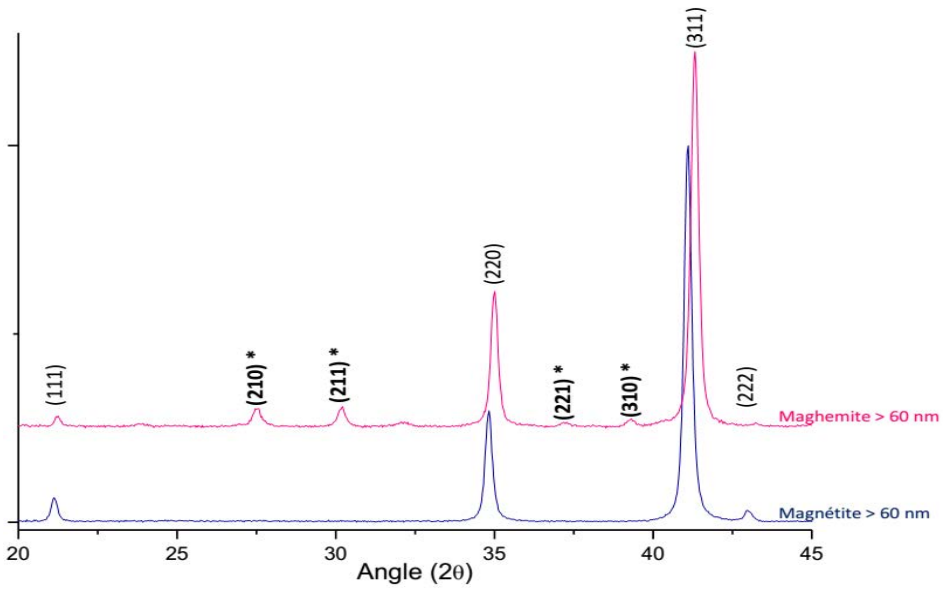


Figure II.6 : Agrandissement des diffractogrammes des deux échantillons magn70 et magh70 dans la zone angulaire allant de 20 à 45 degrés. Les pics de la maghémite avec lacunes cationiques partiellement organisées sont signalés par un astérisque.

Outre la détermination de la structure cristallographique et le calcul des paramètres de maille associés, les diffractogrammes enregistrés ont aussi permis par application de la formule de Scherrer[18] sur le pic principal (311) d'obtenir une estimation de la taille des cristallites :

$$t = \frac{k.\lambda}{\sqrt{H^2 - s^2}.\cos\theta} \qquad \textbf{[Équation II.4]}$$

avec t la taille des cristallites en Å, k un facteur correctif (k = 0,9) propre au diffractomètre utilisé, λ la longueur d'onde du rayonnement CoK_α, H la largeur à mi-hauteur du pic principal (311) de l'échantillon, s la largeur à mi-hauteur d'un pic de référence pour une cristallite infiniment grande (Si monocristallin, s = 0,289°) et $\boldsymbol{\theta}$ la position du pic principal (311).

Les tailles moyennes des cristallites au sein des échantillons de nanoparticules de référence ont été calculées afin d'être comparées aux tailles des nanoparticules mesurées par le MET (tableau II.4).

Dans le cas de magn14 et magh14, les tailles de cristallites calculées par la formule de Scherrer, respectivement 10,6 ± 0,1 nm et 11,9 ± 0,1 nm, sont cohérentes par rapport aux tailles mesurées par le MET. En revanche, pour magn70 et magh70, les tailles respectivement de 33,9 ± 0,1 nm et 35,3 ± 0,1 nm sont deux fois plus petites que les tailles mesurées au MET pour ces nanoparticules. Le principal facteur pouvant expliquer cette différence serait que certaines des plus grosses nanoparticules vues au MET soient en fait composées de plusieurs cristallites. La formule de Scherrer permettant l'estimation de la taille des cristallites et non des nanoparticules, cela induirait ainsi une différence de résultat entre ces deux méthodes.

Une autre source d'erreur pourrait venir de la mesure manuelle des tailles des nanoparticules à partir des clichés MET. En effet, certaines grosses nanoparticules pourraient cacher des nanoparticules plus petites sur les clichés MET, celles-ci étant en revanche prises en compte pour le calcul par DRX.

2.2.3 Composition et surface

Des analyses en Spectroscopie des photoélectrons X (XPS) des échantillons de référence (conservés en ampoule de verre sous vide depuis leur synthèse) ont été réalisées avec un spectromètre Kratos Axis Ultra connecté à une boîte à gants sous atmosphère d'argon.

Les spectres XPS associés aux pics de cœur de l'orbitale Fe2p du fer ont été enregistrés car ceux-ci peuvent permettre de distinguer la magnétite de la maghémite et d'estimer le ratio massique de ces deux oxydes au sein des échantillons de référence.

Dans la littérature, il existe deux principales méthodes pour désommer le pic de cœur Fe2p du fer présent dans la magnétite :

- La première méthode de A.P. Grosvenor et N.S. McIntyre[19] s'appuie sur la théorie des multiplets de spin développée plus tôt par R.P. Gupta et S.K. Sen[20] et consiste en la désommation du pic $Fe2p_{2/3}$ par l'introduction de 11 pics (appelés composantes) différents. Avec cette méthode, les deux degrés d'oxydation du fer (+II) et (+III) présents au sein de la magnétite sont représentés respectivement par 5 et 6 composantes.
- La seconde méthode de T. Yamashita et coll. et D. Wilson et coll.[21,22] nécessite l'introduction de moins de composantes mais permet de conserver une information chimique plus globale et toujours fiable.

Cette seconde méthode est appliquée à titre d'exemple à la désommation du doublet Fe2p de l'échantillon magn70 (figure II.7). Elle consiste à intégrer 3 composantes pour chacun des deux pics du doublet Fe2p (le doublet Fe2p étant composé du pic $Fe2p_{3/2}$ et du pic $Fe2p_{1/2}$ suite au couplage spin-orbite). On retrouve pour chacun des deux pics du doublet :

- Une composante pour le fer (II) en site octaédrique de la structure spinelle (en vert sur la figure II.7) à 709,5 eV ± 0,2 eV.
- Une composante pour le fer (III) en site octaédrique de la structure spinelle (en rouge sur la figure II.7) à 710,8 eV ± 0,2 eV.
- Une composante pour le fer (III) en site tétraédrique de la structure spinelle (en bleu sur la figure II.7) à 712,5 eV ± 0,2 eV.

A ces trois composantes principales sont associés deux pics satellites au fer (II) en violet et au fer (III) en jaune sur la figure II.7.

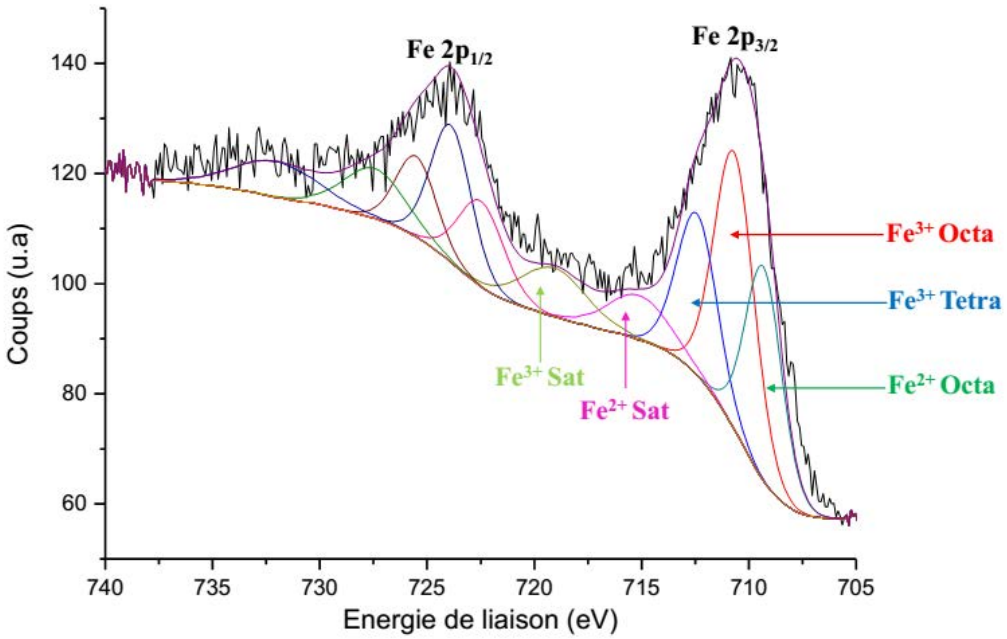


Figure II.7 : Spectre XPS Fe2p de magn70.

La grande complexité de la première méthode basée sur l'existence d'états finals différenciés ainsi que le fait d'avoir à décrire dans ce travail des nanomatériaux présentant un mélange de magnétite et de maghémite, nous a conduit à choisir la méthode de T. Yamashita et D. Wilson pour la désommation des spectres de tous nos échantillons.

Très clairement, les données de la littérature autour de la caractérisation XPS de nanoparticules de magnétite et de maghémite[23,24] confirment que l'analyse du spectre Fe2p est suffisant en premier lieu pour distinguer qualitativement les 2 formes d'oxyde de fer.

Sur les spectres Fe2p pour les échantillons de référence (figure II.8), deux observations majeures sont à considérer car elles permettent d'identifier clairement l'oxyde de fer en présence.

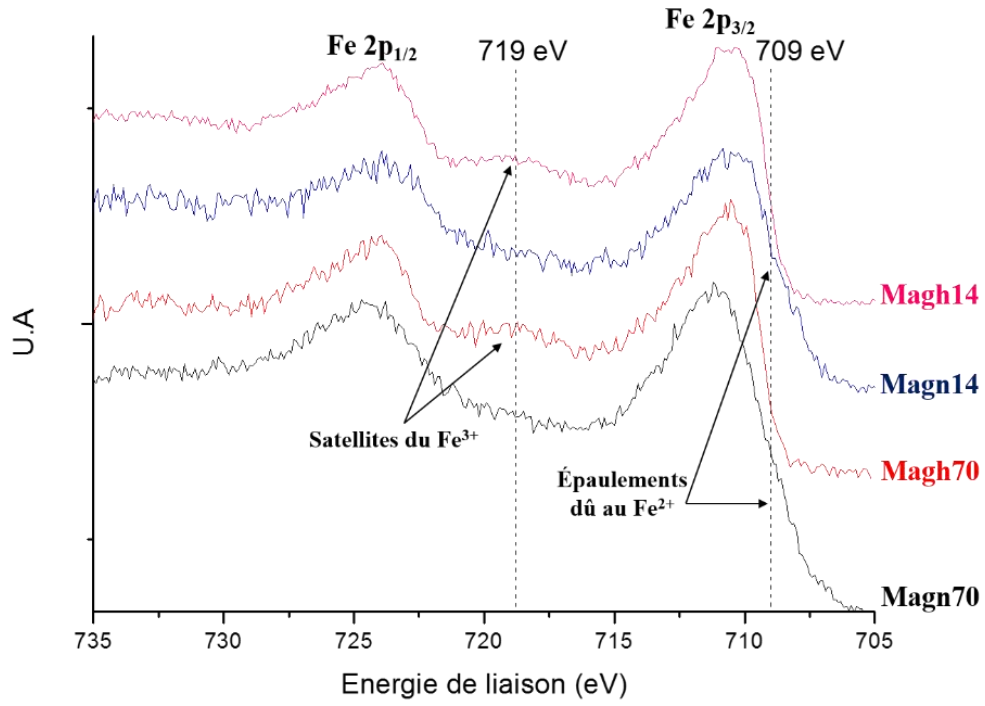


Figure II.8 : Spectres XPS Fe2p des 4 échantillons de référence de magnétite et de maghémite, Les repères en pointillés signalent le satellite Fe^{3+} à 719,0 eV et l'épaulement au pic $Fe2p_{3/2}$ associé au Fe^{2+} à 709,0 eV.

Sur les spectres de magh14 et de magh70, la présence du satellite Fe $^{3+}$ est visible à 719,0 ± 0,2 eV, entre les pics $2p_{3/2}$ et $2p_{1/2}$ du doublet. Il a été rapporté que ce satellite n'est perçu que dans le cas de la maghémite et qu'il est indiscernable dans le cas de magnétite pure du fait de l'élargissement des pics du doublet Fe2p et de la présence du satellite Fe^{2+} à 715,4 ± 0,2 eV[23,24]. Ceci tend donc à confirmer les résultats de DRX qui montrent que ces deux échantillons sont composés de maghémite. Sur les spectres de magn14 et magn70, ce satellite ne semble pas présent confirmant la composition de type magnétite de ces échantillons.

Par ailleurs, un épaulement visible vers les basses énergies de liaison du pic $2p_{3/2}$ (à 709,0 ± 0,2 eV), moins évident à observer sur la composante $2p_{1/2}$, est enregistré pour magn14 et magn70. Cet épaulement correspond à la composante du Fe^{2+} et représente donc la magnétite. Cet épaulement n'est pas visible sur les spectres de magh14 et magh70, ce qui est un élément supplémentaire pour certifier la présence de maghémite dans ces échantillons.

En se basant sur un protocole développé précédemment au sein du laboratoire IPREM [25] à partir de l'étude des enveloppes Fe2p de composés de référence ne contenant que du Fer II et

que du Fer III, le calcul du rapport Fe^{2+}/Fe_{total} donne une estimation plutôt précise du pourcentage de magnétite non oxydée présent dans chaque échantillon.

Pour cela, un unique pic est fixé en tant que composante du Fer (II), contrainte à une énergie de liaison de 709,4 eV avec une largeur à mi-hauteur de 2 eV (ces valeurs sont déduites de l'analyse de produits ne contenant que du fer II tels que $FeCl_2$, $4H_2O$).

Les autres composantes du pic $Fe2p_{3/2}$ (liées au Fe^{3+} en site octaédrique et au Fe^{3+} en site tétraédrique) sont ensuite ajustées de manière à ce que l'enveloppe totale simulée soit la plus proche possible du spectre expérimental.

L'estimation du rapport atomique (Fe^{2+}/Fe_{total}) est alors donnée par la formule suivante :

$$\frac{\%at\ Fe^{2+}}{\%at\ Fe_{total}} = \frac{(\mathrm{A}\left(Fe^{2+}\right) + \mathrm{A}\left(\mathrm{sat}\ Fe^{2+}\right))}{\left(A\left(Fe2p_{\frac{3}{2}}\right)^{\mathrm{tot}} + A\left(sat\ Fe2p_{\frac{3}{2}}\right)^{\mathrm{tot}}\right)} \qquad \textbf{[Équation II.5]}$$

Cette formule correspond donc au rapport de l'aire du pic d'ionisation $Fe2p_{3/2}$ de la contribution Fe^{2+} additionnée à l'aire du pic satellite Fe^{2+} sur l'aire totale de l'enveloppe $2p_{3/2}$ simulée et ses satellites.

Échantillon	Position Fe^{2+} octa (FWHM) (eV(eV))	Position Fe^{3+} octa (FWHM) (eV(eV))	Position Fe^{3+} tétra (FWHM) (eV(eV))	%Atomique Fe^{2+}/Fe_{total}	Estimation du % massique de magnétite
Magn70	709,4 (2,0)	710,7 (2,2)	712,4 (2,2)	0,33	98
Magh70	-	710,1 (2,2)	712,0 (2,7)	0	0
Magn14	709,4 (2,0)	710,8 (2,3)	712,6 (2,3)	0,32	97
Magh14	-	709,6 (2,2)	711,6 (2,8)	0	0

Tableau II.4 : Paramètres des pics associés aux trois contributions dans le doublet $Fe2p_{3/2}$ pour les échantillons de référence. Estimations du ratio Fe^{2+}/Fe_{total} et pourcentages massiques de magnétite calculés pour magn14 et magn70.

Dans les échantillons de magn14 et magn70, respectivement 97 % et 98% massique de magnétite sont estimés (tableau II.4), ce qui est cohérent avec la conservation de ces échantillons de référence en ampoule sous vide depuis leur synthèse sous atmosphère d'argon.

Si on s'intéresse aux valeurs des énergies de liaison de ces composantes, on constate une légère diminution des énergies associées aux composantes du Fe^{3+}_{tetra} et du Fe^{3+}_{octa} dans le cas des échantillons de maghémite. Ce décalage est dû à l'absence de la contribution associée au Fe^{2+} dans ces deux échantillons. Cela nous oblige lors de l'ajustement des deux composantes restantes à abaisser légèrement leurs énergies de liaison pour garder au maximum la cohérence entre l'enveloppe calculée et le spectre expérimental. Il est possible qu'un reste de

fer au degré d'oxydation II soit encore présent en très faible quantité. Cela expliquerait alors ce décalage.

Les spectres de l'orbitale O1s ont également été enregistrés. Ceux-ci peuvent nous renseigner sur l'état de surface des nanoparticules d'oxyde de fer de référence et notamment sur la présence d'eau, d'hydroxydes ou d'autres contaminations de surface éventuelles. Les spectres des orbitales O1s des nanoparticules de magnétite et de maghémite de 70 nm de référence sont présentés à titre d'exemple sur la figure II.9 ci-dessous. Le tableau II.5 reporte quant à lui les positions et les largeurs à mi-hauteur des différentes composantes des spectres O1s des nanoparticules de référence.

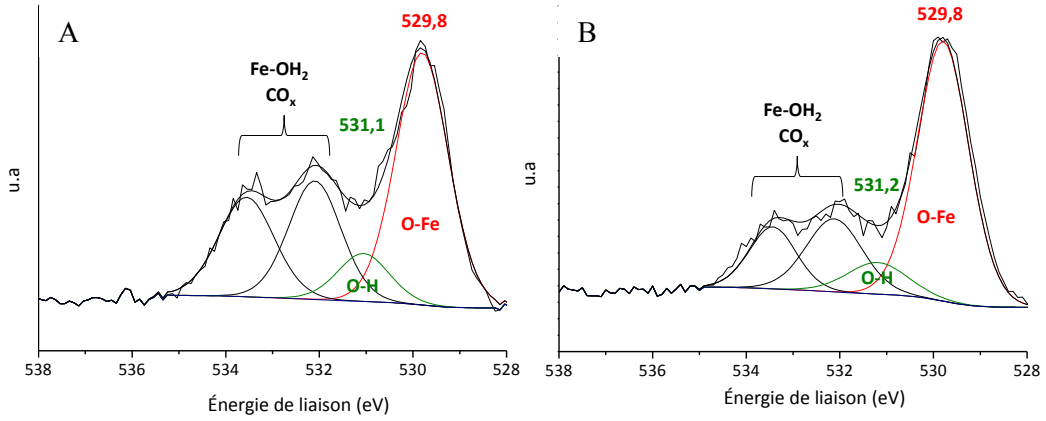


Figure II.9 : Spectres XPS O1s des nanoparticules de 70 nm de référence de magnétite (A) et de maghémite (B).

Échantillon	Position O-Fe (FWHM) (eV(eV))	Position Fe-OH (FWHM) (eV(eV))	Position Fe-OH_2 (FWHM) (eV(eV))	Position C-O_x (FWHM) (eV(eV))
Magn70	529,8 (1,3)	531,1 (1,2)	532,1 (1,3)	533,5 (1,4)
Magh70	529,8 (1,3)	531,2 (1,5)	532,1 (1,4)	533,4 (1,1)
Magn14	530,2 (1,7)	531,2 (1,3)	532,0 (1,4)	533,2 (1,3)
Magh14	530,0 (1,2)	531,1 (1,2)	532,1 (1,1)	533,5 (1,4)

Tableau II.5 : Paramètres des pics associés aux quatre contributions du spectre O1s pour les échantillons de magnétite et de maghémite de référence.

Sur ces deux spectres, quatre composantes sont visibles. Une première aux alentours de 530 eV correspond aux liaisons Fe-O de l'oxyde de fer. Une seconde composante aux alentours de 531 eV correspond aux groupements hydroxydes de surface. Deux autres composantes comprises entre 532 et 533,5 eV correspondent à des contaminations par l'eau atmosphérique et par des espèces carbonées qui peuvent subvenir avant l'introduction des échantillons dans la boîte à gants du spectromètre XPS.

Par comparaison des spectres avant et après le traitement thermique qui conduit à l'obtention de la maghémite, il est possible d'observer une diminution de l'intensité relative de la composante des hydroxydes de surface (531 eV) par rapport à celle de l'oxyde de fer de cœur (530 eV). En effet, le rapport des composantes Fe-O sur celle des composantes Fe-OH est de 5,5 pour la magnétite de 70 nm et de 7,5 pour la maghémite de 70 nm. De la même façon, l'intensité relative des composantes associées aux contaminations diminue après le traitement thermique. L'élévation de la température permet ainsi logiquement la déshydratation et la déhydroxylation de la surface des nanoparticules d'oxyde de fer.

2.2.4 Propriétés magnétiques

Afin de disposer d'une comparaison basée sur des nanoparticules et non pas sur les valeurs des composés massifs souvent rapportées dans la littérature[13,26], des cycles d'aimantation en fonction du champ (M vs H.) à 300K et des mesures d'aimantation en fonction de la température (ZFC/FC) ont été effectués. Sur la figure II.9 sont tracés les cycles d'aimantation en fonction du champ des échantillons de nanoparticules de référence.

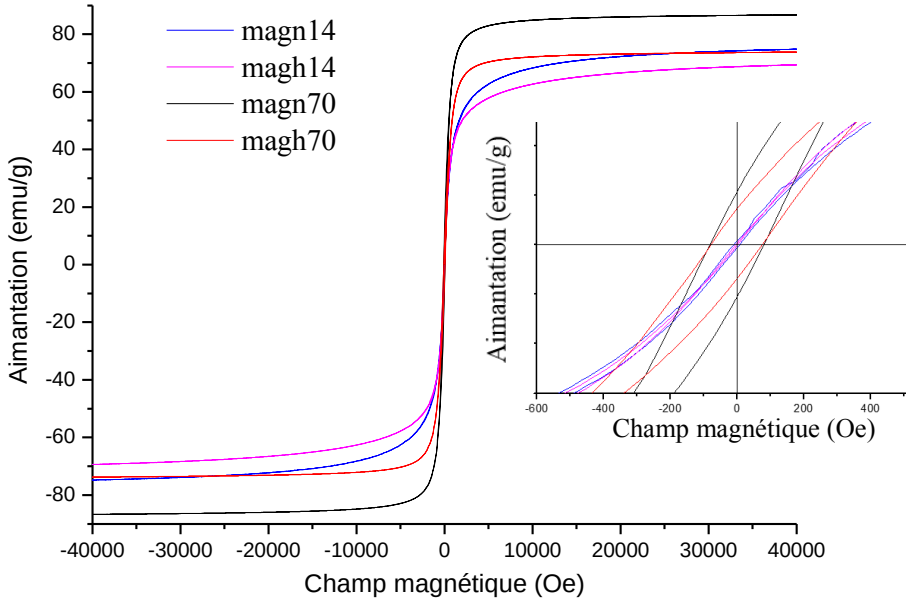


Figure II.9 : Cycles d'aimantation en fonction du champ appliqué à 300K pour les quatre échantillons de référence de magnétite et de maghémite. En insert l'agrandissement sur la plage de champ allant de -600 Oe à +600 Oe.

Les aimantations à saturation des NPs de 70 nm sont plus importantes que celles des NPs de 14 nm, et ce quelle que soit leur structure (magnétite ou maghémite). L'aimantation à

saturation passe de 86,0 ± 0,1 emu/g à 75,0 ± 0,1 emu/g pour la magnétite et de 73,7 ± 0,1 emu/g à 69,6 ± 0,1 emu/g pour la maghémite lorsque la taille diminue (tableau II.5). Cette variation est en accord avec les résultats de la littérature et s'explique par l'exaltation des effets de surface par diminution de la taille moyenne. Cela implique la présence en surface des nanoparticules d'atomes de fer dont les spins sont désorganisés diminuant ainsi l'aimantation à saturation des NPs[26,27]. Dans le cas des NPs de 70 nm, les valeurs de l'aimantation à saturation tendent vers les valeurs rencontrées pour les échantillons massifs, particulièrement dans le cas de la maghémite (92 emu/g pour la magnétite et 74 emu/g pour la maghémite[28]).

Échantillon	Aimantation à saturation (emu/g)	Champ coercitif (Oe)	Aimantation rémanente (emu/g)
Magn14	75,0 ± 0,1	-	-
Magh14	69,6 ± 0,1	-	-
Magn70	86,0 ± 0,1	80 ± 1	10,7 ± 0,1
Magh70	73,7 ± 0,1	76 ± 1	7,3 ± 0,1

Tableau II.5 : Tableau récapitulatif des données relatives aux propriétés magnétiques des échantillons de réference issues des cycles d'aimantation en fonction du champ.

De plus, magn14 et magh14 ne présentent pas d'ouverture de cycle induisant une aimantation rémanente et un champ coercitif nul. Les NPs de 14 nm sont donc superparamagnétiques en accord avec d'autres travaux[26,29].

Pour magn70 et magh70 respectivement, des ouvertures du cycle avec des champs coercitifs de 80 ± 1 Oe et 76 ± 1 Oe ainsi que des aimantations rémanentes de 10,7 ± 0,1 emu/g et de 7,3 ± 0,1 emu/g sont enregistrées. Les NPs de 70 nm sont ferrimagnétiques à 300 K. Ces résultats semblent en accord avec la bibliographie qui donne le diamètre limite pour que les NPs aient un comportement superparamagnétique de l'ordre de 20 nm ; le choix de ces deux tailles de référence permet bien de disposer d'échantillons de comparaison avec des comportements magnétiques différents associés à des compositions bien définies.

Les clichés de microscopie des nanoparticules magn70 (2.2.1) avaient soulevé une interrogation. Ceux-ci laissent en effet apparaître un contraste qu'on pourrait supposer être un contraste de surface résultant d'une couche oxydée et d'une structure cœur-coquille des nanoparticules. Afin de s'assurer de la nature des nanoparticules, des mesures magnétiques de cycles d'aimantation en fonction du champ à 4 K ont été effectuées sur un échantillon refroidi

sous un champ important (4 Tesla) (méthode en annexe A.1.4). En effet, il a été démontré [30–33] que ce type de mesure permettait la mise en évidence des interactions magnétiques d'échange entre deux phases distinctes typiques d'une structure cœur-coquille pour des nanoparticules. Ces interactions d'échange sont rendues visibles sur le cycle d'aimantation par un décalage du cycle d'hystérèse dans la direction opposée au champ appliqué pendant le refroidissement. Un champ d'échange nommé H_E peut alors être calculé pour quantifier cette interaction : $[H_E = (H_c^+ + H_c^-)/2]$ avec H_c^+ et H_c^- respectivement les champs coercitifs positifs et négatifs mesurés sur le cycle d'hystérèse à 4K dans le cas où l'échantillon est refroidi sous champ. Ces cycles d'hystérèse à 4 K sur l'échantillon magn70 refroidi avec (M vs H. 4K4T) et sans application (M vs H. 4K0T) d'un champ magnétique sont présentés figure II.10.

Le calcul de H_E conduit à une valeur de 3,5 Oe, négligeable par rapport à la précision de mesure de l'ordre de 5 Oe. De plus, aucune différence n'est constatée entre les cycles réalisées avec ou sans champ appliqué lors du refroidissement de l'échantillon. Ce résultat indique qu'il n'y a pas d'interactions d'échange dans notre échantillon magn70 et ainsi l'absence de structure cœur/coquille. Le contraste observé au MET (figure II.2) provient donc vraisemblablement d'une superposition de NPs ou du réglage du focus lors de l'enregistrement des images.

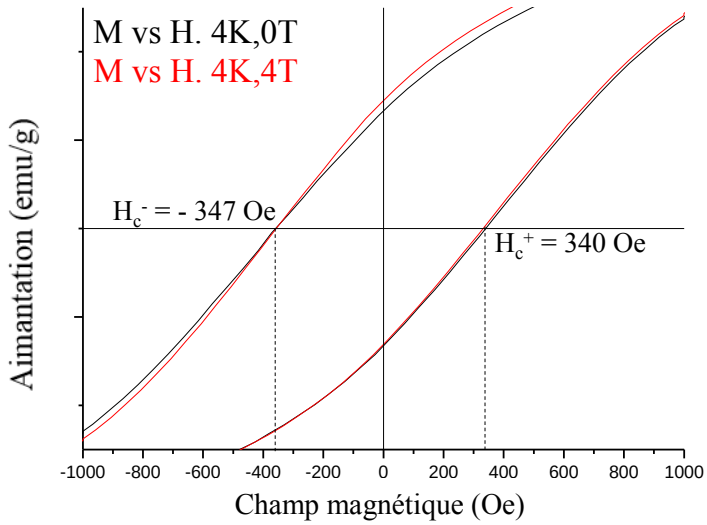


Figure II.10 : Cycles d'aimantation en fonction du champ à 4 K pour l'échantillon magn70 refroidi sous un champ de 0 Tesla (MvsH. 4K0T) et sous un champ de 4 Tesla (MvsH. 4K4T).

Les mesures d'aimantation en fonction du champ ZFC-FC réalisés sur des échantillons refroidis à 5K et sous un champ magnétique de 75 Oe sont présentées sur la figure II.11. Pour les NPs de 70 nm, le maximum de la courbe ZFC n'est pas atteint à 300K, ce qui est en adéquation avec le comportement ferrimagnétique. Dans le cas de magn70, un infléchissement de la courbe ZFC à T = 120K a lieu en accord avec la transition allotropique de Verwey[34]. En dessous de cette température, la structure de la magnétite devient monoclinique[34].

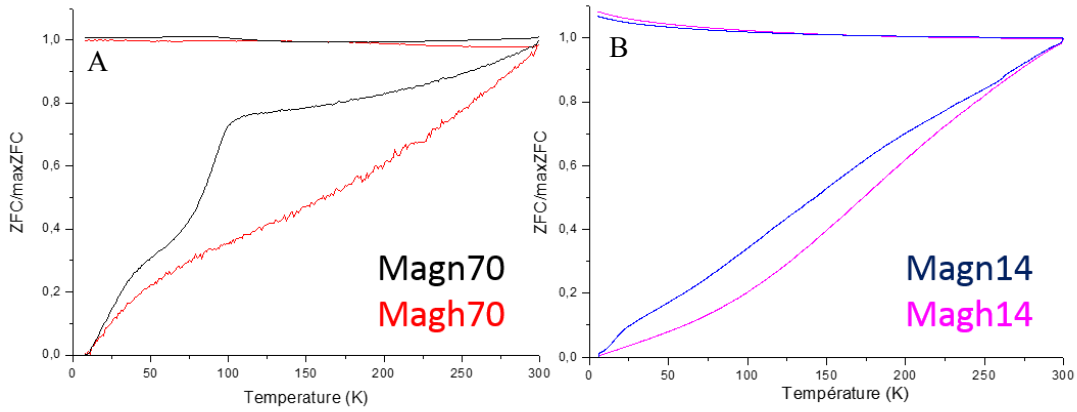


Figure II.11 : A) Courbes ZFC-FC de magn70 et magh70 et B) courbes ZFC-FC des échantillons magn14 et magh14 enregistrées sous un champ magnétique de 75 Oe.

Pour les NPs de 14 nm, la température de blocage correspondant au maximum de la courbe ZFC n'est pas atteinte avant 300K alors que ces échantillons sont d'après les cycles d'aimantation superparamagnétiques à 300K. Cette augmentation de la température de blocage pour un échantillon de nanoparticules de magnétite ou de maghémite a déjà été signalée[1,29,35] et se manifeste généralement pour des nanoparticules ayant des fortes interactions dipolaires entre elles. Or, nous avons pu déterminer que nos échantillons de NPs de 14 nm étaient agrégés, ce qui tend à augmenter les interactions dipolaires en diminuant fortement la distance entre les NPs. Ces interactions augmentent l'anisotropie magnétique des nanoparticules ainsi que leur température de blocage en augmentant la température à laquelle l'aimantation peut se retourner spontanément.

2.3 Caractérisation des ligands citrates

2.3.1 Spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier (FTIR)

Afin de connaître la localisation des bandes caractéristiques des fonctions chimiques de l'acide citrique et des citrates (acides carboxyliques/carboxylates et alcool) et de s'assurer de la pureté chimique de ces produits, des mesures par FTIR ont été effectuées. Ces mesures ont été réalisées à partir de poudres sèches directement déposées sur le cristal ATR et maintenues à son contact par une presse. Un spectromètre infrarouge Thermo-Nicolet 8700 fonctionnant en mode ATR a été utilisé.

Dans le cas de l'acide citrique, les bandes principales permettant son identification sont les élongations symétriques et asymétriques des liaisons O=C-O des groupements acides carboxyliques visibles à 1690 cm^{-1} et 1740 cm^{-1} ainsi que la bande correspondant aux liaisons O-H à 3500cm^{-1} (figure II.12).

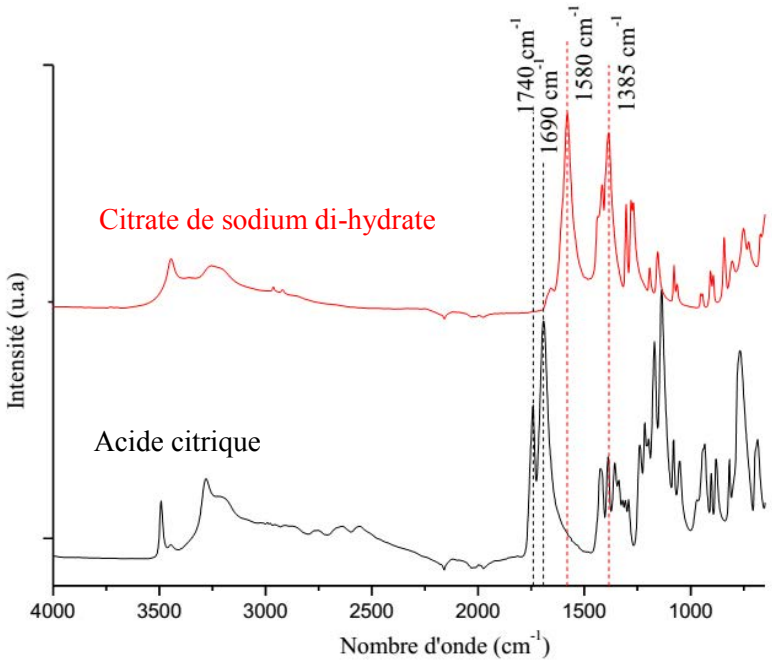


Figure II.12 : Spectres infrarouges de l'acide citrique et du citrate de sodium di-hydrate cristallisés.

Dans le cas du citrate de sodium, les bandes caractéristiques des élongations symétriques et asymétriques des groupements carboxylates sortent à des énergies de liaisons moins importantes à 1385 et 1580 cm^{-1}. L'intensité associée aux élongations O-H dans la zone de 3000 à 3500 cm^{-1} est moins marquée pour le citrate que pour l'acide citrique en relation avec une population moindre de fonctions hydroxyles.

2.3.2 Analyses thermogravimétriques (ATG)

Les températures de décomposition des ligands utilisés et le pourcentage total de perte de masse sont estimés sur la base de mesures thermogravimétriques (thermo balance Setaram) entre 25°C et 800°C. La vitesse de montée en température a été fixée à 10°C par minute. Les mesures ont été réalisées sous air avec un débit de 20 mL de gaz par minute. Les échantillons sont au préalable pesés avec une précision de ± 0,01 mg et introduits ensuite dans un creuset de platine.

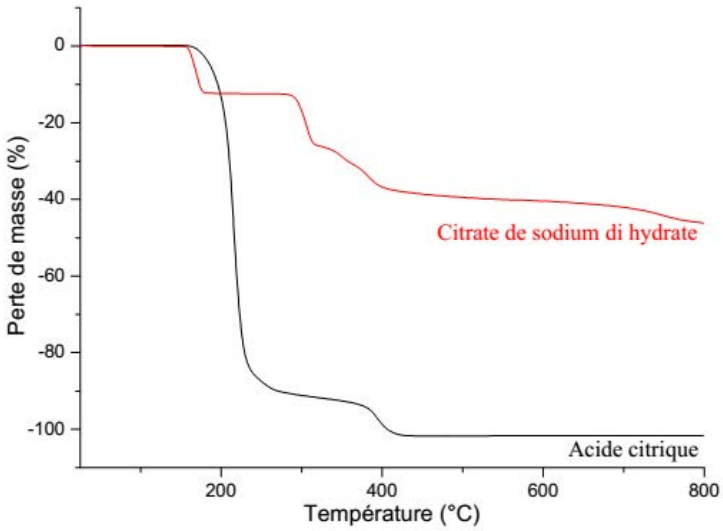


Figure II.13 : Thermogrammes sous air de l'acide citrique et du citrate de sodium di-hydrate de 25°C à 800°C.

Le thermogramme de l'acide citrique (figure II.13) permet de déterminer deux gammes de températures de perte de masse distinctes.

La première débute à T = 175°C (température théorique de début de décomposition de l'acide citrique) et se poursuit jusqu'à 260°C. La perte de masse est de 90%. Au cours de cette phase, les groupes acides carboxyliques et alcools présents vont subir une réaction de combustion sous air déclenchée par l'élévation de la température et se désolidariser de la structure carbonée centrale formant du dioxyde de carbone CO_2 et de l'eau H_2O.

La deuxième phase de décomposition débute vers de 350°C et se termine à 400°C. Cette étape correspond à la combustion des résidus de chaînes carbonées restantes. Ces dernières vont elles aussi réagir avec l'air lors de la combustion et former du CO_2. Le creuset de platine est complètement vide en fin d'analyse.

Dans le cas du citrate de sodium di-hydrate, trois étapes de décomposition sont enregistrées.

La première phase de 155°C à 180°C correspond à une perte de 12% de la masse totale qui correspond à l'évaporation des molécules d'eau intégrées dans la structure du ligand et

nécessitant donc plus d'énergie que des molécules d'eau libre pour passer à l'état gazeux. La deuxième étape de 280°C à 320°C liée à une perte de 14% de la masse initiale du produit correspond au départ d'un groupement CO_2. Enfin, une troisième réaction thermique entre 320°C et 790°C s'accompagne d'une perte de 20% de la masse totale.

À la fin de l'analyse, la masse finale est d'environ 55% de la masse initiale. Cette perte de masse totale est relativement faible en comparaison de la décomposition totale de l'acide citrique. En effet, le sodium présent dans le citrate de sodium ne sera pas éliminé dans cette gamme de température pour former de nouveaux composés tels que du carbonate de sodium stable jusqu'à 850°C.

2.3.3 Analyse en XPS du ligand citrate

Les molécules de citrate utilisées par la suite comme ligand ont été analysées par spectroscopie XPS sous la forme de citrate de sodium di-hydrate. Ces analyses permettent de disposer d'une référence XPS pour ce type de molécule, nécessaire aux interprétations des futures analyses conduites sur les nanoparticules fonctionnalisées en surface par des citrates. La figure II.14 suivante présente le spectre de l'orbitale O1s enregistré pour un échantillon de citrate de sodium di-hydrate.

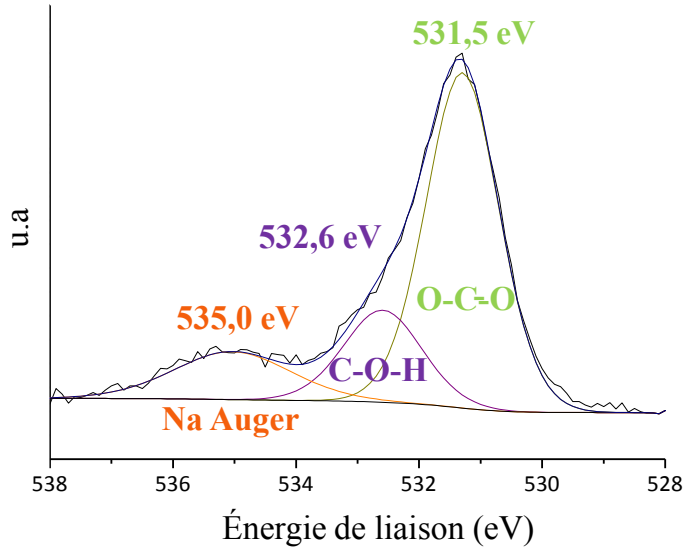


Figure II.14 : Spectre XPS de l'orbitale O1s du citrate de sodium di-hydrate.

Trois contributions importantes sont visibles sur ce spectre. Une première à 531,5 eV correspond aux liaisons carboxylates des citrates O-C=O. Une seconde à 532,6 eV correspond aux liaisons hydroxyles C-O-H des citrates. Il est à noter que le rapport d'intensité de la composante liée aux carboxylates divisée par l'intensité de la composante liée aux hydroxyles est toujours voisin de 3 en accord avec la structure des citrates. Le calcul de ce rapport d'intensité permettra par la suite une identification des citrates en surface des nanoparticules. Enfin, la troisième composante à 535,0 eV est la raie Auger du sodium.

2.4 Bilan

Grâce à cette étude préliminaire des nanoparticules d'oxyde de fer magnétiques de référence, nous disposons d'une base de comparaison à l'échelle nanométrique des propriétés morphologiques, structurales et magnétiques de la magnétite et de la maghémite.

Les deux méthodes de synthèse ont permis d'après les données couplées issues de la DRX et de l'XPS d'obtenir des nanoparticules de magnétite pure si celles-ci sont conservées à l'abri de toute trace d'oxygène avant analyse (ampoules scellées sous vide pour les mesures XPS) et des nanoparticules de maghémite totalement oxydées après traitement thermique.

Les répartitions de tailles des NPs de magn14 et magh14 sont plus étroites et plus proches des tailles obtenues pour les nanoparticules fonctionnalisées par des citrates que nous étudierons par la suite que celles de magn70 et magh70. C'est pourquoi les futures comparaisons seront sauf indication contraire faites par rapport aux références de 14 nm.

Les caractérisations de ces références d'oxyde de fer sous forme de nanoparticules vont servir de base de réflexion pour :

- L'estimation de la composition des futurs échantillons synthétisés du point de vue de leur structure cristallographique et de leur degré d'oxydation.
- La caractérisation des propriétés magnétiques. Notons sur ce point que l'aimantation à saturation peut être aisément déterminée par les cycles d'aimantation MvsH. En revanche, la température de blocage ne peut pas être déduite directement des courbes ZFC-FC du fait des interactions dipolaires existantes entre les nanoparticules non fonctionnalisées au sein d'un échantillon en poudre.

La caractérisation de l'acide citrique et du citrate de sodium di hydrate en ATG, FTIR et XPS a été effectué. Celle-ci permettra la mise en évidence de la présence des ligands citrates en surface des nanoparticules d'oxyde de fer et la détermination de la nature du lien chimique entre oxyde et ligand.

Références bibliographiques – Chapitre 2 :

1. Chatterjee, J., Haik, Y. & Chen, C.-J. Size dependent magnetic properties of iron oxide nanoparticles. *J. Magn. Magn. Mater.* **257,** 113–118 (2003).
2. Teja, A. S. & Koh, P.-Y. Synthesis, properties, and applications of magnetic iron oxide nanoparticles. *Prog. Cryst. Growth Charact. Mater.* **55,** 22–45 (2009).
3. Gupta, A. K. & Gupta, M. Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. *Biomaterials* **26,** 3995–4021 (2005).
4. David, I. & Welch, A. The Oxidation of Magnetite and Related Spinels - Constitution of Gamma Ferric Oxide. *Trans. Faraday Soc.* **52,** 1642–1650 (1956).
5. Massart, R. Preparation of Aqueous Magnetic Liquids in Alkaline and Acidic Media. *Ieee Trans. Magn.* **17,** 1247–1248 (1981).
6. Schwertmann, U. & Cornell, R. M. *Iron oxides in the laboratory: preparation and characterization*. (Wiley-VCH, 2000).
7. Ram. Sunanda J., A. M. D. Image processing with ImageJ. *Biophotonics Int.* **11,** 36–42 (2004).
8. Lefebure, S., Dubois, E., Cabuil, V., Neveu, S. & Massart, R. Monodisperse magnetic nanoparticles: Preparation and dispersion in water and oils. *J. Mater. Res.* **13,** 2975–2981 (1998).
9. Lee, J., Isobe, T. & Senna, M. Preparation of ultrafine Fe3O4 particles by precipitation in the presence of PVA at high pH. *J. Colloid Interface Sci.* **177,** 490–494 (1996).
10. Vayssieres, L., Chaneac, C., Tronc, E. & Jolivet, J. P. Size tailoring of magnetite particles formed by aqueous precipitation: An example of thermodynamic stability of nanometric oxide particles. *J. Colloid Interface Sci.* **205,** 205–212 (1998).
11. Mascolo, M. C., Pei, Y. & Ring, T. A. Room Temperature Co-Precipitation Synthesis of Magnetite Nanoparticles in a Large pH Window with Different Bases. *Materials* **6,** 5549–5567 (2013).
12. Massart, R. & Cabuil, V. Effect of Some Parameters on the Formation of Colloidal Magnetite in Alkaline-Medium - Yield and Particle-Size Control. *J. Chim. Phys. Phys.-Chim. Biol.* **84,** 967–973 (1987).
13. Yoon, K. Y., Xue, Z., Fei, Y., Lee, J. H., Cheng, V., Bagaria, H. G., Huh, C., Bryant, S. L., Kong, S. D., Ngo, V. W., Rahmani, A.-R., Ahmadian, M., Ellison, C. J. & Johnston, K. P. Control of magnetite primary particle size in aqueous dispersions of nanoclusters for high magnetic susceptibilities. *J. Colloid Interface Sci.* **462,** 359–367 (2016).
14. Herve, K., Douziech-Eyrolles, L., Munnier, E., Cohen-Jonathan, S., Souce, M., Marchais, H., Limelette, P., Warmont, F., Saboungi, M. L., Dubois, P. & Chourpa, I. The development of stable aqueous suspensions of PEGylated SPIONs for biomedical applications. *Nanotechnology* **19,** 465608 (2008).
15. Park, S., Kim, H. S., Kim, W. J. & Yoo, H. S. Pluronic@Fe3O4 nanoparticles with robust incorporation of doxorubicin by thermo-responsiveness. *Int. J. Pharm.* **424,** 107–114 (2012).
16. Kalska-Szostko, B., Wykowska, U., Satula, D. & Nordblad, P. Thermal treatment of magnetite nanoparticles. *Beilstein J. Nanotechnol.* **6,** 1385–1396 (2015).
17. Charlotte Vichery. Procédé de recuit protégé appliqué à des nanoparticules d'oxyde de fer : étude des relations structure / propriétés magnétiques. (2012).
18. Pierre Gravereau. *Introduction `a la pratique de la diffraction des rayons X par les poudres*. (2011).
19. Grosvenor, A. P., Kobe, B. A., Biesinger, M. C. & McIntyre, N. S. Investigation of multiplet splitting of Fe 2p XPS spectra and bonding in iron compounds. *Surf. Interface Anal.* **36,** 1564–1574 (2004).
20. Gupta, R. & Sen, S. Calculation of Multiplet Structure of Core Para-Vacancy Levels. *Phys. Rev. B* **10,** 71–77 (1974).
21. Wilson, D. & Langell, M. A. XPS analysis of oleylamine/oleic acid capped Fe3O4 nanoparticles as a function of temperature. *Appl. Surf. Sci.* **303,** 6–13 (2014).
22. Yamashita, T. & Hayes, P. Analysis of XPS spectra of Fe2+ and Fe3+ ions in oxide materials. *Appl. Surf. Sci.* **254,** 2441–2449 (2008).

23. JianHan, X., Hui, S., Wei, Z., Yi, L., JiaXin, D. & Gunther, B. Surface chemistry of nanoscale Fe3O4 dispersed in magnetic fluids. *Sci. China Ser. B-Chem.* **50,** 754–758 (2007).
24. Daou, T. J., Begin-Colin, S., Greneche, J. M., Thomas, F., Derory, A., Bernhardt, P., Legare, P. & Pourroy, G. Phosphate adsorption properties of magnetite-based nanoparticles. *Chem. Mater.* **19,** 4494–4505 (2007).
25. Grissa Rabeb. Apport de la Spectroscopie Photoélectronique à rayonnement X à l'étude de nouveaux matériaux d'électrodes pour microbatteries au lithium. (2017).
26. Sondjaja, R., Hatton, T. A. & Tam, M. K. C. Clustering of magnetic nanoparticles using a double hydrophilic block copolymer, poly(ethylene oxide)-b-poly(acrylic acid). *J. Magn. Magn. Mater.* **321,** 2393–2397 (2009).
27. HongZhang, Q., Biao, Y., ChengKui, L. & Wei, L. Synthesis and characterization of water-soluble magnetite nanocrystals via one-step sol-gel pathway. *Sci. China-Phys. Mech. Astron.* **54,** 1239–1243 (2011).
28. Ho, D., Sun, X. & Sun, S. Monodisperse Magnetic Nanoparticles for Theranostic Applications. *Acc. Chem. Res.* **44,** 875–882 (2011).
29. Sreeja, V. & Joy, P. A. Effect of inter-particle interactions on the magnetic properties of magnetite nanoparticles after coating with dextran. *Int. J. Nanotechnol.* **8,** 907–915 (2011).
30. Pichon, B. P., Gerber, O., Lefevre, C., Florea, I., Fleutot, S., Baaziz, W., Pauly, M., Ohlmann, M., Ulhaq, C., Ersen, O., Pierron-Bohnes, V., Panissod, P., Drillon, M. & Begin-Colin, S. Microstructural and Magnetic Investigations of Wustite-Spinel Core-Shell Cubic-Shaped Nanoparticles. *Chem. Mater.* **23,** 2886–2900 (2011).
31. Meiklejohn, W. H. & Bean, C. P. New Magnetic Anisotropy. *Phys. Rev.* **102,** 1413–1414 (1956).
32. Walid Baaziz. Synthèse et caractérisation des nanoparticules spinelles et coeur-coquille à base d'oxyde de fer et de cobalt. (Starsbourg, 2011).
33. Ourry, L., Mammeri, F., Toulemon, D., Gaudisson, T., Delamar, M. & Ammar, S. A tandem polyol process and ATRP used to design new processable hybrid exchange-biased CoxFe3−xO4@CoO@PMMA nanoparticles. *RSC Adv.* **6,** 49973–49979 (2016).
34. Julie Bowles, M. J. Interpretation of low-temperature data part III : The magntite Verwey Transition (part A). *IRM Q.* **20,** (2011).
35. Sreeja, V., Jayaprabha, K. N. & Joy, P. A. Water-dispersible ascorbic-acid-coated magnetite nanoparticles for contrast enhancement in MRI. *Appl. Nanosci.* **5,** 435–441 (2015).

Chapitre 3 : Synthèse et caractérisation des nanoparticules d'oxyde de fer fonctionnalisées par des ligands citrates (NPs@Cit)

3.1 Synthèse et lavage des NPs@Cit 75

3.1.1 Protocole standard de synthèse des NPs@Cit 75

3.1.2 Protocoles de lavage des NPs@Cit 78

3.1.3 Plan d'expérience 81

3.2 Influence des paramètres de synthèse sur la taille et la structure des NPs@Cit 82

3.3 Influence des paramètres de synthèse sur l'état d'agrégation des nanoparticules en suspension aqueuse et le taux de ligand 91

3.3.1 Comparaison MET/DLS : mesure du rayon hydrodynamique 91

3.3.2 Caractérisation de la surface des nanoparticules 93

3.3.3 Mesure du taux de ligand 99

3.3.4 Relation entre taux de ligand et rayon hydrodynamique. 102

3.4 Influence de la taille et du taux de ligand sur la composition des NPs@Cit 104

3.5 Influence de la taille et du taux de ligand sur les propriétés magnétiques 116

3.5.1 Cycles d'aimantation en fonction du champ. 116

3.5.2 Mesure de l'aimantation en fonction de la température (ZFC/FC) 119

3.6 Bilan 122

Références bibliographiques – Chapitre 3

Chapitre 3 : Synthèse et caractérisation des nanoparticules d'oxyde de fer fonctionnalisées par des ligands citrates (NPs@Cit)

Dans le chapitre 2, il a été montré que les nanoparticules d'oxyde de fer (magnétite ou maghémite) ont une forte tendance à s'agréger rapidement en suspension à pH = 7,0. Afin de stabiliser les NPs en suspension, nous avons fait le choix de greffer un ligand de type citrate. Ce dernier présente de nombreuses unités chimiques fonctionnelles -COOH et -OH disponibles et est non toxique et facile d'accès.

Les ligands citrates doivent permettre d'éviter l'agrégation des NPs d'oxyde de fer, de les rendre biocompatibles et même de contrôler leurs propriétés. Ces ions citrates seront, selon les synthèses, introduits dans le milieu réactionnel sous forme d'acide citrique (CAS : 77-92-9) ou de citrate de sodium di-hydrate (CAS 6132-04-3).

Dans un premier temps, la synthèse, le lavage et la caractérisation de nanoparticules d'oxyde de fer fonctionnalisées par des citrates seront exposés. Puis, l'influence des différents paramètres de synthèse liés à l'ajout d'ions citrates dans le milieu réactionnel sur les caractéristiques (notamment la taille, l'état d'agrégation, la composition et les propriétés magnétiques finales) des suspensions de nanoparticules obtenues sera présentée.

3.1 Synthèse et lavage des NPs@Cit

3.1.1 Protocole standard de synthèse des NPs@Cit

Les nanoparticules d'oxyde de fer citratées (notées NPs@Cit) ont été synthétisées par la méthode de co-précipitation basique[1], à la différence près que des ions citrates ont été ajoutés au milieu réactionnel soit par l'ajout d'acide citrique soit par l'ajout de citrate de sodium di-hydrate.

L'objectif de cet ajout est double, d'une part stabiliser les NPs en suspension et limiter l'agrégation et d'autre part contrôler leurs caractéristiques physicochimiques et leurs propriétés magnétiques. L'utilisation du citrate en tant que ligand pour stabiliser divers types de nanoparticules en suspension aqueuse a fait l'objet de nombreux travaux[2,3] en relation avec son affinité pour la surface d'oxyde de fer des nanoparticules et sa toxicité négligeable. Le contrôle de la taille des NPs par ajout de ligand a déjà été mis en évidence par A. Bee et R. Massart[4] par la synthèse de nanoparticules par co-précipitation en présence d'une quantité variable de citrate. Cependant, le citrate est dans leur étude ajouté systématiquement avant la germination des nanoparticules et seul le rapport fer/citrate est étudié.

Deux principaux paramètres ont été pris en compte dans le cadre de notre étude :

- L'influence du rapport molaire noté RM : RM = $n_{(Fe)}/n_{(Ligand)}$ avec $n_{(Fe)}$ le nombre de moles de fer et $n_{(ligand)}$ le nombre de moles d'ions citrates introduites dans le milieu réactionnel.

- L'influence du moment d'ajout du ligand dans le milieu réactionnel noté MA. Il correspond au temps, exprimé en secondes, entre l'ajout de la base qui déclenche le début de la germination et l'ajout du ligand dans le milieu réactionnel.

La nomination des échantillons RMx-MAy avec x le rapport molaire fer/ligand (sans unité) compris entre 1 et 24 et y le moment d'ajout (en secondes) compris entre 0 et 4800 s sera adoptée pour la suite.

Le dispositif de synthèse est similaire à celui décrit dans le chapitre précédent pour la synthèse de nanoparticules de magnétite de 14 nm. La seule différence notable est que la réaction est effectuée dans un ballon mono-col fermé pendant toute la durée de la synthèse. Le bouchon est percé d'une aiguille permettant l'évacuation de la surpression à l'intérieur du ballon (causée par l'élévation de la température). Le protocole de synthèse est légèrement différent selon que l'ajout de ligand ait lieu avant la germination (comme c'est le cas quand MA = 0 s) ou après la germination (MA est alors compris entre 10 et 4800 s). Ces deux protocoles sont détaillés ci-dessous.

Lorsque MA est compris entre 10 et 4800 s :

1,0 mg de chlorure de fer (II) tetrahydraté ($FeCl_2$, 4 H_2O. Numéro CAS : 13478-10-9) et 2,4 mg de chlorure de fer (III) hexahydraté ($FeCl_3$, 6 H_2O. Numéro CAS : 10025-77-1) sont dissous dans 40 mL d'eau ultrapure par agitation magnétique.

Cette solution est introduite dans un ballon mono-col immédiatement obturé par un bouchon à jupe. Le ballon est alors fixé au moyen d'une potence de manière à être immergé dans un bain-marie d'huile chauffé à 80°C dont la température est contrôlée.

Une fois le mélange à la température souhaitée toujours sous agitation magnétique, la germination est déclenchée par l'ajout de 10 mL d'une solution d'hydroxyde d'ammonium (NH_4OH, 25% NH_3. Numéro CAS : 1336-21-6). Le pH du milieu réactionnel varie alors de

1,0-1,5 à 9,5-10,0. La réaction est clairement observée par l'apparition dans le ballon de particules noires dans la solution initialement jaune-orangée.

Après un temps compris entre 10 et 4800 secondes en fonction de la valeur de MA choisie pour la synthèse, une quantité déterminée (en fonction de la valeur de RM choisie pour la synthèse) d'acide citrique (CAS : 77-92-9), préalablement mise en solution dans 5 mL d'eau ultrapure par agitation magnétique, est ajoutée au milieu réactionnel. Le tableau III.1 recense les masses et nombres de moles des précurseurs ferreux et ferriques introduits en début de synthèse, la quantité de base nécessaire à la germination et les proportions de ligand introduites en fonction du rapport molaire fer/ligand (RM) souhaité. Comme dans le cas de la synthèse des nanoparticules de magnétite de 14 nm de référence, un léger excès de fer II (de l'ordre de 10%) par rapport au ratio de fer II dans la magnétite pure est introduit afin d'assurer que la stœchiométrie fer(II)/ fer(III) de la magnétite soit respectée dans le cas ou les chlorure d fer II utilisé serait légèrement oxydé pendant son stockage.

Rapport molaire fer / ligand	**$FeCl_2$, 4 H_2O M = 198,81 g/mol**	**$FeCl_3$, 6 H_2O M = 270,3 g/mol**	**NH_4OH M = 35,05 g/mol**	**Acide citrique**
1	1,00 ± 0,01 g	2,40 ± 0,01 g	10,0 ± 0,1 mL	2,67 ± 0,01 g (13,91 mmol)
2	1,00 ± 0,01 g	2,40 ± 0,01 g	10,0 ± 0,1 mL	1,34 ± 0,01 g (6,95 mmol)
4	1,00 ± 0,01 g	2,40 ± 0,01 g	10,0 ± 0,1 mL	0,67 ± 0,01 g (3,48 mmol)
8	1,00 ± 0,01 g	2,40 ± 0,01 g	10,0 ± 0,1 mL	0,33 ± 0,01 g (1,74 mmol)
16	1,00 ± 0,01 g	2,40 ± 0,01 g	10,0 ± 0,1 mL	0,17 ± 0,01 g (0,87 mmol)
24	1,00 ± 0,01 g	2,40 ± 0,01 g	10,0 ± 0,1 mL	0,08 ± 0,01 g (0,58 mmol)

Tableau III.1 : Bilan des masses de précurseurs ferreux et ferriques, du volume d'ammoniaque et des masses et nombres de moles de ligand (acide citrique) utilisés pour les synthèses avec différents RM.

Lorsque MA = 0 s :

Un protocole légèrement différent des autres est appliqué afin que le ligand soit présent avant la germination. Après la dissolution des précurseurs dans un ballon mono-col contenant 40 mL d'eau ultrapure, une quantité définie de citrate de sodium (CAS 6132-04-3) dépendant du RM souhaité, est mise en solution dans 5 mL d'eau ultrapure puis directement ajoutée au ballon. La couleur de la solution passe du jaune orangé à un jaune verdâtre.

L'utilisation du citrate de sodium à la place de l'acide citrique pour ce type de synthèse vise à conserver un volume de base identique à celui des autres synthèses sans modifier de manière

significative le pH de la solution au moment de la germination. La figure III.1 présente de manière schématique la progression des gammes de pH effectuées aux différents stades de la réaction. Ces tests préliminaires ont conduit au remplacement de l'acide citrique par le citrate de sodium pour ce type de synthèse afin de garder un pH de précipitation aux alentours de 9,5.

Une fois le mélange précurseur/ligand stabilisé à la température de 80°C, une quantité d'ammoniaque identique à celle utilisée pour le protocole précédent est ajoutée au milieu réactionnel. Cet ajout conduit à une augmentation nette du pH de 1,5-2,0 à 9,5-10. La germination des nanoparticules d'oxyde de fer devient rapidement visible par l'apparition d'une importante quantité de précipité noir dans la solution.

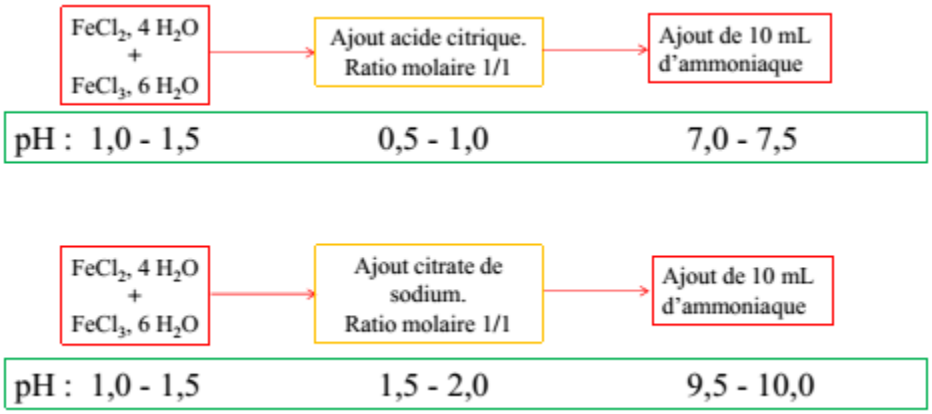


Figure III.1 : Schéma des tests de mesure du pH préliminaires à la modification du protocole de synthèse lorsque le ligand est ajouté dans le milieu avant la base avec un rapport molaire de 1.

3.1.2 Protocoles de lavage des NPs@Cit

Comme nous l'avons vu dans le premier chapitre (I.3), le lavage des nanoparticules par séparation magnétique présente l'avantage d'être rapide, simple à mettre en œuvre et d'éliminer les éventuels sous-produits non magnétiques. Cette méthode permet également de limiter la perte excessive de ligands de surface qui peut se produire lors de l'utilisation des méthodes basées sur la filtration (ultrafiltration, dialyse). Toutefois, cette méthode de séparation n'éliminera pas d'éventuels agrégats formés pendant la synthèse (par exemple à cause de l'utilisation d'un barreau magnétique pour l'agitation) et présents en suspension aqueuse. C'est pourquoi une centrifugation à faible vitesse (1000 tours par minutes) est

effectuée avant la séparation magnétique dans le but d'éliminer ces éventuels gros agrégats de la suspension.

Afin d'étudier l'influence des paramètres de synthèse en s'affranchissant de l'influence de la méthode de lavage, le même protocole a été utilisé pour tous les échantillons lorsque cela était possible. En effet, pour les plus petites nanoparticules, la méthode magnétique s'est avérée inefficace pour séparer les nanoparticules de la suspension dans des temps raisonnables et ce même en utilisant un puissant aimant permanent en alliage néodyme-fer-bore. Dans ce cas uniquement, une autre méthode (SSP, décrite partie I.3) basée sur la déstabilisation des nanoparticules par l'ajout d'éthanol dans le milieu, est utilisée en complément de la séparation magnétique.

La suspension de NPs@Cit est récupérée et transférée dans des tubes à centrifugation. La suspension est fortement basique (pH = 9,5) et « riche » en ions parasites notamment les ions ammonium provenant de l'ammoniaque, les chlorures provenant des réactifs et éventuellement le sodium si le citrate de sodium est utilisé comme ligand. Le protocole de lavage des échantillons schématisé en figure III.2 a été perfectionné au cours de ce travail de thèse. La version aboutie comporte trois phases :

Phase 1 : une centrifugation de 5 minutes à 10000 tours par minute (11400 g) est effectuée pour récupérer les NPs@Cit dans le culot du tube. Le surnageant riche en ions parasites et ayant un pH élevé est éliminé tandis que le culot est remis en suspension dans 20 mL d'eau ultrapure par agitation et sonication dans un bain à ultrason (35kHz, 400W) jusqu'à la dispersion totale des nanoparticules.

Phase 2 : une centrifugation de la suspension de 5 minutes à 1000 tours par minute (115 g) est effectuée. Cette centrifugation a pour but d'éliminer les gros agrégats qui peuvent parfois se former pendant la synthèse. Seul le surnageant de couleur noire opaque est cette fois récupéré, le culot contenant les gros agrégats est quant à lui écarté.

Phase 3 : Celle-ci est fonction de la taille des NPs@Cit. Le protocole de cette phase a été déterminé de manière empirique au cours des premières synthèses et dépend du diamètre moyen des NPs@Cit :

- Si le diamètre est supérieur ou égal à 7 nm : 2 séparations magnétiques sont effectuées à l'aide d'un aimant permanent ($Nd_2Fe_{14}B$) pendant 1 heure. Après la première séparation

magnétique, la quasi-totalité des nanoparticules est accumulée contre la paroi du récipient, le surnageant peut alors être éliminé. L'aimant est alors retiré et les NPs@Cit sont dispersées à nouveau par agitation et sonication dans 20 mL d'eau ultrapure. Une deuxième séparation magnétique d'une heure est alors effectuée. Une vérification par DRX de l'absence d'impureté cristallisée est effectuée systématiquement et des mesures en DLS du diamètre hydrodynamique de nanoparticules en suspension permettent de s'assurer de l'absence de gros agglomérats.

- Si le diamètre est inférieur ou égal à 7 nm : 2 centrifugations sont effectuées après ajout à la suspension de NPs@Cit d'un volume d'éthanol équivalent au volume d'eau. Cet ajout d'éthanol change l'apparence et la coloration de la suspension qui passe de noir intense à grisâtre avec une tendance visible à l'agrégation des nanoparticules. Deux cycles de centrifugation de 10 minutes à 15000 tours par minute (25000 g) suivis de la dispersion des nanoparticules dans un mélange 50/50 eau/éthanol sont alors réalisés pour compléter le lavage de l'échantillon.

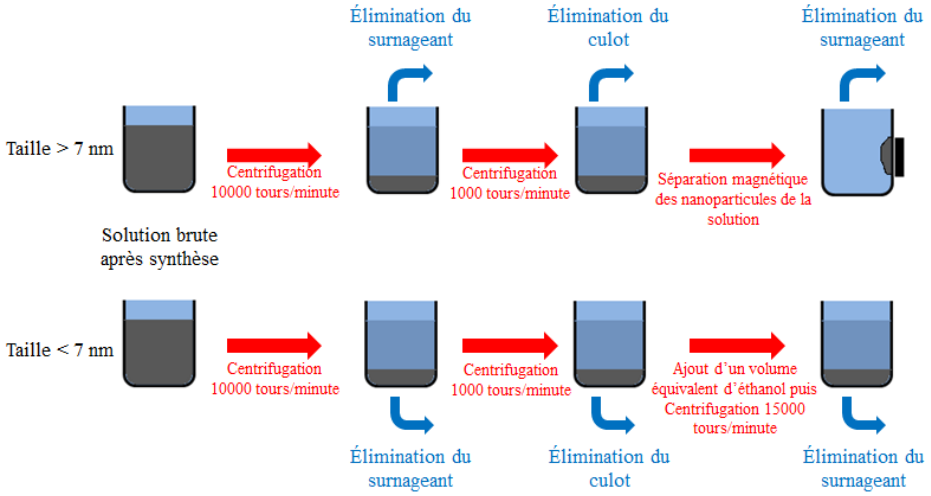


Figure III.2 : Protocoles de lavage des échantillons dans le cas de nanoparticules de tailles moyennes supérieures ou inférieures à 7 nm.

Le lavage terminé, l'échantillon est dispersé dans 50 mL d'eau ultrapure et stocké dans des flacons en plastique (polyéthylène) à l'abri de la lumière. L'utilisation de flacons en plastique pour le stockage des échantillons a ici son importance. En effet, il a été observé que les échantillons de nanoparticules citratées dispersées dans l'eau avaient tendance à s'agréger en se déposant contre les parois des récipients en verre au fil des semaines de conservation. De la

même manière, nous avons constaté que l'exposition des échantillons à la lumière sur des périodes de temps importantes augmentait également la vitesse d'agrégation.

Un aliquot de 5 mL de chaque échantillon est prélevé pour être évaporé sous vide afin d'obtenir une poudre stockée ensuite (dessiccateur sous vide ou pilulier étanche fermé et filmé) pour les méthodes d'analyses nécessitant un échantillon sous cette forme.

3.1.3 Plan d'expérience

Un plan d'expérience (plan à niveaux mixtes) à double entrée comprenant deux facteurs de 6 et 10 niveaux a été établi afin d'étudier l'influence du rapport molaire RM = $\frac{n(Fe)}{n(Citrate)}$ ainsi que l'influence du moment d'ajout du ligand dans le milieu MA sur la morphologie, la taille, l'état d'agrégation en suspension, la composition des nanoparticules synthétisées et les propriétés magnétiques, les deux variables essentielles du plan étaient :

- RM = $\frac{n(Fe)}{n(Citrate)}$ qui peut prendre les 6 niveaux : 1, 2 ,4, 8, 16, 24.
- MA qui peut prendre les 10 niveaux : 0, 10, 60, 300, 600, 900, 1200, 1800, 2400, 4800 s.

Le nombre d'essais est égal à (nombre de niveaux du facteur 1) * (nombre de niveaux du facteur 2) soit 6*10 = 60 essais.

Le tableau d'expérimentation (tableau III.2) a été complété tout au long du travail de thèse, certains points ont fait l'objet de plusieurs synthèses afin d'en vérifier la reproductibilité. Trois RM (les deux RM extrêmes et un RM central) ainsi que trois MA (0, 10 et 900 s qui comme nous le verrons sont des moments d'ajout clés) ont été complètement exploités.

RM MA	1	2	4	8	16	24
0 s	X	X	X	X	X	X
10 s	X	X	X	X	X	X
60 s	X			X		X
300 s	X			X		X
600 s	X			X		X
900 s	X	X	X	X	X	X
1200 s	X	X		X		X
1800 s	X			X		X
2400 s	X	X		X		X
4800 s	X			X		X

Tableau III.2 : Tableau d'expérimentation présentant les échantillons synthétisés en fonction des deux paramètres étudiés (RM et MA).

3.2 Influence des paramètres de synthèse sur la taille et la structure des NPs@Cit

Des observations par microscopie électronique à transmission (MET) ont été systématiquement effectuées dans les 24 heures après le lavage. Les observations ont été menées avec le même microscope et selon le même protocole que pour les échantillons de référence comme décrit au chapitre 2. Le tableau III.3 représente les images MET de 12 échantillons pour les RM 1, 8 et 24 et des MA de 0, 10, 900 et 1800 secondes. À titre d'exemple, un histogramme de répartition des tailles des nanoparticules pour l'échantillon RM1-MA900 est également présenté (figure III.3). Ces histogrammes sont réalisés par la mesure manuelle d'un minimum de 200 nanoparticules sur les micrographies MET.

Quels que soient les RM et MA, les nanoparticules fonctionnalisées par des citrates (NPs@Cit) ont une forme sphérique. Les valeurs de taille moyenne et d'écart-type des distributions de tous les échantillons déduits des histogrammes de répartition de taille ont été reportées dans le tableau III.4.

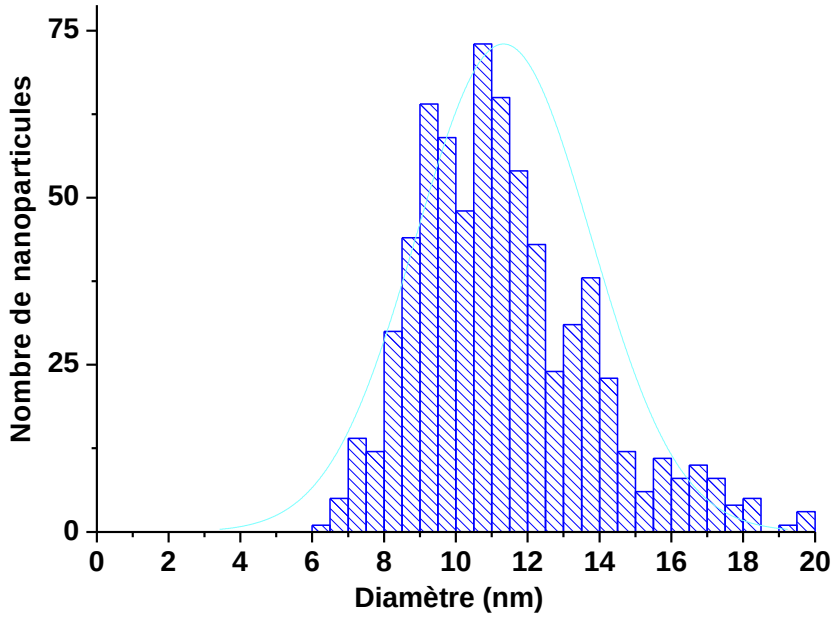


Figure III.3 : Exemple d'histogramme de répartition des tailles des nanoparticules pour l'échantillon RM1-MA900.

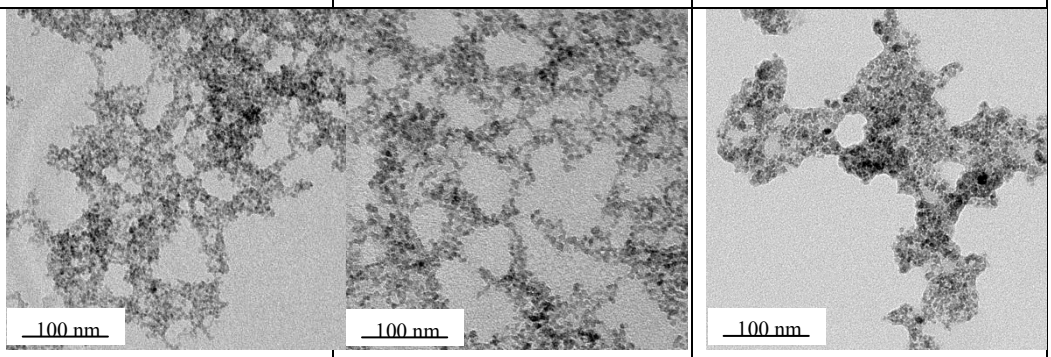
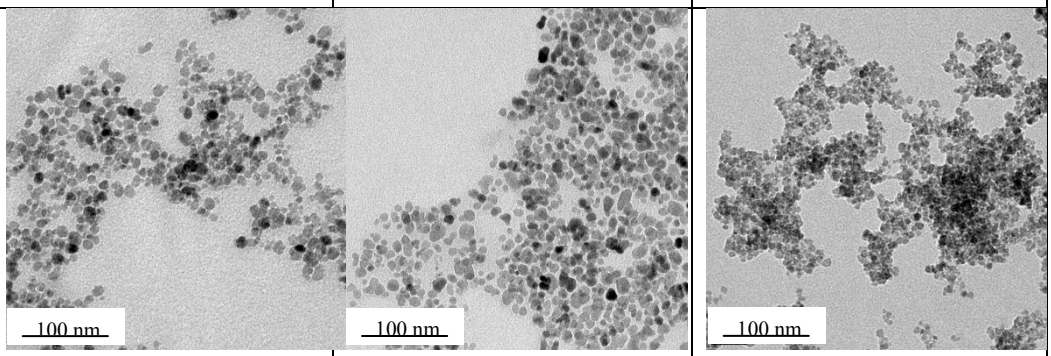
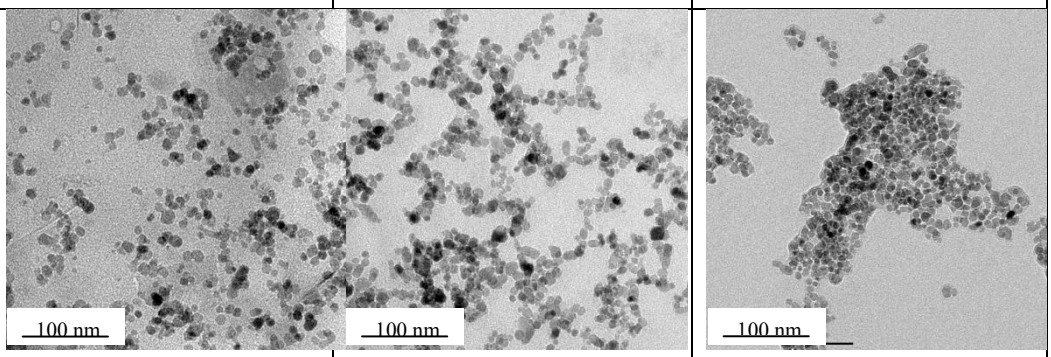
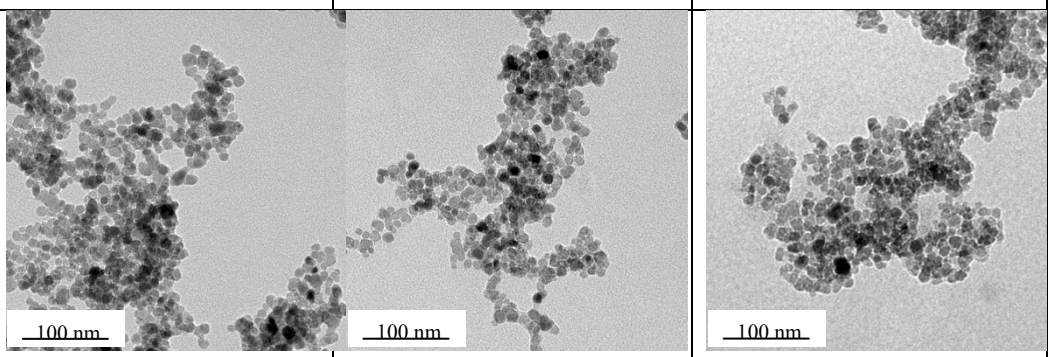
RM / MA	RM = 1	RM = 8	RM = 24
MA = 0 s			
MA = 10 s			
MA = 900 s			
MA = 1800 s			

Tableau III.3 : Clichés de microscopie électronique montrés à titre d'exemple pour des RM 1, 8 et 24 et des MA de 0, 10, 900 et 1800 s.

RM / MA	1	2	4	8	16	24
0 s	4,2 ± 0,6 nm	4,2 ± 0,5 nm	4,0 ± 0,6 nm	4,5 ± 0,6 nm	4,3 ± 0,5 nm	5,6 ± 1,7 nm
10 s	8,1 ± 1,7 nm	7,5 ± 1,3 nm	8,7 ± 1,5 nm	8,0 ± 1,4 nm	8,2 ± 1,7 nm	8,0 ± 1,9 nm
60 s	9,4 ± 1,8 nm			9,0 ± 1,6 nm		8,9 ± 1,6 nm
300 s	10,8 ± 1,8 nm			10,0 ± 2,0 nm		10,9 ± 2,0 nm
600 s	11,0 ± 2,6 nm			11,8 ± 2,2 nm		11,5 ± 2,6 nm
900 s	10,9 ± 2,0 nm	10,4 ± 2,1 nm	10,5 ± 2,1 nm	11,4 ± 2,3 nm	10,7 ± 2,1 nm	11,6 ± 2,6 nm
1200 s	10,7 ± 2,1 nm	10,4 ± 1,6 nm		11,5 ± 2,3 nm		11,9 ± 2,3 nm
1800 s	12,3 ± 2,5 nm			12,1 ± 2,4 nm		13,1 ± 2,7 nm
2400 s	12,7 ± 2,6 nm	12,4 ± 2,2 nm		12,2 ± 2,2 nm		13,4 ± 2,8 nm
4800 s	12,6 ± 2,3 nm			12,4 ± 2,4 nm		12,8 ± 2,7 nm

Tableau III.4 : Tableau récapitulatif des tailles moyennes ± écarts-types des distributions de nanoparticules obtenues en fonction des deux paramètres de synthèse. Lorsque plusieurs échantillons ont été synthétisés avec les mêmes valeurs de MA et RM, la valeur indiquée est la moyenne de celles obtenues pour les différents échantillons.

Les tailles moyennes ± écarts-types des NPs@Cit sont comprises entre 4,0 ± 0,6 nm et 13,4 ± 2,8 nm. Ces tailles n'évoluent presque pas avec le RM (hormis pour RM = 24 pour lequel les tailles moyennes sont légèrement supérieures).

À l'inverse, la taille moyenne évolue de manière importante avec le MA. Les nanoparticules obtenues ont des tailles moyennes plus petites lorsque les MA sont très faibles. En effet, pour MA = 0 s, les NPs@Cit ont une taille moyenne de 4,5 ± 1,0 nm alors que pour MA = 10 s, les NPs@Cit ont une taille moyenne de 8,1 ± 1,6 nm. Cet effet se poursuit plus lentement avec l'augmentation du MA pour terminer avec une taille moyenne de 12,6 ± 2,5 nm pour le moment d'ajout MA = 4800s.

Afin de mieux visualiser l'évolution et la dispersion de la taille moyenne des NPs@Cit en fonction des deux paramètres RM et MA, un graphique représentant l'évolution de la taille moyenne des nanoparticules (en coordonnée « z ») en fonction des paramètres de synthèse (en coordonnées « x » et « y ») a été tracé à l'aide du logiciel Matlab® (figure III.4.A). Une projection perpendiculaire à l'axe « z » du graphique est également représentée en figure III.4.B.

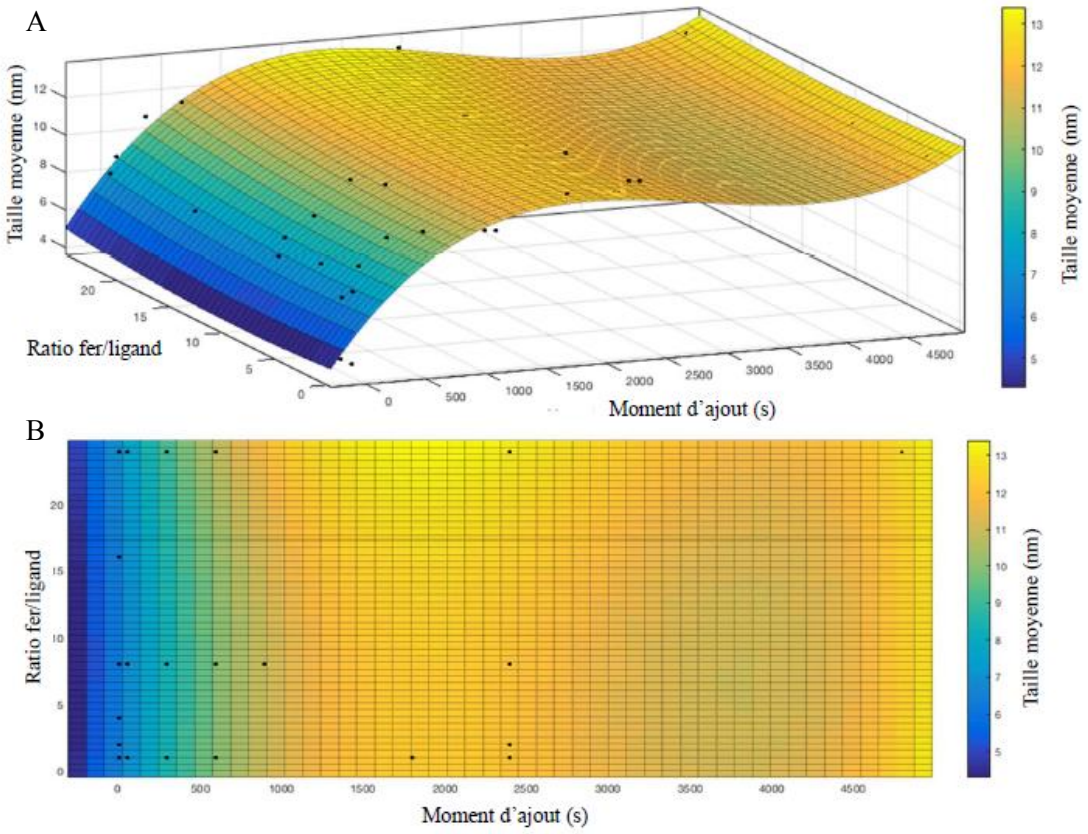


Figure III.4 : A) Représentation en trois dimensions de la taille moyenne des nanoparticules en fonction du rapport molaire fer/ligand RM et du moment d'ajout du ligand MA. B) Projection de cette représentation perpendiculaire à l'axe z.

Ces graphiques mettent en évidence l'importance du paramètre MA dans le contrôle de la taille moyenne des NPs@Cit en particulier entre 0 et 1000s. Lorsque MA ≥ 1000s, le diamètre moyen des NPs@Cit en suspension tend à se stabiliser avec un diamètre moyen pour tous les échantillons de 12,2 ± 2,0 nm. L'impact du moment d'ajout du ligand est plus important dans les secondes qui suivent la précipitation.

En revanche, on voit que lorsque RM appartient à l'intervalle [1 ; 24], celui-ci ne semble pas avoir un effet important sur la taille des NPs@Cit, seules les nanoparticules synthétisées avec RM=24 sont légèrement plus grandes. À partir de cette observation pour un ratio molaire RM = 24, une synthèse annexe a été réalisée avec un ratio molaire RM = 64. Celle-ci a permis de constater une augmentation marquée de la taille moyenne des nanoparticules mesurée au MET à 10,5 nm.

Des synthèses avec des RM inférieurs à 1 ont également été effectuées. Ces synthèses n'ont pas montré de modification significative de la taille moyenne des nanoparticules comparée à celle des échantillons synthétisés avec RM = 1. Le lavage de ces échantillons était difficile en

raison des grandes quantités de ligands libres en solution. Il a donc été choisi de fixer la limite basse des RM utilisés à 1.

Des mesures de diffraction des rayons X ont été effectuées de manière systématique sur tous les échantillons synthétisés. Les diffractogrammes présentés en figure III.5 pour RM = 1 et MA 0s, 10s, 900s et 1800s ont été indexés avec les données cristallographiques des structures $Fd\bar{3}m$ (Fiche PDF 04-015-8200) de la magnétite.

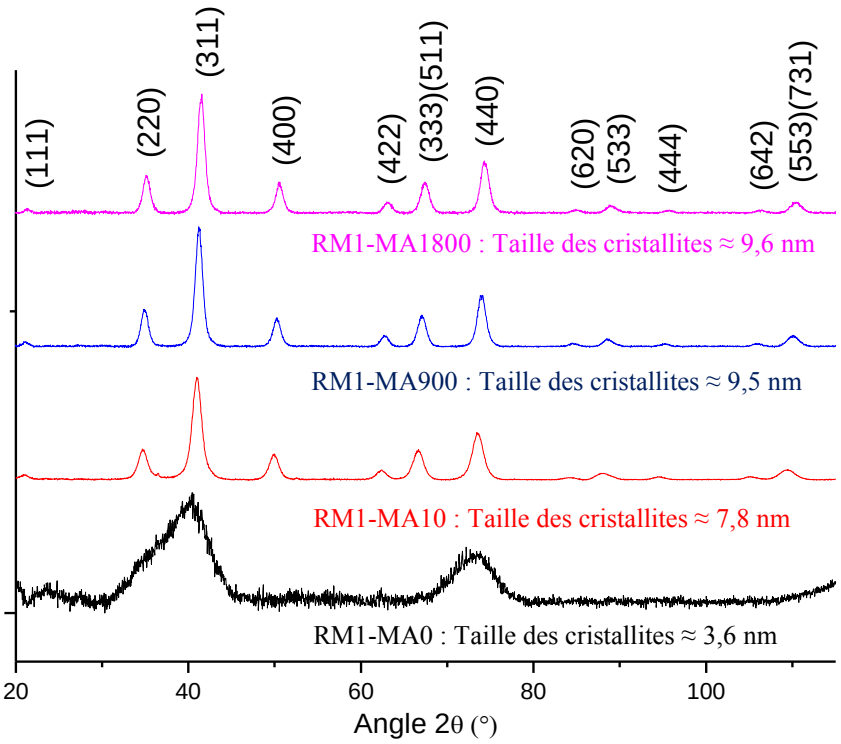


Figure III.5 : Clichés de diffraction des rayons X pour 4 échantillons de SPIONs synthétisées avec un RM de 1 et différents MA. L'indexation est faite avec les données de la structure $Fd\bar{3}m$ (Fiche PDF 04-015-8200).

Par application de la formule de Scherrer sur la raie (311) et par affinement avec le logiciel DIFFRAC.EVA, les tailles de cristallites de tous les échantillons ont été calculées et reportées dans le tableau III.5.

RM / MA	1	2	4	8	16	24
0 s	3,8 nm	3,5 nm	3,5nm	3,5 nm	3,5 nm	4,5 nm
10 s	7,8 nm	7,8 nm	8,8 nm	7,7 nm	8,2 nm	7,5 nm
60 s	7,9 nm			8,1 nm		8,63nm
300 s	9,4 nm			9,0 nm		8,5 nm
600 s	9,3 nm			9,4 nm		8,9 nm
900 s	9,5 nm	8,8 nm	9,2 nm	9,2 nm	8,6 nm	9,4 nm
1200 s	9,4 nm	9,8 nm		9,2 nm		9,0 nm
1800 s	9,6 nm			9,8 nm		9,1 nm
2400 s	9,7 nm	9,6 nm		9,6 nm		8,9 nm
4800 s	9,9 nm			9,8 nm		10,7 nm

Tableau III.5 : Tableau récapitulatif des tailles de cristallites calculées pour les nanoparticules obtenues en fonction de RM et MA (en nm).

Pour RM1-MA0, le diamètre moyen des NPs@Cit estimé par MET est de l'ordre de 4,2 ± 0,6 nm. Le diffractogramme présente principalement deux pics clairement visibles. La taille des cristallites calculée est de l'ordre de 3,6 nm. Cette valeur est légèrement inférieure à la mesure faite par MET. Dans le cas de cet échantillon, le pic à partir duquel le calcul a été fait est en fait la somme des pics de diffraction (311) et (220) qui se superposent. Si on se réfère à la formule de Scherrer, une augmentation de la FWHM du pic (ici provoquée par la superposition des deux pics) implique une diminution de la taille moyenne des cristallites calculée.

Pour RM1-MA10, RM1-MA900 et RM1-MA1800, les pics de diffraction sont parfaitement définis comme dans le cas des échantillons de référence. Tous les pics peuvent être indexés avec les données cristallographiques de la structure $Fd\bar{3}m$ (Fiche PDF 04-015-8200) de la magnétite. Les pics de diffraction propres à la maghémite avec des lacunes organisées ($P4_232$ et $P4_12_12$) ne sont pas visibles et aucune impureté cristallisée n'est observée.

Les résultats obtenus par DRX concernant la taille des cristallites confirment que MA a une influence importante sur le diamètre moyen des NPs@Cit notamment entre 0s et 60s. En revanche, RM ne semble pas avoir une influence importante dans l'intervalle des RM allant de 1 à 24. Ces résultats sont en accord avec les résultats obtenus par MET. Il est ainsi possible d'obtenir des NPs@Cit sphériques et de diamètre moyen contrôlé (de 4 à 13 nm) par

l'ajustement du moment d'ajout du ligand dans le milieu réactionnel. En revanche, les mesures en DRX n'ont pas mis en évidence d'influence de ces deux paramètres sur la structure des NPs@Cit, les différents diffractogrammes obtenus ayant tous été indexés avec les données cristallographiques de la structure $Fd\bar{3}m$.

À notre connaissance, il n'existe pas d'étude poussée sur l'impact du moment d'ajout de ligand citrate dans le milieu de croissance des nanoparticules lors de la synthèse de nanoparticules d'oxyde de fer magnétiques. En revanche des synthèses de nanoparticules d'oxyde de fer en présence de citrates, ce qui correspond à nos essais avec MA = 0s, ont été réalisées par Agnès Bee et coll.[5]. Ces synthèses ont été conduites avec des valeurs de RM appartenant à l'intervalle [9 ; 99]. Les auteurs ont donc étudié une plage de rapports RM supérieurs à ceux étudiés dans ce travail et compris entre 1 et 24. Les diffractogrammes des rayons X qu'ils rapportent étant moins bien résolus, la taille des cristallites n'a pu être calculée que dans l'intervalle des rapports [24 ; 99].
Les tailles de cristallites annoncées dans la publication sont estimées entre 2,2 et 7,9 nm pour des RM appartenant à l'intervalle [24 ; 99]. Ces valeurs pour les tailles de cristallites calculées par la formule de Scherrer sont en accord avec celles calculées dans notre étude (comprises entre 3,5 et 4,5 nm).

Plus récemment P Johnson et coll. (2016)[6] ont également fait varier la quantité de citrate présent dans le milieu réactionnel avant la germination des nanoparticules. Ce RM dans la publication prend trois valeurs : 18, 27 et 54, et des tailles moyennes de nanoparticules obtenues par MET ont été mesurées entre 5,0 nm et 7,5 nm quand RM augmente. La taille des cristallites également calculée en DRX par la formule de Scherrer montre une variation entre 5,3 nm et 8,1 nm.
La synthèse test réalisée avec un RM = 64 tend également à montrer une augmentation significative de la taille moyenne des nanoparticules pour des RM supérieurs à ceux de notre plan d'expérience.

Un bilan des résultats des tailles des nanoparticules mesurées par microscope et des tailles moyennes des cristallites estimées par la DRX pour ces deux publications ainsi que pour nos résultats est rapporté dans la figure III.6.

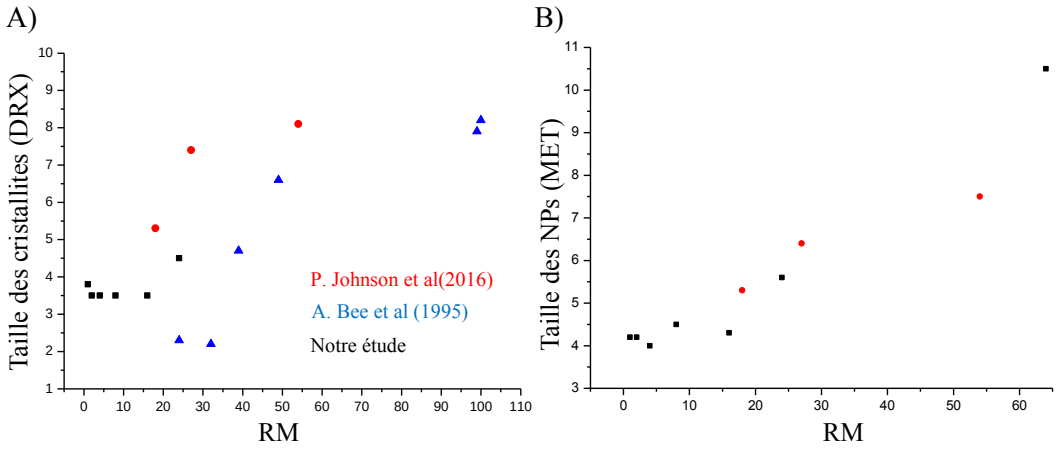


Figure III.6 : A) évolution de la taille des cristallites calculée par DRX et B) de la taille des NPs mesurée au MET en fonction de RM et pour MA = 0s. Les résultats sont ceux de notre étude ainsi que ceux des travaux de Bee et coll.[5] et de Johnson et coll.[6].

Par cette comparaison simple, nos résultats semblent en bon accord avec ceux des deux autres études citées. Ceci est particulièrement le cas pour l'évolution des tailles moyennes estimées par MET ; nos résultats sont en effet une prolongation pour des RM plus faibles de ceux de Johnson et coll. Il ressort de ces résultats que le paramètre RM pourrait avoir une réelle influence sur la taille des NPs mais uniquement lorsque RM $\geq$ 24 ce qui explique que nous n'ayons pas observé de manière marquée cette influence au cours de notre étude.

Selon des travaux antérieurs de Kandori et coll.[7] et Sidhu et coll.[8], les ions citrates viennent se lier à la surface des nanoparticules formées lors de la précipitation et jouent un rôle d'inhibiteur de leur croissance limitant ainsi leur taille finale en fin de synthèse. En considérant ce modèle, il est possible d'expliquer l'influence du moment d'ajout du citrate après le début de la précipitation. En effet, les nanoparticules sont libres de croître sans contrainte majeure dans le milieu réactionnel jusqu'au moment où le ligand est ajouté ; leur croissance est alors inhibée expliquant pourquoi les nanoparticules ont des tailles plus importantes lorsque le ligand est ajouté tardivement. Ce modèle est également cohérent avec la présence d'un palier dans l'évolution de la taille lorsque MA est supérieur à 1200 s. En effet, la raréfaction des précurseurs ferreux et ferriques dans le milieu réactionnel limite l'impact des ions citrates car la quantité de précurseur devient insuffisante pour la croissance des NPs.

En plus du calcul de la taille des cristallites et de la vérification de la structure des échantillons, les paramètres de maille ont également été calculés à partir de la raie de diffraction (311) (tableau III.6).

Comme souligné au chapitre 2, le diffractomètre utilisé car disposant d'une source de rayonnement au cobalt (afin de s'affranchir des problèmes de fluorescence liée à l'utilisation d'une source au cuivre sur de l'oxyde de fer) n'a pas la précision nécessaire pour le calcul direct du paramètre de maille des échantillons. Cependant, un traitement ultérieur des données *via* les logiciels FULLPROF puis UFIX permet de connaître le décalage dû à la hauteur de l'échantillon dans le dispositif expérimental. Ce traitement permet ainsi de corriger en grande partie l'erreur sur le paramètre de maille calculé.

Pour la raison expliquée précédemment dans le cas du calcul de la taille des cristallites, la première ligne du tableau, correspondant au MA = 0 s, voit ses valeurs fortement faussées par la superposition des raies de diffraction (311) et (220) et ne sera donc pas présentée.

RM / MA	1	2	4	8	16	24
0 s	-	-	-	-	-	-
10 s	8,382 Å	8,394 Å	-	8,340 Å	-	8,352 Å
60 s	8,372 Å			8,341 Å		8,354 Å
300 s	8,344 Å			8,344 Å		8,348 Å
600 s	8,350 Å			8,346 Å		8,349 Å
900 s	8,348 Å	8,344 Å	-	8,338 Å	-	8,352 Å
1200 s	8,386 Å	8,397 Å		8,338 Å		8,350 Å
1800 s	8,384 Å			8,342 Å		8,349 Å
2400 s	-	8,394 Å		8,344 Å		8,373 Å
4800 s	8,338 Å			8,337 Å		8,359 Å

Tableau III.6 : Tableau récapitulatif des paramètres de mailles calculés via la position de la raie (311) pour les nanoparticules obtenues en fonction de RM et MA (en Å).

Deux remarques sont possibles à partir de ces résultats. D'une part, les paramètres calculés ont, comme attendu, des valeurs intermédiaires entre celui de la magnétite et celui de la maghémite respectivement égaux à 8,396 ± 0,001 Å et 8,338 ± 0,001 Å. D'autre part, il ne semble pas y avoir d'influence marquée sur le paramètre de maille de l'un ou l'autre des

paramètres de synthèse (RM et MA). Les ratios molaires bas (RM 1 et RM 2) semblent toutefois favoriser un paramètre de maille plus proche de celui de la magnétite.

3.3 Influence des paramètres de synthèse sur l'état d'agrégation des nanoparticules en suspension aqueuse et le taux de ligand

3.3.1 Comparaison MET/DLS : mesure du rayon hydrodynamique

Les mesures DLS sont indispensables pour caractériser les suspensions de nanoparticules. En effet, là où la microscopie à transmission permettra de connaître la taille moyenne unitaire des nanoparticules, la DLS renseigne sur le diamètre hydrodynamique des nanoparticules seules ou des assemblages qu'elles forment en suspension et ainsi nous renseigner sur leur stabilité colloïdale.

Les mesures en DLS ont été réalisées systématiquement sur des échantillons préalablement dilués ([NPs@Cit] ≈ 0,1mg/mL) conformément aux consignes d'emploi de l'appareil Zetasizer NanoZS utilisé et cette concentration est la même pour tous les échantillons. De la même façon, pH de mesure est fixé à 7 pour tous les échantillons. Chaque mesure est en fait la moyenne obtenue après trois séries de dix mesures consécutives.

Les résultats exprimés en volume sont présentés dans le tableau III.7. Les valeurs indiquées correspondent au maximum du pic de la population majoritaire en suspension. L'utilisation de la pondération en volume (voir annexe 1 pour les modes de mesures en DLS) permet d'avoir un bon aperçu de l'ensemble des objets présents en suspension que leur taille soit de l'ordre du nanomètre ou du micromètre. En effet, les mesures pondérées en intensité ont tendance à donner trop d'importance aux gros objets en suspension alors que la pondération en nombre a au contraire tendance à effacer totalement ces mêmes objets.

Le diamètre hydrodynamique des NPs@Cit en suspension atteint des valeurs minimales se rapprochant des valeurs de diamètres obtenues par MET uniquement pour des rapports n_{fer}/n_{ligand} faible de 1 et 2 et pour des MA = 0s. L'augmentation d'un seul des deux paramètres de synthèse a pour effet d'augmenter ce diamètre. Le diamètre hydrodynamique est alors largement supérieur aux diamètres moyens mesurés par MET (compris entre 4,0 ± 0,6 nm et 13,4 ± 2,8 nm). Cette différence entre les résultats des deux méthodes est particulièrement visible si on trace l'évolution des rayons hydrodynamiques (DLS) et des diamètres (MET) sur

un même graphique en fonction du RM pour les échantillons synthétisés avec MA = 0s (figure III.7).

RM MA	1	2	4	8	16	24
0 s	7 ± 1 nm	6 ± 1 nm	15 ± 1 nm	29 ± 1 nm	77 ± 2 nm	99 ± 2 nm
10 s	33 ± 1 nm	50 ± 2 nm	140 ± 3 nm	68 ± 2 nm	140 ± 3 nm	79 ± 2 nm
60 s	68 ± 2 nm			105 ± 3 nm		80 ± 2 nm
300 s	79 ± 2 nm			55 ± 2 nm		79 ± 2 nm
600 s	68 ± 2 nm			68 ± 2 nm		91 ± 2 nm
900 s	18 ± 1 nm	32 ± 1 nm	41 ± 1 nm	42 ± 1 nm	43 ± 1 nm	62 ± 2 nm
1200 s	60 ± 2 nm	46 ± 1 nm		48 ± 1 nm		100 ± 3 nm
1800 s	65 ± 2 nm			95 ± 2 nm		63 ± 2 nm
2400 s	70 ± 2 nm	60 ± 2 nm		79 ± 2 nm		90 ± 2 nm
4800 s	78 ± 2 nm			90 ± 2 nm		78 ± 2 nm

Tableau III.7 : Tableau récapitulatif des diamètres hydrodynamiques moyens mesurés en DLS en fonction de RM et MA. Les tailles exprimées en nanomètres correspondent au maximum du pic de la population majoritaire (déterminé graphiquement). Les mesures sont effectuées avec une concentration de 0,1 mg/mL et à pH 7.

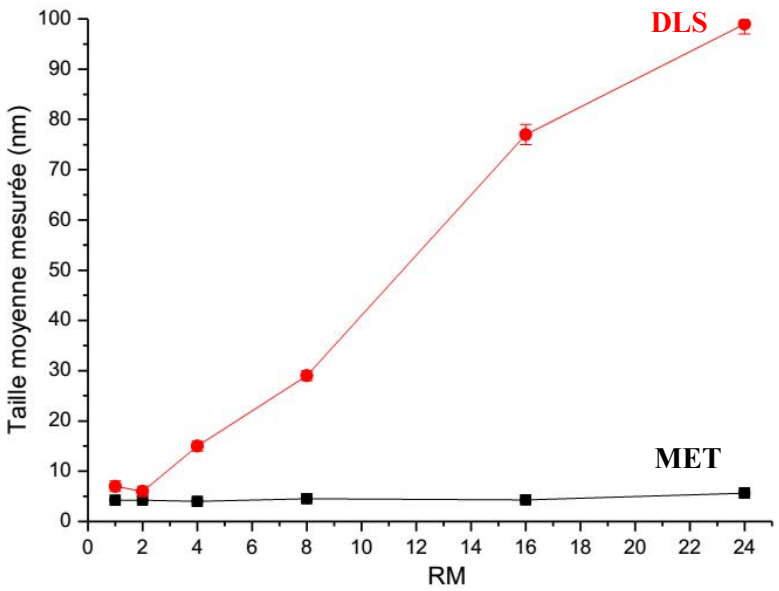


Figure III.7 : Évolution de la taille des nanoparticules (MET) et du rayon hydrodynamique (DLS) en fonction du RM pour un même MA = 0s.

Les NPs@Cit ne semblent donc pas être totalement isolées et indépendantes en suspension et se présentent plutôt sous la forme de petits assemblages parfois appelés clusters[6] eux-mêmes stables en suspension dans la mesure où il n'y pas de sédimentation comme le montre la reproductibilité des résultats au cours des cycles de mesure. Le paramètre de synthèse principal qui influence la taille des clusters formés est le rapport molaire fer/ligand RM.

Dans leurs récents travaux, P Johnson et coll. (2016)[6] ont synthétisés des nanoparticules de magnétite stabilisées par des citrates par une méthode également dérivée de la co-précipitation. Celle-ci se différencie de celle mise en place dans la présente étude par un ajout de citrate dans le milieu réactionnel en deux temps : un premier ajout d'une petite quantité de citrate avant précipitation ayant pour objectif de moduler la taille des nanoparticules comme expliqué précédemment. Un second ajout plus concentré après une heure de synthèse pour limiter la taille finale des agglomérats. La taille minimale des rayons hydrodynamiques mesurés en DLS (pondération en volume) était alors de 30 nm.

Il apparaît donc que le taux final de ligand présent dans la suspension après synthèse et lavage semble être un facteur déterminant sur l'état d'agrégation des nanoparticules. L'introduction avant précipitation (MA = 0s) d'une quantité importante de ligand (RM = 1 et 2) comme c'est le cas pour RM1-MA0 et RM2-MA0 permet de maximiser le taux final de ligand en surface des nanoparticules. Ainsi les diamètres hydrodynamiques mesurés dans cette étude sont plus faibles et proches de la taille unitaire des nanoparticules pour ces deux échantillons. Dans la mesure où les évolutions les plus importante sont observées pour des MA = 0s, c'est-à-dire pour un protocole de lavage différent des autres MA. On peut donc supposer que le lavage des nanoparticules a également un rôle important dans le taux final de ligand présent.

Afin de confirmer ces hypothèses, des analyses de surface sont menées afin d'une part de s'assurer du greffage des ligands, de l'intégrité de ces derniers mais également afin de calculer le taux de ligand présent dans chaque échantillon après synthèse et lavage des nanoparticules.

3.3.2 Caractérisation de la surface des nanoparticules

Le premier objectif de la caractérisation de la surface des nanoparticules synthétisées est de s'assurer de la présence de ligands citrates greffés sur celles-ci comme cela était souhaité. Cette caractérisation doit permettre de distinguer les citrates greffés des citrates libres en cas de présence résiduelle dans l'échantillon. Cette investigation sera principalement menée par

les techniques de spectroscopie infrarouge et de spectroscopie XPS. Une fois la présence de ligand confirmée, il sera également nécessaire de connaître le taux de ligand dans les échantillons (en % massique) à la fois pour comprendre la relation entre taux de ligand et rayon hydrodynamique mais également pour l'interprétation correcte des mesures magnétiques qui seront réalisées. Cette détermination du taux de ligand sera quant à elle rendue possible par des mesures en ATG.

Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (IRTF)

Les mesures en spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier ont été effectuées avec un spectromètre Thermo-Nicolet 8700. L'appareil opère en mode réflexion totale atténuée (ATR), l'échantillon de nanoparticules sèches étant directement déposé sur le cristal du module ATR. Les spectres ont été enregistrés sur la plage de nombres d'onde allant de 400 à 3500 cm^{-1}.

L'ensemble des spectres obtenus montrant des positions de bandes équivalentes, la figure III.8 présente, à titre d'exemples, les spectres infrarouges enregistrés sur les échantillons RM1-MA900 et RM1-MA0 ayant respectivement des taux de ligands de 15% et 38% (détermination du taux de ligand par ATG).

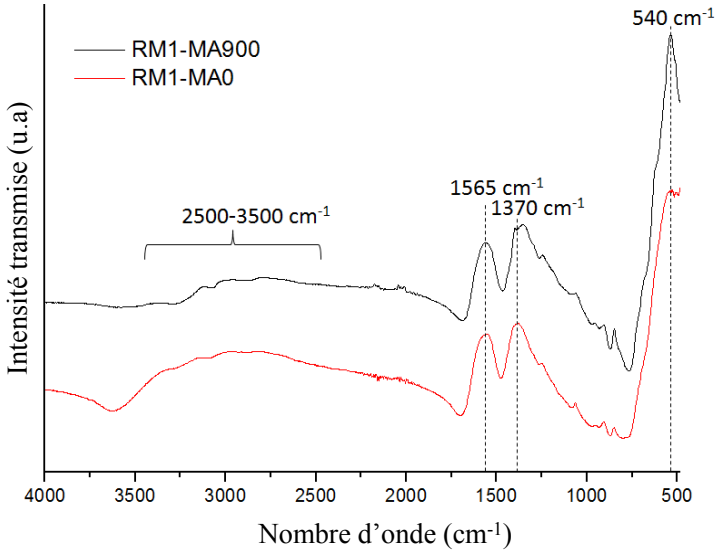


Figure III.8 : Spectres infrarouges des échantillons RM1-MA0 et RM1-MA900.

Les principaux éléments visibles sur les spectres de ces deux matériaux nanostructurés sont :

Les bandes à 540 cm^{-1} correspondant aux élongations Fe-O propres à l'oxyde de fer

Les deux bandes à 1565 cm^{-1} et 1370 cm^{-1} correspondant aux élongations symétriques et asymétriques des groupements carboxyles $-COO^-$ [9,10]. Ces bandes sont caractéristiques de la présence de molécules de citrate en surface des nanoparticules (partie 2.3). Les bandes significatives des groupements carboxylates sont donc bien visibles aux nombres d'ondes correspondant à la forme déprotonée de ces groupements. En effet, si les groupements carboxyles étaient protonés, leurs bandes significatives seraient visibles aux alentours de 1661 cm^{-1} et 1715 cm^{-1} [11]. Ce résultat est en accord avec la valeur des pKa (3,1/4,8/6,4) de l'acide citrique et le pH de fin de lavage des suspensions (pH = 7,0 ± 0,2). Cela valide donc le protocole d'élaboration. Avec un pH de 9,5 ± 0,5, suite à l'ajout de la base précipitant les nanoparticules, supérieur au pKa le plus élevé de l'acide, il n'y a plus de groupement carboxyle acide sur les ligands. Le pH étant ensuite toujours maintenu au-dessus de ce pKa le plus élevé, il n'y a plus de protonation des ligands et seuls des groupements COO^- sont présents.

Une très large bande entre 2500 cm^{-1} et 3500 cm^{-1}, mal résolue, correspondant à la liaison O-H du groupement hydroxyle des citrates. Ce groupement n'est pas déprotoné au cours de la synthèse, Le pKa associé étant de 14,4.

Sur les spectres, les bandes des liaisons C-H qui devraient être visibles aux alentours de 2800 cm^{-1} ne sont pas visibles[10,12] car les chaînes carbonées présentes dans les molécules de citrates sont courtes et le citrate lui-même ne représente dans ces exemples que 15 (RM1-MA900) et 38% (RM1-MA0) de l'échantillon, la masse restante correspondant à l'oxyde de fer en l'absence d'impuretés enregistrées.

Ces spectres montrent bien la présence des molécules organiques citrates introduites possédant des groupements carboxylates et hydroxyles. La comparaison entre ces deux spectres permet également d'évaluer de manière comparative et qualitative le taux de ligand. En effet, on constate que le rapport d'intensité relative entre la bande de l'oxyde de fer (≈ 540 cm^{-1}) et celles des carboxylates du citrate est plus important pour l'échantillon RM1-MA900 qui possède d'après les analyses thermogravimétriques, présentées ci-après, un plus grand pourcentage massique d'oxyde de fer et moins de ligand que l'échantillon RM1-MA0.

Dans certains travaux traitant de nanoparticules d'oxyde de fer fonctionnalisées par des carboxylates tels que les stéarates ou les oléates, la mesure de l'écart entre les élongations symétrique et asymétrique des groupements carboxylates a été utilisée pour déterminer le mode de liaison entre le groupement carboxylate et la surface des nanoparticules[13–15]. Toutefois, cette détermination est rendue possible dans ces travaux par le fait qu'il n'y a qu'un seul groupement carboxyle par ligand assurant ainsi que la totalité des groupements sont liés à la surface d'oxyde. Il en résulte alors des bandes IR relativement fines dont la mesure de l'écartement relatif permet de déterminer le mode de liaison (monodentate, bidentate pontante ou bidentate chélatante). Dans notre cas, trois groupements carboxylates sont présents par molécule de citrate et plusieurs types de liaisons à la surface des nanoparticules sont possibles. Il en résulte des bandes IR plus larges caractéristiques de modes de liaison différents en surface. Afin d'aller plus loin dans la caractérisation de surface de nos nanoparticules, des analyses XPS ont été mises en œuvre.

Spectroscopie des photoélectrons X (XPS)

En complément de l'enregistrement du spectre correspondant à l'orbitale Fe2p du fer qui nous permettra comme nous l'avons vu pour les NPs de référence d'obtenir des informations sur l'état d'oxydation des nanoparticules, nous avons également étudié les spectres correspondants aux orbitales C1s et O1s. De plus, l'enregistrement de spectres associés aux orbitales Cl2p ainsi que Na1s dans le cas d'échantillons synthétisés avec du citrate de sodium a permis de mettre en évidence, sur certains échantillons, la présence d'ions Cl^- et Na^+ résiduels (≈ 1%) non détectés par DRX.

À titre d'exemple, les spectres mesurés en XPS des orbitales C1s et O1s de l'échantillon RM1-MA0 sont présentés figure III.9.

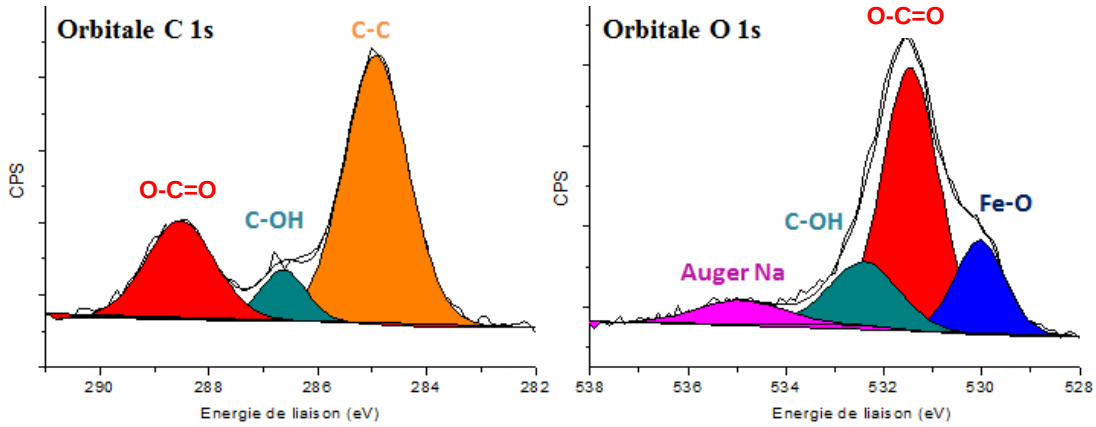


Figure III.9 : Spectres XPS des orbitales C1s et O1s de l'échantillon RM1-MA0 désommés avec les composantes correspondantes aux principales liaisons présentes dans l'échantillon.

Les spectres des orbitales C1s et O1s obtenus sur les différents échantillons passés en XPS ont été désommés à l'aide du logiciel « casa XPS ». Pour ce faire, les composantes correspondantes aux liaisons suivantes ont été introduites : O-C=O, C-OH, Fe-O et C-C. On peut noter la présence de la raie Auger du sodium qui apparaît à 535 eV sur le spectre de l'orbitale O1s.

La position des composantes a été définie sur la base des composés de référence de citrate de sodium, d'acide citrique et de nanoparticules nues décrits au chapitre 2. L'intensité de chacune des composantes est ajustée en gardant une cohérence sur le degré de liberté laissé à la position des composantes ainsi qu'à leurs largeurs à mi-hauteur (FWHM). Lorsque l'ajustement est terminé, l'enveloppe mathématique totale correspond au profil expérimental de l'échantillon.

Le tableau III.7 présente à titre d'exemple pour quatre échantillons RM1-MAy (avec y = 0, 10, 1200 et 2400 secondes) analysés en XPS, les positions, les FWHM et les pourcentages relatifs des composantes de O1s et C1s (pourcentage de la composante par rapport à l'ensemble de l'orbitale dont elle fait partie). Ensuite, pour chaque échantillon, sont donnés les rapports des pourcentages relatifs des composantes liées aux groupements carboxyles divisés par les pourcentages relatifs des composantes liées aux groupements hydroxyles d'après le spectre O1s. Enfin sont donnés les rapports des pourcentages relatifs des composantes liées aux groupements hydroxyles divisés par les pourcentages relatifs des composantes liées aux liaisons Fe-O, toujours d'après le spectre O1s.

Le tableau de quantification total des composantes associées à ces quatre échantillons est consultable en annexe 4 de ce manuscrit.

	RM1-MA2400		RM1-MA1200		RM1-MA10		RM1-MA0		Citrate de sodium		magn14	
Composante	Position (FWHM) (eV(eV))	%	Position (FWHM) (eV(eV))	%	Position (FWHM) (eV(eV))	%	Position (FWHM) (eV(eV))	%	Position (FWHM) (eV(eV))	%	Position (FWHM) (eV(eV))	%
C1s C-C	285 (1,3)	74	285 (1,3)	42	285 (1,4)	63	285 (1,3)	64	285 (1,3)	44	285 (1,8)	60
C1s C-OH	286,6 (1,1)	11	286,5 (1,8)	40	286,6 (1,3)	9	286,7 (1,1)	10	286,6 (1,0)	15	286,5 (1,7)	26
C1s O-C=O	288,8 (1,3)	15	288,5 (1,5)	18	288,5 (1,5)	28	288,5 (1,4)	26	288,6 (1,5)	41	288,7 (2.1)	14
O1s Fe-O	530,3 (1,2)	66	530,1 (1,3)	74	529,9 (1,2)	17	530,2 (1,3)	23	-	-	530,0 (1,7)	81
O1s O-C-O	531,5 (1,6)	25	531,4 (1,2)	20	531,5 (1,4)	62	531,5 (1,3)	58	531,3 (1,3)	75	531,5 (1,5)	15
O1s C-OH	532,9 (1,8)	9	532,7 (1,8)	6	532,6 (1,8)	21	532,5 (1,6)	19	532,5 (1,4)	25	532,7 (1,5)	4
	RM1-MA2400		**RM1-MA1200**		**RM1-MA10**		**RM1-MA0**		**Citrate de sodium**		**Magn14**	
O-C-O/C-OH	2,8		2,8		3,0		3,1		3		-	
C-OH/Fe-O	0,14		0,09		1,2		0,8		-		0,05	

Tableau III.7 : Positions, FWHM (en eV) et % relatifs lié à chaque composante des orbitales C1s et O1s ainsi que les rapports entre les intensités liées aux composantes des liaisons O-C-O et C-OH et les rapports entre les intensités liées aux composantes des liaisons C-OH et Fe-O de l'orbitale O1s des NPs@Cit. Les données extraites des spectres O1s et C1s du citrate de sodium pur et de magn14 sont également présentées ici.

Remarquons que le rapport O-C=O/C-OH qui est de 3 dans le cas du citrate de sodium seul est également voisin de 3 pour les échantillons analysés. La valeur de ces rapports est attendue car il y a trois groupements carboxyles et un seul groupement hydroxyle par molécule de citrate. Nous avons ainsi confirmation de la présence du ligand en surface des quatre échantillons de NPs et de l'intégrité des molécules de citrate.

Si on prête attention aux rapports des composantes associées aux liaisons C-OH et Fe-O, on constate que ceux-ci sont voisins de 0,1 pour RM1-MA2400 et RM1-MA1200 alors qu'ils sont voisins de 1 pour RM1-MA10 et RM1-MA0. Les liaisons Fe-O sont propres au cœur d'oxyde des NPs alors que les liaisons C-OH sont propres aux citrates. La grande différence de ce rapport entre les deux premiers échantillons (RM1-MA2400 et RM1-MA1200) et les autres (RM1-MA10 et RM1-MA0) montre donc une présence de ligand en surface beaucoup plus importante dans les cas des NPs synthétisées avec un ajout de citrate avant (RM1-MA0) ou très peu de temps après la germination des NPs (RM1-MA10). Pour tous ces échantillons, il est important de signaler que ce rapport est logiquement supérieur à celui des nanoparticules magn14 qui ne présentent pas de ligand en surface (et pour lesquelles la composante C-OH ne provient que de la contamination). Ces premières constatations quant à la présence de plus ou moins de ligand en surface des NPs en fonction du moment d'ajout de ce dernier vont être étoffées par la suite par des analyses thermogravimétriques.

3.3.3 Mesure du taux de ligand

Les analyses thermogravimétriques (ATG) ont été réalisées avec une thermo-balance Setsys Setaram. Une masse de 5 mg d'échantillon sous forme de poudre sèche est placée dans un creuset de platine qui est ensuite introduit dans le four de la thermo-balance. La température est élevée de 25°C à 800°C avec un pas de 5°C/min sous un flux d'air constant de 20 mL/min. Les pertes de masse liées au départ de l'eau adsorbée puis à la décomposition des ligands sont enregistrées et peuvent généralement être différenciées les unes des autres.

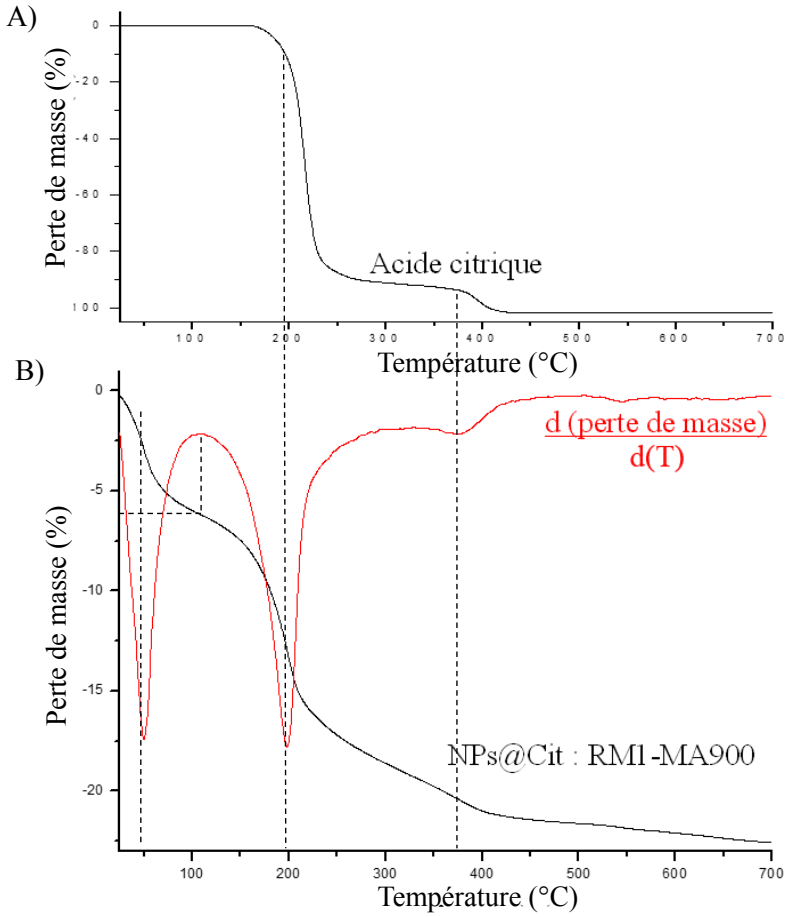


Figure III.10 : A) Courbe ATG de la perte de masse en fonction de la température de l'acide citrique pur. B) Courbe ATG de l'échantillon RM1-MA900 (noir) et dérivée de la perte de masse en fonction de la température (rouge).

La figure III.10 sont donnés à titre d'exemple les courbe ATG de l'échantillon RM1-MA900 qui possède un taux de ligand important de 15% et du ligand sous la forme d'acide citrique qui a été introduit dans le milieu réactionnel au cours de la synthèse.

Le premier événement thermique rendu bien visible par le premier pic de la dérivée de la perte de masse en fonction de la température correspond au départ de l'eau physisorbée en

surface des nanoparticules. C'est 6% de la masse totale d'échantillon qui va être perdue pendant cet évènement thermique.

Le deuxième évènement lui aussi clairement visible correspond si on compare les thermogrammes des NPs@Cit et du ligand seul à la décomposition de la majeure partie des citrates de surface. La perte de masse au cours de cet événement thermique est de 10%.

Le troisième évènement visible mais cependant moins marqué correspond à la perte de 5% de la masse qui s'étale entre 250°C et 700°C, cette perte, visible à 400°C pour le ligand pur correspond à la décomposition des restes de chaînes carbonées des ligand encore présentes dans l'échantillon. Au total, le pourcentage massique de ligand est donc de 15% dans cet échantillon auxquels il faut rajouter 5% d'eau si on veut déterminer le pourcentage d'oxyde de fer qui représente le reste de l'échantillon.

Ces mesures permettent ainsi de connaître le taux d'eau adsorbée et le taux de ligand en pourcentage de masse pour tous les échantillons en retranchant le pourcentage de perte de masse liée à la présence d'eau de la perte de masse totale. Les taux (en pourcentage massique) de ligand déterminés pour tous les NPs@Cit sont présentés dans le tableau III.9.

D'autre part, l'oxyde de fer présent à l'origine sous forme de magnétite et/ou de maghémite change de structure avec l'élévation de la température et passe sous forme d'hématite de structure $R\bar{3}c$ avant 800°C comme cela a été mis en évidence par diffraction des rayons X en température. Dans le cas où il resterait de la magnétite dans l'échantillon, ce changement de structure et cette oxydation s'accompagne d'une légère prise de masse due à l'oxygène gagné. Cette prise de masse difficile à repérer car elle survient en même temps que la décomposition des chaînes carbonées mais pourrait dans une certaine mesure causer une sous-estimation du taux de ligand calculé.

A) RM / MA	1	2	4	8	16	24
0 s	38,0 ± 0,1%	36,5 ± 0,1%	26,0 ± 0,1%	13,5 ± 0,1%	12,0 ± 0,1%	4,8 ± 0,1%
10 s	21,0 ± 0,1%	5,0 ± 0,1%	3,0 ± 0,1%	4,5 ± 0,1%	3,5 ± 0,1%	4,0 ± 0,1%
60 s	14,0 ± 0,1%			8,0 ± 0,1%		4,5 ± 0,1%
300 s	3,0 ± 0,1%			4,5 ± 0,1%		4,0 ± 0,1%
600 s	3,5 ± 0,1%			3,0 ± 0,1%		4,0 ± 0,1%
900 s	15,0 ± 0,1%	6,0 ± 0,1%	5,0 ± 0,1%	4,0 ± 0,1%	5,0 ± 0,1%	3,0 ± 0,1%
1200 s	4,0 ± 0,1%	3,5 ± 0,1%		2,8 ± 0,1%		3,0 ± 0,1%
1800 s	2,5 ± 0,1%			4,0 ± 0,1%		2,8 ± 0,1%
2400 s	4,0 ± 0,1%	4,0 ± 0,1%		3,0 ± 0,1%		
4800 s	2,5 ± 0,1%			3,0 ± 0,1%		2,8 ± 0,1%
B) RM / MA	1	2	4	8	16	24
0 s	2011 ± 1	1931 ± 1	1376 ± 1	714 ± 1	635 ± 1	254 ± 1
10 s	1111 ± 1	265 ± 1	159 ± 1	238 ± 1	185 ± 1	212 ± 1
60 s	741 ± 1			423 ± 1		238 ± 1
300 s	159 ± 1			238 ± 1		212 ± 1
600 s	185 ± 1			159 ± 1		212 ± 1
900 s	794 ± 1	317 ± 1	265 ± 1	212 ± 1	265 ± 1	159 ± 1
1200 s	212 ± 1	185 ± 1		148 ± 1		159 ± 1
1800 s	132 ± 1			212 ± 1		148 ± 1
2400 s	212 ± 1	212 ± 1		159 ± 1		
4800 s	132 ± 1			159 ± 1		148 ± 1
0 s	2011 ± 1	1931 ± 1	1376 ± 1	714 ± 1	635 ± 1	254 ± 1

Tableau III.9 : Tableau récapitulatif des taux de ligand calculés par ATG pour les nanoparticules obtenues en fonction de RM et MA. Ces taux sont exprimés A) en pourcentage massique et B) en µmol de ligand par gramme d'échantillon.

Le taux de ligand est constant pour la majorité des échantillons et estimé à 4% de la masse initiale. Cependant, pour des RM appartenant à l'intervalle [1-4] et des MA appartenant à l'intervalle [0s-60s], le taux de ligand augmente significativement jusqu'à atteindre 38% pour

RM1-MA0. Ces variations peuvent être comparées aux variations observées pour les diamètres hydrodynamiques mesurés par DLS. Lorsque RM appartient à l'intervalle [1-4] et MA appartient à l'intervalle [0s-60s], le taux de ligand final dans l'échantillon est élevé et le diamètre hydrodynamique mesuré est faible.

Des mesures ATG seront également nécessaires à la bonne interprétation des résultats de magnétisme en permettant de connaître précisément le pourcentage de la masse totale de chaque échantillon qui est constitué de matériaux magnétiques.

3.3.4 Relation entre taux de ligand et rayon hydrodynamique.

L'influence du taux de ligand calculé en ATG sur le diamètre hydrodynamique mesuré par DLS est illustrée sur les figures III.11.A pour RM appartenant à [1-16] et MA = 0s et III.11.B pour RM appartenant à [1-16] et MA = 10s.

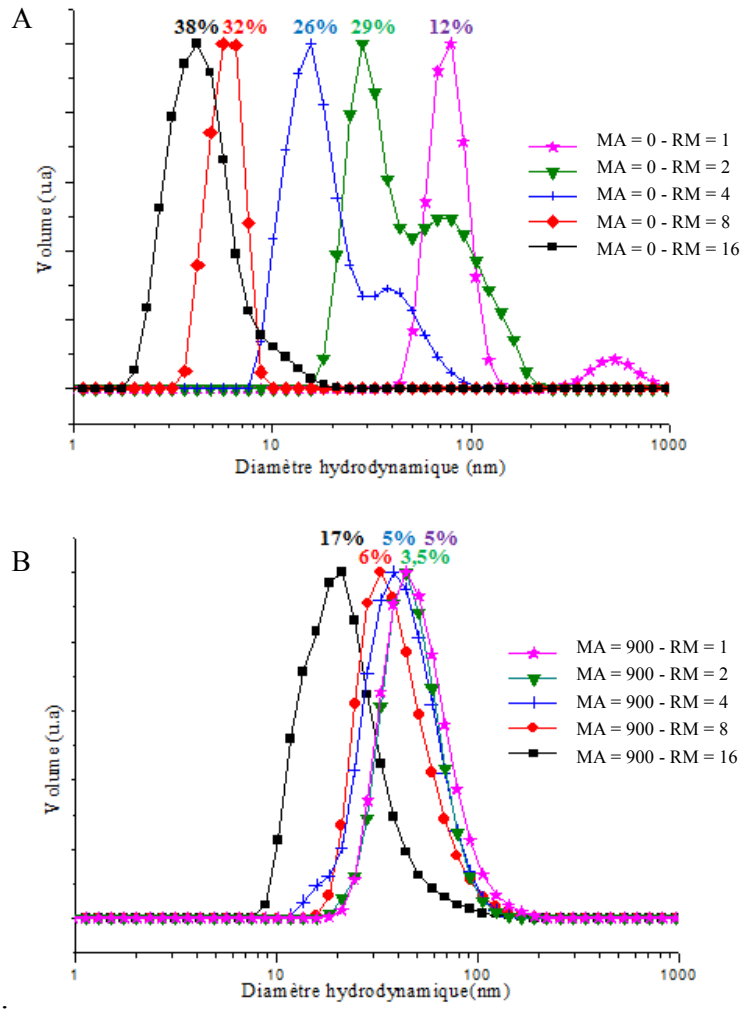


Figure III.11 : A) Mesures DLS sur des échantillons ayant des RM compris entre 1 et 16 et des MA de 0 s. B) Mesures DLS sur des échantillons ayant des RM compris entre 1 et 16 et des MA de 900 s. Les taux de ligand de chaque échantillon sont indiqués au-dessus des courbes.

Pour MA = 0s :

Lorsque le taux de ligand est supérieur à 30%, le diamètre hydrodynamique moyen est faible avec respectivement des populations centrées sur 7,0 nm et 6,0 nm pour des taux de ligand de 38% et 32%. Ces valeurs sont proches des diamètres moyens des NPs@Cit unitaires mesurés au MET.

Lorsque le taux de ligand est inférieur à 15%, le rayon hydrodynamique mesuré est centré sur 77,0 nm soit une taille largement supérieure à la taille unitaire des NPs@Cit.

Lorsque le taux de ligand est compris dans l'intervalle [15% - 0%], la population des diamètres hydrodynamiques en suspension est bimodale avec une population majoritaire comprise dans l'intervalle [15 - 29 nm] et une seconde population minoritaire ayant un diamètre hydrodynamique plus élevé.

Pour MA = 900s :

Lorsque le taux de ligand avoisine les 17%, la population de diamètres hydrodynamiques est centrée sur 18 nm soit globalement proche du diamètre moyen des nanoparticules unitaires mesuré au MET (10,9 ± 2,1 nm). Lorsque le taux de ligand ϵ [3% - 6%], les diamètres hydrodynamiques sont dans l'intervalle [32 - 43 nm].

Ces résultats mettent en évidence que le RM semble avoir un effet beaucoup plus marqué sur le diamètre hydrodynamique pour des MA faibles donc des NPs@Cit de petite taille.

Pour RM1-MA0 et RM8-MA0 (figure III.11.A), les populations majoritaires ont un diamètre hydrodynamique moyen de 7 nm et 29 nm avec présence d'une seconde population de plus grand diamètre hydrodynamique pour RM8-MA0 à 73 nm alors que les tailles mesurées au MET pour ces deux échantillons sont similaires avec respectivement 4,2 ± 0,6 nm et 4,5 ± 0,6 nm.

Afin de mettre clairement en évidence l'influence du taux de ligand sur le diamètre hydrodynamique, la manipulation suivante a été réalisée :

10 mL de l'échantillon RM8-MA0 sont prélevés. Le rapport molaire fer/ligand (RM) de l'échantillon est alors ajusté pour être égal à 1 par un ajout de 210 mg de citrates aux 10 mL de suspension. La suspension est ensuite laissée 5min dans un bain à ultrasons dans le but de séparer les plus gros agglomérats puis 12h sous agitation mécanique dans un bécher. Une mesure en DLS est ensuite effectuée selon le protocole défini précédemment et appliqué à tous les échantillons. L'augmentation importante après synthèse du taux de citrate

(correspondant à une diminution de RM) se rapprochant ainsi du second ajout de citrate pratiqué par l'équipe de P Johnson et coll.[6] discuté dans la partie III.2 entraîne une diminution du diamètre hydrodynamique moyen de la population majoritaire dans l'échantillon (figure III.12). La distribution devient monomodale, signe que les clusters les plus importants se sont dispersés sous forme de plus petits clusters ou de nanoparticules isolées.

Ainsi il est clairement mis en évidence le lien existant entre le taux de ligand et le diamètre hydrodynamique induit.

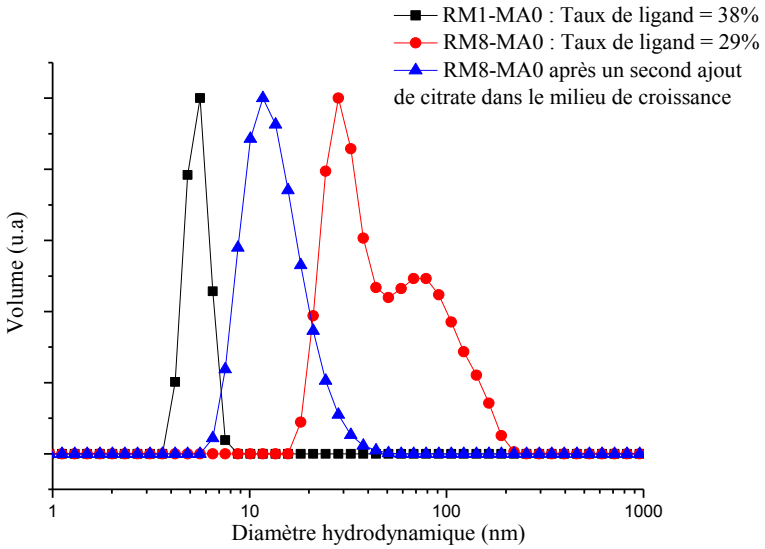


Figure III.12 : Mesures DLS des échantillons RM1-MA0 et RM8-MA0 ainsi que d'un lot de l'échantillon RM8-MA0 dans lequel ont été ajoutés des ions citrates afin d'abaisser le RM.

3.4 Influence de la taille des nanoparticules et du taux de ligand sur la composition des NPs@Cit

La présentation des résultats dans cette partie sera centrée sur la caractérisation de quatre échantillons qui ont été synthétisés avec RM = 1 et MA = 0s, 10s, 1200s, et 2400s. Les caractéristiques en termes de taille mesurée au MET et de taux de ligand déterminés par ATG de ces 4 échantillons sont renseignées dans le tableau III.9.

Le RM = 1 a été choisi pour deux raisons : d'une part pour que l'évolution du taux de ligand au sein de la série soit importante (38% pour MA = 0s contre 4% pour MA = 2400s) et d'autre part pour que les nanoparticules soient dispersées ou sous la forme de petits agglomérats en suspension.

Le choix des MA spécifiques 0s, 10s, 1200s, 2400s a été validé sur la base de l'importance de ces moments d'ajouts clés (figure III.13) induisant quatre lots de NPs@Cit présentant des tailles de cristallites bien distinctes.

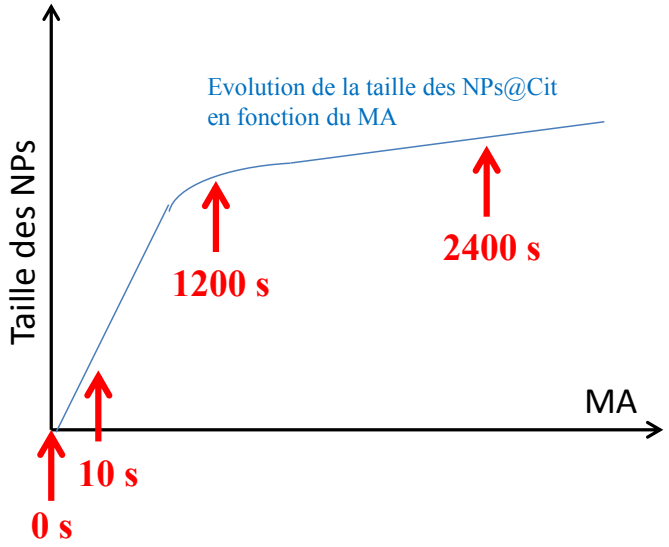


Figure III.13 : Représentation schématique de l'évolution de la taille moyenne des NPs déterminée par MET en fonction du MA. Les MA clés sélectionnés pour cette partie sont symbolisés par des flèches rouges.

Échantillon	Taille MET (nm)	Taux de ligand ATG (% massique)
RM1-MA0	3,8 ± 0,5	38
RM1-MA10	8,1 ± 1,7	21
RM1-MA1200	10,7 ± 2,1	4
RM1-MA2400	12,7 ± 2,6	4

Tableau III.9: Tailles moyennes et écarts-types mesurés au MET et taux de ligand déterminés par ATG des échantillons étudiés dans cette partie.

Dans la mesure où la campagne de caractérisation par spectroscopie XPS n'a pu être programmée que plusieurs mois après la synthèse des NPs@Cit, les échantillons ont été, après leur synthèse et leur séchage sous vide, séparés en deux lots distincts. Le premier a été conservé dans de simples flacons fermés et filmés pour les analyses nécessitant des poudres sèches et sera noté RMx-MAy-Air. Le second a été mis en ampoule de silice et scellée sous vide jusqu'au moment des analyses XPS et sera noté RMx-MAy-Amp.

Spectroscopie Raman

Afin d'avoir une première information qualitative sur l'état d'oxydation des échantillons RM1-MAy-Air (avec y = 0s, 10s, 1200s et 2400s), des mesures en spectroscopie Raman ont été effectuées avec un spectromètre Jobin Yvon T64000 (figure II.14).

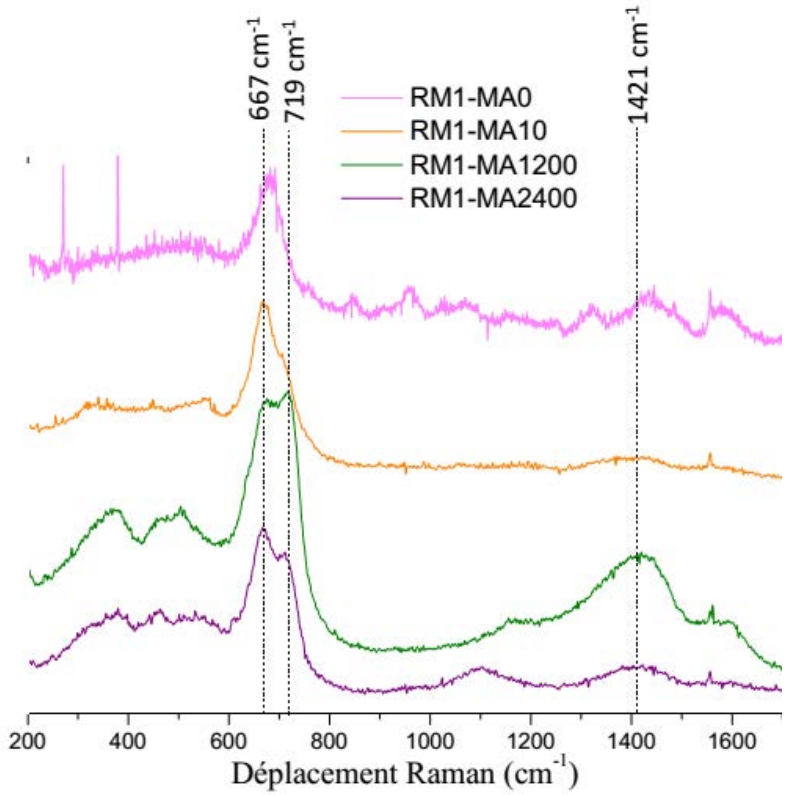


Figure III.14: Spectres Raman des échantillons conservés sous air, les 3 pics indexés sont les deux pics principaux de la maghémite (719 et 1421 cm^{-1}) et le pic principal de la magnétite (667 cm^{-1}).

La spectroscopie Raman permet une première étude qualitative uniquement de la présence de magnétite et de maghémite dans nos échantillons. En effet, ces deux oxydes bien que très proches structurellement n'ont pas les mêmes bandes caractéristiques en spectroscopie Raman.

La magnétite se distingue par une bande de vibration principale aux alentours de 670 cm^{-1} là où la maghémite se caractérise par deux bandes caractéristiques vers 720 et 1420 cm^{-1} [16–18].

Les RM1-MA1200 et RM1-MA2400 qui sont les deux échantillons ayant le taux de ligand le plus faible et les tailles moyennes les plus élevées montrent tous deux la présence des deux oxydes de fer magnétite et maghémite. En effet, ces deux spectres présentent une bande double avec deux bandes discernables à 667 et 719 cm^{-1}. Cependant, l'ordre d'intensité entre les deux bandes est inversé d'un échantillon à l'autre, la bande de la magnétite étant

majoritaire pour RM1-MA2400 tandis que le pic de la maghémite est majoritaire pour MR1-MA1200. Sur ces deux spectres, la seconde bande de la maghémite à 1421 cm^{-1} est visible toutefois, il est plus important dans MR1-MA1200.

Le spectre de l'échantillon RM1-MA10 (composé de nanoparticules plus petites avec un taux de ligand 5 fois plus élevé que les deux échantillons précédents (21%)) montre principalement la bande caractéristique de la magnétite à 667cm^{-1}, celle de la maghémite à 719 cm^{-1} n'est visible que sous forme d'un épaulement du pic précédent. Enfin, la bande de la maghémite à 1421cm^{-1} a totalement disparu. Cet échantillon a donc de toute évidence une composition très proche de la magnétite pure.

Le spectre de l'échantillon MR1-MA0 montrerait quant à lui une composition intermédiaire où les bandes de la magnétite et de la maghémite sont toutes les deux observées. La moins bonne résolution de ce dernier spectre ainsi que la présence de bandes parasites entre 800 cm^{-1} et 1000 cm^{-1} viennent probablement du plus faible taux d'oxyde de fer dans cet échantillon très riche en ligand (38% massique).

Ces mesures en spectroscopie Raman donnent une première indication de la composition des échantillons conservés sous air, on constate ainsi :

- Une oxydation des NPs de très petites tailles même avec un taux de ligand important (RM1-MA0) en raison d'un rapport surface/volume conséquent.

- Des NPs vraisemblablement préservées de l'oxydation avec un taux de ligand important (RM1-MA10) quand on atteint une taille limite de NPs diminuant le rapport surface/volume.

- Une oxydation des NPs présentant un faible taux de ligand (RM1-MA1200 et RM1-MA2400).

Ces informations nécessitent cependant d'être comparées avec les mesures effectuées par les autres techniques.

Spectroscopie XPS

Avec les résultats XPS, il est attendu :

- Une identification plus fine du degré d'oxydation du fer présent dans les échantillons.

- Une estimation du pourcentage massique de magnétite non oxydée qui compose les NPs@Cit. Les mesures XPS ont été réalisées à l'institut des sciences analytiques et de physico-chimie pour l'environnement et les matériaux (IPREM) de Pau sur des échantillons conservés sous air et sous vide.

Les spectres XPS du doublet Fe2p des échantillons étudiés (figure III.15) sont une sonde suffisante et assez sensible pour déterminer les environnements chimiques du fer.

Les deux éléments importants pour distinguer la présence de fer II et donc de magnétite dans les oxydes de fer de type spinelles ont déjà été présentés lors de la caractérisation des NPs de référence. Pour rappel :

- Le premier est la présence d'un épaulement marqué vers les basses énergies de liaisons au pic Fe 2p $_{3/2}$ aux alentours de 709 eV.
- Le second élément caractéristique de la magnétite est l'absence du satellite du Fe^{3+} entre les deux pics du doublet Fe 2p, aux alentours de 719 eV.

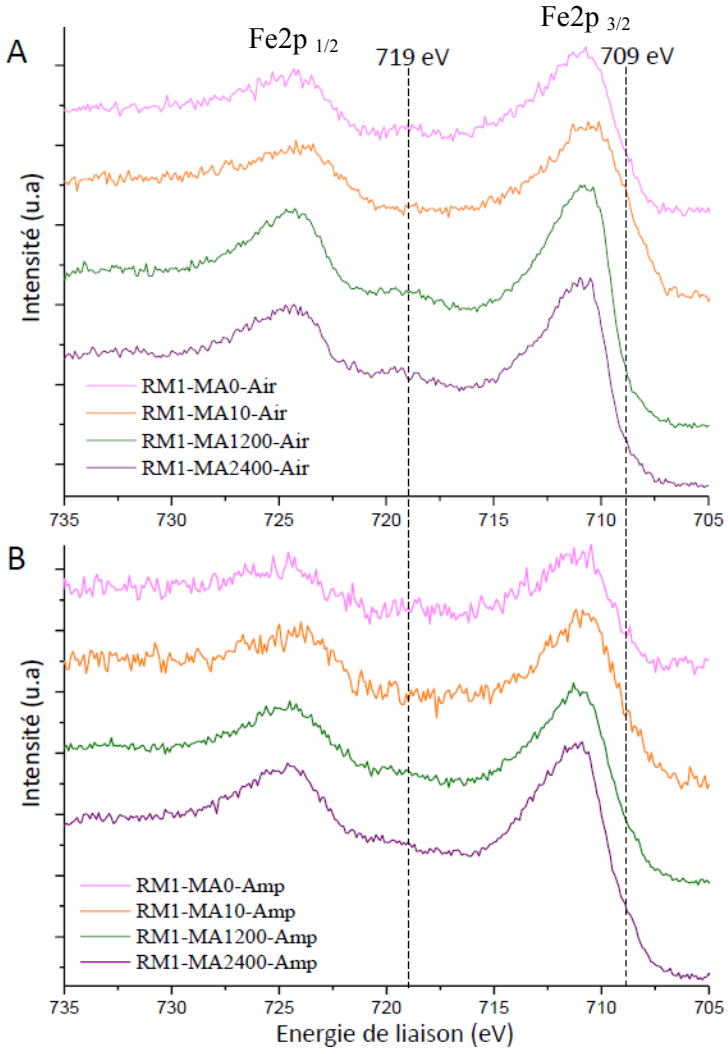


Figure III.15 : Spectres XPS du doublet Fe2p du fer pour les 4 échantillons synthétisés avec un RM = 1 et différents MA A) conservés sous air et B) conservés en ampoules sous vide.

Dans le cas des échantillons conservés à l'air, seul l'échantillon RM1-MA10-Air semble avoir été protégé de l'oxydation et être encore composé principalement de magnétite. Les trois

autres échantillons conservés à l'air présentent un satellite bien visible à 719 eV, entre les deux pics du doublet, signe clair d'oxydation en maghémite d'après l'étude des références.
En revanche, dans le cas des échantillons conservés en ampoule sous vide, il semble que tous les échantillons aient été assez préservés de l'oxydation avec cependant un début d'oxydation pour RM1-MA0-Air caractérisé par l'apparition du satellite à 719 eV.

À partir du traitement de la convolution mathématique des spectres, une estimation quantitative du pourcentage de fer II par rapport à la teneur en fer totale est réalisée en suivant la même méthode que pour les nanoparticules de référence. Puis, par comparaison avec le pourcentage molaire de fer II dans la magnétite pure qui est de 33,3 %, une estimation du pourcentage massique de magnétite peut être calculée (tableau III.10).

Échantillon	Diamètre moyen des NPs (MET)	Pourcentage atomique de Fer II calculé	Pourcentage massique de magnétite
RM1-MA0-Air	3,8 ± 0,5	20 %	61 %
RM1-MA10-Air	8,1 ± 1,7	32 %	95 %
RM1-MA1200-Air	10,7 ± 2,1	18 %	54 %
RM1-MA2400-Air	12,7 ± 2,6	19 %	57 %
RM1-MA0-Amp	3,8 ± 0,5	23 %	68 %
RM1-MA10-Amp	8,1 ± 1,7	33 %	99 %
RM1-MA1200-Amp	10,7 ± 2,1	27 %	80 %
RM1-MA2400-Amp	12,7 ± 2,6	28 %	83 %

Tableau III.10 : Calculs des pourcentages atomiques de fer II et des pourcentages massiques de magnétite associés effectués sur la base des données XPS pour les 8 échantillons étudiés.

La conservation en ampoule sous vide est vraiment efficace en réduisant très sensiblement l'oxydation ; le pourcentage de magnétite est beaucoup plus important que lors d'une conservation à l'air. Les échantillons tels que MA = 1200s ou 2400s (diamètres moyens les plus élevés) ont leur taux initial de magnétite dépassant 80% qui chute drastiquement aux alentours de 50% pour une conservation à l'air. On remarque dans les deux cas que l'échantillon de plus petite taille moyenne est plus oxydé ce qui est cohérent avec l'augmentation du rapport surface/volume qui maximise la surface d'échange avec l'air et donc l'oxydation.
Par ailleurs, RM1-MA10-Amp est composé de 99% de magnétite ; cet échantillon est d'autant plus intéressant que lorsqu'il est conservé à l'air (RM1-MA10-Air), son pourcentage de magnétite reste de 95%. Cette évolution peut paraître surprenante avec de petites tailles

moyennes (8,1 ± 1,7 nm), en comparaison avec les échantillons RM1-MA1200-Air et RM1-MA2400-Air car le rapport surface/volume pour RM1-MA10-Air est plus important ce qui favorise les échanges et devrait donc prononcer davantage son oxydation. Ces résultats XPS tendent donc à confirmer l'hypothèse formulée suite aux analyses thermogravimétriques, à savoir que la couche de ligand en surface des nanoparticules RM1-MA10-Air les aurait préservées de l'oxydation. On peut penser à ce stade qu'un taux de ligand important diminue les risques d'évolution chimique spontanée de la surface.

Le cas de l'échantillon RM1-MA0 est cependant antagoniste à ce raisonnement, puisqu'il propose le plus fort taux de ligand (38%) mais souffre de la plus forte oxydation parmi les échantillons conservés sous ampoule. Toutefois, il faut remarquer que sa composition n'a presque pas évoluée après conservation à l'air tout comme RM1-MA10, ce qui serait tout de même une indication sur le rôle des ligands comme barrière à l'oxydation dans la durée.

L'hypothèse la plus plausible reste que l'oxydation des NPs dépend à la fois de leur taille et du taux de ligand à leur surface : l'oxydation diminuerait avec augmentation du taux de ligand et augmenterait avec la diminution de taille. Dans cette hypothèse, l'échantillon RM1-MA10 serait alors le système idéal pour résister à l'oxydation en combinant de façon assez efficace ces deux paramètres. Cette évolution de l'oxydation des nanoparticules de magnétite en maghémite est en accord avec les résultats obtenus par Lionel Maurizi[19]. Ce dernier a notamment montré que le ratio molaire fer/citrate a un effet direct sur l'oxydation des échantillons lors de la synthèse de nanoparticules d'oxyde de fer magnétique par une méthode hydrothermale. Des ratios bas de 1 ou de 5 conduisant à une composition proche de la magnétite pure non oxydée tandis que les échantillons se rapprochent de la maghémite lorsque les ratios fer/citrate augmentent.

Spectroscopie Mössbauer

Pour mieux appréhender les échantillons RM1-MAy-Air (avec y = 0s, 10s, 1200s et 2400s) et afin d'estimer le degré d'oxydation du fer et le pourcentage de magnétite, des mesures par spectroscopie Mössbauer du ^{57}Fe à 300K (figure III.16.A) sont venues compléter les précédentes analyses.

N'ayant pas pu obtenir de spectres Mössbauer des nanoparticules de référence bien définis, nous présenterons exceptionnellement les spectres des références de magnétite et de

maghémite massives (figure III.16.B) afin de disposer d'une base de comparaison pour nos échantillons.

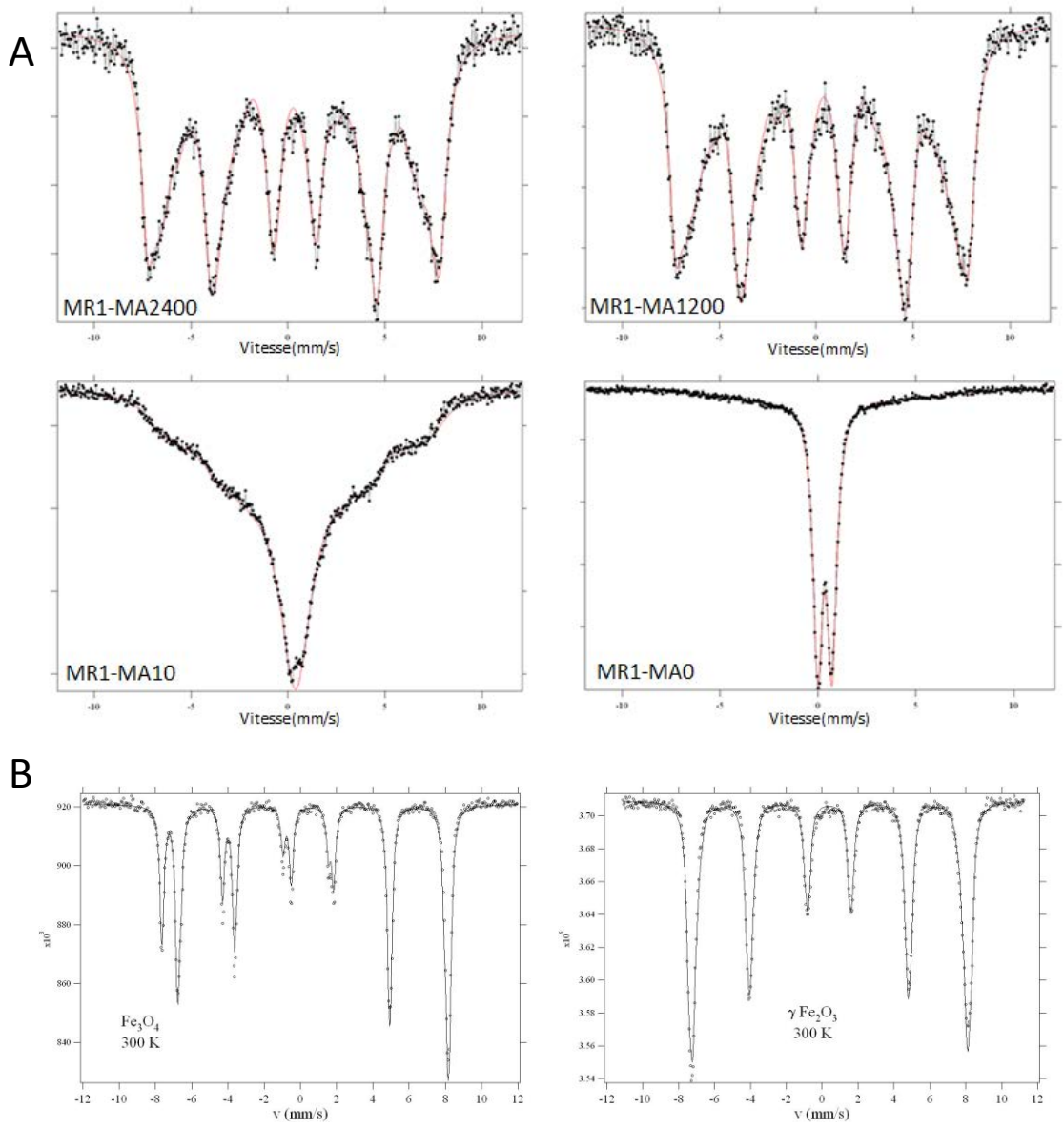


Figure III.16 : A) Spectres Mössbauer des échantillons RM1-MAy-Air (avec y = 0, 10, 1200, 2400). B) Spectres de référence de la magnétite et de la maghémite massive. Les spectres sont enregistrés à température ambiante (300K).

Les spectres des échantillons RM1-MA1200 et RM1-MA2400 présentent clairement une structure en sextuplets. Les pics d'absorption sont nettement plus larges que les pics de la magnétite massive caractérisée par la présence de trois sextuplets dont un assez bien séparé. Le spectre global de la magnétite est très asymétrique en relation avec les déplacements isomériques différents du fer II et du fer III. Les pics sont également plus larges que ceux de la maghémite massive pourtant caractérisée, si l'on se réfère à la surstructure tétragonale $P4_12_12$, par neuf sites cristallographiques différents. La faible asymétrie du spectre peut

d'ailleurs être corrélée à des effets quadrupolaires différents en relation avec la présence des lacunes qui doivent distordre le réseau.

Les spectres des échantillons RM1-MA1200 et RM1-MA2400 ne présentent pas d'asymétrie flagrante. Si des différences de valeur d'effet quadrupolaire existent, l'asymétrie qu'ils peuvent provoquer doit être largement masquée par le fort élargissement des raies.

Le fort élargissement des pics externes et la réduction de cet élargissement vers les pics internes suggèrent fortement une distribution de champ hyperfin. L'ajustement des spectres a d'ailleurs pris en compte celle-ci en introduisant des sites à effet quadrupolaire et déplacement isomérique voisins et des champs hyperfins très différents.

La principale information qu'il a été possible d'exploiter est le déplacement isomérique moyen qui renseigne sur l'état d'oxydation du fer[17,20] et qui a été calculé avec la formule

$$IS_{moy} = \frac{\sum_0^i p_i . IS_i}{\sum_0^i p_i} \qquad \textbf{[Équation III.1]}$$

où IS_i est le déplacement isomérique du $i^{éme}$ site et p_i sa proportion.

Afin d'interpréter la forme de ces spectres, il faut d'abord préciser que le diamètre critique de superparamagnétisme observé en Mössbauer est voisin de 9 ± 2 nm[21] alors que, dans le cas des mesures magnétiques ce diamètre critique de superparamagnétisme est voisin de 19 ± 2 nm[22,23]. Cette différence de diamètre critique peut être expliquée par application de la formule I.7 en considérant la différence existant entre les temps de mesure caractéristiques τ_m des différentes techniques (10 s pour les mesures magnétiques contre 10^{-8}s pour la spectroscopie Mössbauer).

L'échantillon RM1-MA0 présente un seul doublet caractéristique de nanoparticules d'oxyde de fer très petites (taille moyenne très inférieure à 9 nm) et bien isolées les unes des autres qui ont un comportement purement superparamagnétique[24]. La non-linéarité du bruit de fond de part et d'autre du doublet suggère un reliquat de sextuplets à pics très élargis.

En revanche la superposition de doublet et de sextuplet est très nette sur le spectre de l'échantillon RM1-MA10. Cet échantillon est caractérisé par une taille des NPs voisine de 9 nm, les nanoparticules de taille supérieures et inférieures à la taille critique cohabitent en quantités comparables et le spectre montre clairement la superposition d'un doublet superparamagnétique et d'un sextuplet caractéristique d'états magnétiques ordonnés.

Enfin, dans le cas des échantillons RM1-MA1200 et RM1-MA2400 composés en majorité de nanoparticules de tailles supérieures à la taille critique de superparamagnétisme, seule la structure en sextuplets est clairement visible et la présence d'un reliquat de doublet superparamagnétique provenant des nanoparticules de taille inférieure à 9 nm ne fait que contribuer au bruit de fond.

Par interpolation entre les valeurs moyennes obtenues pour les magnétite et maghémite massives, le déplacement isomérique moyen calculé à partir de ces spectres peut permettre d'estimer la composition des nanoparticules[17,20,25]. Les déplacements isomériques moyens calculés ainsi que les estimations des pourcentages de magnétite présents dans les échantillons sont présentés dans le tableau III.11.

Échantillon	Déplacement isomérique moyen	Estimations du % de magnétite (Mössbauer)	Estimations du % de magnétite (XPS)
RM1-MA0-Air	0,36	22%	61%
RM1-MA10-Air	0,41	48%	95%
RM1-MA1200-Air	0,35	18%	54%
RM1-MA2400-Air	0,39	37%	57%

Tableau III.11: Déplacements isomériques moyens et estimations des pourcentages de magnétite calculés par Mössbauer pour les échantillons conservés sous air comparés aux pourcentages déduits par XPS.

Les valeurs de pourcentage massique de magnétite au sein des échantillons calculés par spectroscopie Mössbauer sont très inférieures aux valeurs qui ont été calculées par XPS. Cette différence importante peut provenir d'une oxydation survenue lors du broyage des échantillons au mortier, opération nécessaire pour l'enregistrement des spectres Mössbauer. Il faut tout de même signaler que malgré cette différence, l'échantillon RM1-MA10 apparaît encore comme le mieux préservé de l'oxydation.

Les divergences de résultats issus de cette technique par rapport aux résultats issus des deux méthodes précédentes nous poussent à remettre en question la préparation des échantillons pour la spectroscopie Mössbauer, le broyage pouvant être responsable du moins en partie de leur oxydation.

Influence du broyage des échantillons

Afin de comprendre l'effet du broyage au mortier sur l'oxydation des nanoparticules d'oxyde de fer et ainsi confirmer nos hypothèses, un suivi par DRX de l'échantillon RM1-MA1200 a été réalisé avant broyage, après un premier broyage léger (10s avec une force modérée) et après un second broyage plus appuyé (5min avec une force plus importante).

Sur les diffractogrammes obtenus (figure III.17), on constate l'apparition après le deuxième broyage des raies (210) et (211) caractéristiques des structures $P4_232$ (Fiche PDF 04-016-4344) de la maghémite et $P4_12_12$ (Fiche PDF 04-007-2135) de la maghémite ayant des lacunes cationiques partiellement ou totalement organisées (signalées par des étoiles sur la figure III.17). De plus, le décalage de 0,12° du pic principal (311) vers des angles plus élevés, est associé à la modification du paramètre de maille de cet échantillon qui diminue de 8,376 ± 0,001 Å à 8,352 ± 0,001 Å. Les paramètres de maille de la magnétite et de la maghémite étant respectivement de 8,396 ± 0,001 Å et 8,338 ± 0,001 Å, l'évolution du paramètre de maille vers celui de la maghémite montre que le broyage de l'échantillon a fait évoluer la composition de ce dernier dans le sens de l'oxydation (magnétite vers maghémite). Le broyage fin des échantillons préalable aux seules mesures en spectroscopie Mössbauer semble donc bien être, du moins en partie, responsable des différences de résultats par rapport aux autres techniques utilisées.

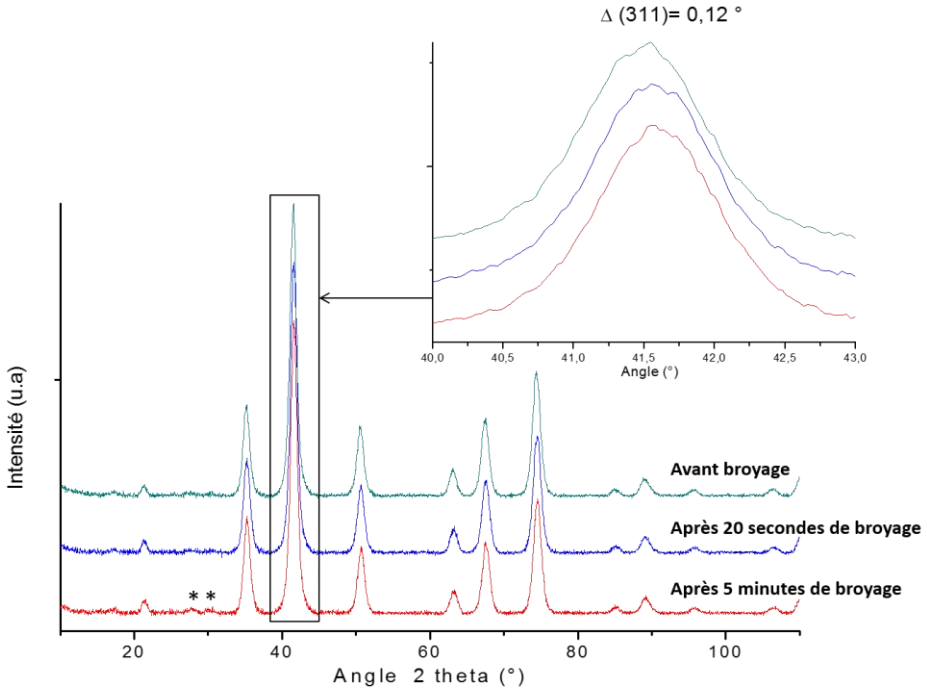


Figure III.17 : Suivi en DRX d'un échantillon de nanoparticules RM1-MA1200 avant broyage, après 20 secondes de broyage et après 5 minutes de broyage. En insert, l'agrandissement des diffractogrammes sur les pics (311).

Conclusions

La taille des nanoparticules unitaires NPs@Cit est un paramètre important dans l'oxydation observée des échantillons. En effet, en comparant les échantillons étudiés, par exemple RM1-MA2400 et RM1-MA1200, dont les tailles moyennes sont 12,7 nm et 10,7 nm respectivement, celui constitué des nanoparticules les plus grosses présente toujours un pourcentage massique de magnétite plus important (tableau III.12). La diminution du diamètre moyen des NPs@Cit induit une augmentation du rapport surface/volume maximisant ainsi la surface d'échange avec le milieu extérieur pendant et après la synthèse et donc l'oxydation surfacique est plus prononcée.

Cependant cette influence de la taille n'est pas le seul facteur à prendre en compte dans l'interprétation globale. En effet, les échantillons RM1-MA0 et RM1-MA10 sont moins oxydés que les autres alors que les tailles moyennes des NPs@Cit sont inférieures à celles des échantillons RM1-MA1200 et RM1-MA2400 (tableau III.12). La couche de ligand greffée en surface des nanoparticules est une barrière passive et naturelle au phénomène d'oxydation. En effet, RM1-MA0 et RM1-MA10 ont des taux de ligand largement supérieurs aux autres échantillons (de l'ordre de 5 à 10 fois plus en pourcentage massique). Avec davantage de ligand en surface des nanoparticules, le contact entre la surface et l'air du milieu extérieur est minimisé et le cœur des oxydes est ainsi stabilisé.

Ces deux effets sont en concurrence l'un avec l'autre. Ainsi, la diminution de la taille des nanoparticules entraîne une amplification de l'oxydation tandis que l'augmentation du taux de ligand à tendance à limiter cette oxydation.

Échantillon	Taille MET (nm)	Taux de ligand ATG (% massique)	Observations en spectroscopie Raman	% de magnétite en XPS (Air/Ampoule)	% de magnétite en Mössbauer
RM1-MA0	3,8 ± 0,5	38	Mélange, magnétite majoritaire	61%/68%	22%
RM1-MA10	8,1 ± 1,7	21	Essentiellement magnétite	95%/99%	48%
RM1-MA1200	10,7 ± 2,1	4	Mélange, maghémite majoritaire	54%/80%	18%
RM1-MA2400	12,7 ± 2,6	4	Mélange, magnétite majoritaire	57%/83%	37%

Tableau III.12 : Comparaison des résultats traitant de l'oxydation des échantillons RM1-MAy (avec y = 0s, 10s, 1200s et 2400s) obtenus par les différentes techniques de caractérisation.

3.5 Influence de la taille et du taux de ligand sur les propriétés magnétiques

Les détails concernant la préparation des échantillons et les méthodes de mesures sont présentés en annexe 1 de ce manuscrit. Dans ce chapitre, pour toutes les mesures exprimées en emu par gramme, les résultats d'ATG ont été utilisés pour ne considérer que la masse d'oxyde de fer en faisant abstraction de la masse de matériaux non magnétiques (ligands, eau adsorbée).

3.5.1 Cycles d'aimantation en fonction du champ.

Les cycles d'aimantation en fonction du champ pour quatre échantillons RMx-MAy (x = 1, 8 ; y = 0, 900 s) sont présentés à titre d'exemple en figure III.18.A. Les tailles moyennes, taux de ligand et aimantations à saturation de ces NPs@Cit sont donnés dans le tableau III.13.

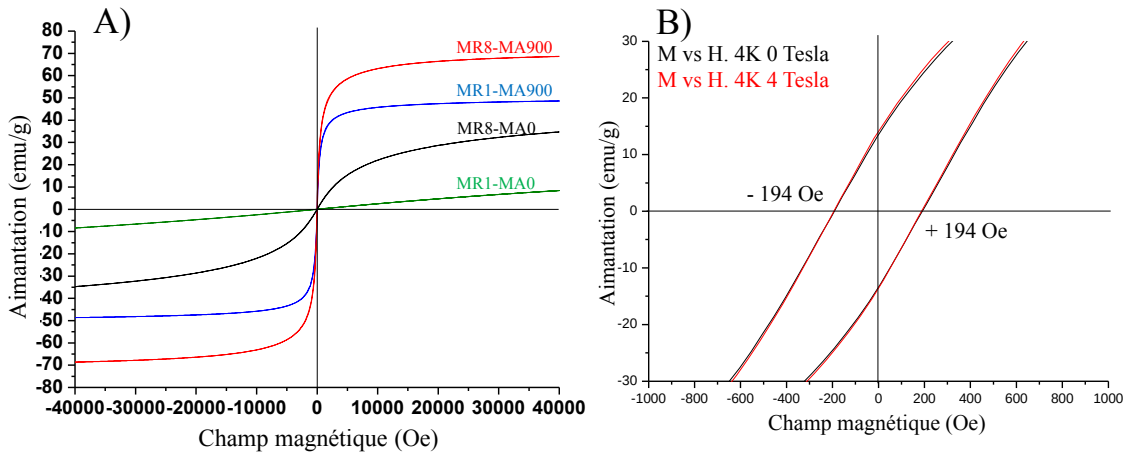


Figure III.18 : A) Cycles d'aimantation en fonction du champ magnétique à température ambiante pour 4 échantillons RMx-MAy (avec x = 1, 8 et y = 0s, 900s). B) Exemple de cycle d'aimantation à 4K sur l'échantillon RM1-MA900 refroidi avec ou sans champ de 4 Tesla appliqué.

Échantillon	Taille moyenne MET (nm) ± écart-type (nm)	Pourcentage massique de ligand (%wt)	Aimantation à saturation (emu/g)
RM8-MA900	11,4 ± 2,3	4,0 ± 0,5	69 ± 1
RM1-MA900	10,9 ± 2,0	15,0 ± 0,5	48 ± 1
RM8-MA0	4,5 ± 0,6	13,5 ± 0,5	35 ± 1
RM1-MA0	4,2 ± 0,6	38,0 ± 0,5	8 ± 1

Tableau III.13 : Tailles, taux de ligand et aimantations à saturation des 4 échantillons donnés à titre d'exemple sur la figure III.18.A.

L'aimantation à saturation diminue avec la taille des NPs@Cit lorsque celles-ci présentent des taux de ligand comparables comme entre RM1-MA900 et RM8-MA0 (tableau III.13). D'autre part, pour des tailles moyennes comparables, l'aimantation à saturation diminue cette fois avec l'augmentation du taux de ligand dans l'échantillon comme c'est le cas entre RM8-MA900 et RM1-MA900 ou encore entre RM8-MA0 et RM1-MA0.

Nous pouvons avancer, *via* ces exemples de cycles d'aimantation, que deux facteurs semblent influencer l'aimantation à saturation des NPs@Cit : la taille moyenne et le taux de ligand.

D'autre part, les courbes ne présentent pas d'ouverture de cycle induisant une aimantation rémanente et un champ coercitif nul comme ce fut le cas de toutes les NPs@Cit synthétisées.

De la même façon que pour les NPs de référence, des mesures d'aimantation en fonction du champ à basse température ont été réalisées sur des échantillons refroidis avec ou sans champ de 75 Oe appliqué. Le but de ces mesures était comme précédemment de mettre en évidence

une éventuelle structure cœur-coquille des NPs et donc d'un canting de spin entre le cœur et la coquille qui se traduit, d'après la littérature, par un décalage dans la direction contraire au champ appliqué du cycle d'hystérèse de l'échantillon refroidi sous ce champ.
L'exemple présenté figure III.18.B pour l'échantillon RM1-MA900 montre une absence totale de décalage du cycle d'aimantation en fonction du champ pour l'échantillon refroidi sous un champ magnétique de 75 Oe. Ce cycle est en effet parfaitement symétrique autour de l'origine et totalement superposable avec le cycle de l'échantillon refroidi sans champ magnétique appliqué. Il n'y a donc pas de structure cœur coquille pour cet échantillon. Sur toutes les mesures similaires effectuées sur d'autres échantillons au cours de ce travail, ce type de structure n'a d'ailleurs jamais été observé.

Nous ne pouvons pas présenter ici tous les cycles d'aimantation mesurés. Cependant, la totalité des valeurs d'aimantation à saturation des échantillons peut être consultée dans le tableau A.1 présenté en annexe 2.
Pour avoir une idée des résultats sur l'ensemble des échantillons, deux représentations graphiques des aimantations à saturation sont proposées (figure III.19) en fonction de la taille moyenne des NPs mesurée par MET et du taux de ligand.

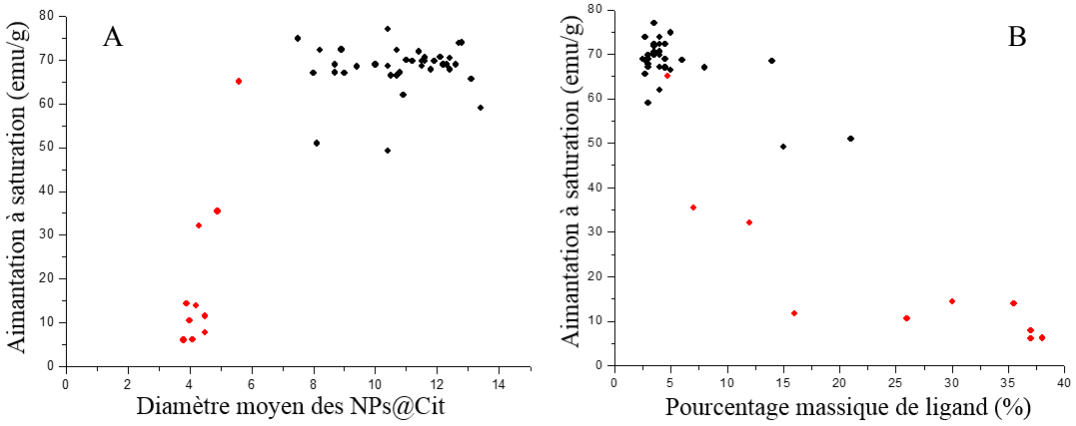


Figure III.19 : A) Représentation des aimantations à saturation des échantillons synthétisés en fonction du diamètre moyen des NPs@Cit et B) représentation des aimantations à saturation des échantillons synthétisés en fonction du pourcentage massique de ligand dans l'échantillon. Les points de données rouges sur le deuxième graphique correspondent aux échantillons dont le diamètre moyen est inférieur à 6 nm.

Globalement, l'aimantation à saturation (ou à 4 Tesla si la saturation n'est pas atteinte) tend à augmenter rapidement avec la taille des NPs@Cit de 4 à 8 nm en passant d'une aimantation très faible de l'ordre de 10 ± 5 emu/g pour les plus petites nanoparticules à une aimantation

qui se stabilise aux alentours de 70 ± 5 emu/g pour des tailles supérieures à 8 nm (figure III.19.A).

Celle-ci reste ensuite constante autour de cette valeur moyenne de 70 ± 5 emu/g pour l'ensemble des NPs de 8 à 14 nm de diamètre. Ces valeurs d'aimantation à saturation sont cohérentes avec les données de la littérature pour des nanoparticules d'oxyde de fer de diamètre moyen équivalent et fonctionnalisées par des ligands organiques (tableau Annexe 3)[26–29].

Par ailleurs, la diminution de l'aimantation à saturation est directement corrélée à l'augmentation du pourcentage de masse de ligand (figure III.19.B). Cette variation est d'autant plus marquée que la taille moyenne des NPs@Cit est faible. En effet, la baisse de l'aimantation à saturation peut être expliquée par deux principaux effets:

- La rupture de la symétrie cristalline en surface des nanoparticules réoriente la direction des spins magnétiques des atomes de fer de l'extrême surface de manière perpendiculaire à l'interface induisant l'anisotropie magnétique de surface. Ces atomes ne participent donc plus à l'aimantation globale des nanoparticules ce qui entraîne la création d'une couche morte en terme de magnétisme et diminue l'aimantation à saturation mesurée. Cet effet est particulièrement visible pour des nanoparticules très petites où le rapport surface/volume est le plus élevé.
- Par ailleurs, d'après R.Sondjaja et coll.[30], la diminution de l'aimantation à saturation pourrait également s'expliquer par les interactions magnétiques dipolaires qui se créent entre les molécules de ligand organique et les atomes de l'extrême surface des nanoparticules. Comme les spins magnétiques des atomes de surface sont orientés par la liaison chimique entre le ligand et la nanoparticule, ils ne participent plus à l'aimantation à saturation des nanoparticules. Le rapport surface/volume étant plus important pour des petites nanoparticules, ces dernières sont d'autant plus affectées par cet effet.

3.5.2 Mesure de l'aimantation en fonction de la température (ZFC/FC)

La température de blocage des échantillons correspond à la température pour laquelle le courbe ZFC passe par un maximum. Ces températures sont indiquées dans le tableau A.1 en annexe 2. Pour les échantillons où le maximum n'est pas atteint au-dessous de 300K, la

température de blocage ne peut pas être estimée, l'indication >300K est inscrite dans le tableau.

Les mesures ZFC/FC effectuées sur les 4 mêmes NPs@Cit RMx-MAy que dans le paragraphe précédent sont présentées sur la figure III.20. Les températures de blocage mesurées sont présentées dans le tableau III.15.

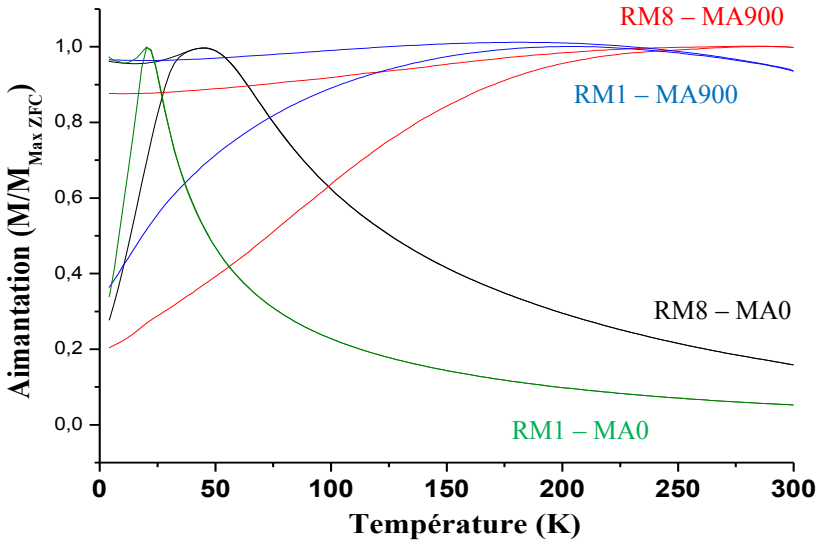


Figure III.20 : Exemple courbes ZFC/FC pour 4 échantillons RMx-MAy (avec x = 1, 8 et y = 0s, 900s) permettant de déterminer leurs T_B.

Échantillon	Taille moyenne MET (nm) ± écart-type (nm)	Pourcentage massique de ligand (%wt)	Température de blocage (K) mesurée
RM8-MA900	11,4 ± 2,3	4,0 ± 0,5	270
RM1-MA900	10,9 ± 2,0	15,0 ± 0,5	200
RM8-MA0	4,5 ± 0,6	13,5 ± 0,5	45
RM1-MA0	4,2 ± 0,6	38,0 ± 0,5	18

Tableau III.15 : Taille, taux de ligand et température de blocage des 4 échantillons donnés à titre d'exemple sur la figure III.20.

La température de blocage augmente lorsque la taille moyenne des NPs@Cit augmente. Ainsi, l'échantillon RM1-MA900 a en effet une T_B beaucoup plus élevée que celle de l'échantillon RM8-MA0 (200K contre 45K) quand leur taux de ligand sont similaires. Mais, la T_B diminue lorsque le pourcentage massique de ligand citrate en surface des NPs@Cit augmente (tableau III.14). On peut également noter que la largeur du pic de la ZFC augmente de manière importante avec la taille des nanoparticules, signe d'une plus grande dispersion en taille. En effet, chaque échantillon présente en fait une distribution de températures de blocage, et celle

donnée ici correspond au maximum de la courbe ZFC. Comme pour l'aimantation à saturation, au vu de ces exemples, on peut déterminer que la taille moyenne des nanoparticules ainsi que le taux de ligand en surface affectent la température de blocage.

À partir de tous les résultats obtenus, l'évolution de T_B par rapport au diamètre moyen des nanoparticules dans l'échantillon ou du pourcentage massique de ligand est représentée sur la figure III.21. Pour plus de lisibilité et afin de pouvoir mettre en relation ces deux graphiques, un code couleur a été appliqué au second en fonction du diamètre moyen ($\bar{d}$) des échantillons : Bleu si $\bar{d}$ < 6 nm, rouge si 6 nm < $\bar{d}$ < 10 nm et noir si $\bar{d}$ > 10 nm.

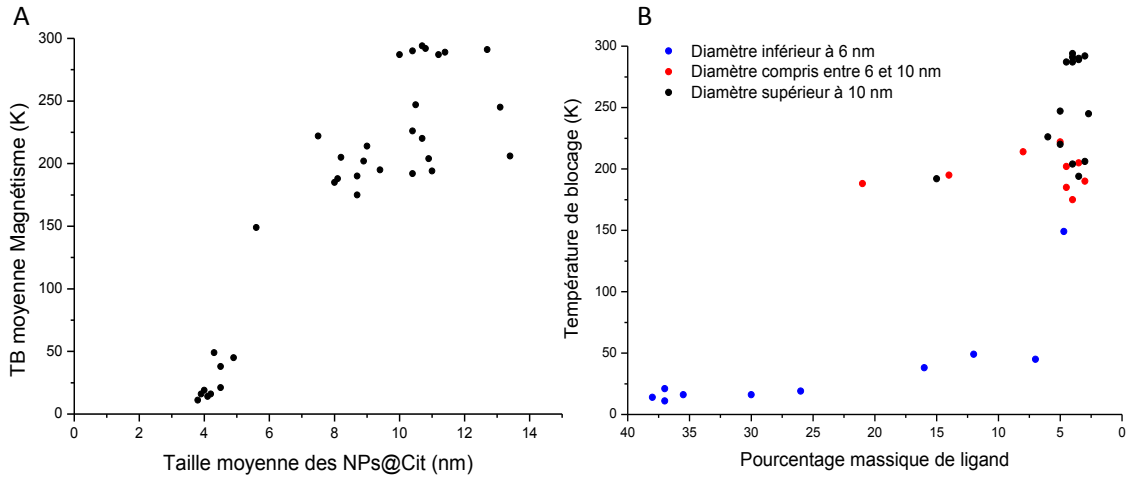


Figure III.21 : Représentation de : A) l'évolution de la température de blocage des échantillons en fonction du diamètre moyen des NPs@Cit. B) l'évolution de la température de blocage des échantillons en fonction du pourcentage massique de ligand dans l'échantillon.

L'évolution visible sur la figure III.21 confirme que la température de blocage augmente fortement avec la taille des nanoparticules[31]. Cela est cohérent avec l'équation I.7[32] qui montre une corrélation entre le volume des nanoparticules et leur température de blocage T_B.

$$T_B = \frac{K_{an}^{tot}.V}{25.k_B} \qquad \textbf{[Équation I.7]}\ ^{32}$$

Sur la figure III.21.B, plus le pourcentage de ligand est faible, plus la température de blocage de l'échantillon augmente. On remarquera que cette influence est d'autant plus visible pour les plus petites NPs@Cit ($\bar{d}$ < 6 nm) : En effet, T_B = 10 K pour un échantillon de 4,5 ± 1,0 nm ayant 36% de ligand alors que T_B = 148 K pour un échantillon de même taille ayant 5% de ligand. Tandis que pour les nanoparticules de $\bar{d}$ > 6 nm, la température de blocage T_B se situe entre 200K et 300K quel que soit le taux de ligand.

Cette augmentation de T_B pour les nanoparticules entourées de moins de ligand trouve son origine dans les interactions magnétiques dipolaires entre NPs. Ces interactions vont rendre plus difficile le retournement de l'aimantation spontanée et ainsi augmenter de manière importante la température de blocage des nanoparticules [31,33–35]. Cependant, une couche de ligand importante en surface des nanoparticules favorise une augmentation de la distance interparticule; cela a un effet d'écrantage sur les interactions dipolaires entre nanoparticules et contribue ainsi à abaisser la température de blocage.

3.6 Bilan

L'influence du rapport molaire de ligand citrate introduit pendant la synthèse et l'influence du moment d'ajout de ce même ligand sur les paramètres structuraux, morphologiques et magnétiques des NPs@Cit ont été étudiées.

Le moment d'ajout du ligand a une grande importance sur le diamètre moyen des NPs@Cit. Il est alors possible de contrôler la taille des NPs@Cit dont les diamètres peuvent être contrôlés de 4 à 13 nm, la forme des nanoparticules formées restant sphérique dans tous les cas.

Le rapport molaire fer/ligand introduit en début de synthèse a une influence sur le pourcentage massique de ligand dans l'échantillon en fin de synthèse ; plus on introduit de ligand au début, plus il en reste en surface des NPs après lavage. Ce lien est plus marqué sur les échantillons pour lesquels le ligand est introduit tôt dans le milieu réactionnel. Le pourcentage massique de ligand dans l'échantillon qui découle du rapport introduit a pour sa part un effet sur la dispersion des nanoparticules dans la suspension aqueuse. Plus la quantité de ligand est importante et moins il y a d'aglomération des NPs@Cit.

En plus d'analyses thermogravimétriques sur les NPs@Cit, des analyses de leur surface en XPS et en FTIR ont pu confirmer la nature et l'intégrité du ligand citrate lié à la surface des NPs.

L'influence du diamètre moyen et l'influence du pourcentage massique de ligand sur l'état d'oxydation et les propriétés magnétiques des NPs@Cit ont également été étudiées.

Deux effets ont été observés sur l'état d'oxydation. Si le diamètre moyen des nanoparticules diminue, l'oxydation de surface augmente. Cependant, l'augmentation du pourcentage massique de ligand entraînant une diminution de la taille a un effet de protection contre l'oxydation. Ainsi, les échantillons les moins oxydés sont ceux pour lesquels une forte quantité de ligand est introduite très peu de temps après la germination.

Du point de vue des propriétés magnétiques, il apparaît que l'aimantation à saturation de l'échantillon diminue avec la diminution de taille moyenne des nanoparticules et avec l'augmentation du pourcentage massique de ligand non magnétique dans l'échantillon, résultat en accord avec la littérature. L'effet d'écrantage des interactions dipolaires du ligand, d'autant plus fort que le pourcentage massique de ligand est élevé, provoque alors une diminution de la température de blocage mesurée des échantillons.

Les nanoparticules, dont les propriétés magnétiques et la stabilité en suspension pourraient permettre des utilisations dans le domaine biomédical, sont celles synthétisées avec des ratios fer/ligand bas (1 ou 2) et dont la taille est comprise entre 7,0 et 11,0 nm. Ainsi, les tests en milieu biologique présentés dans le chapitre suivant seront menés sur deux échantillons de nanoparticules, l'un présentant une taille moyenne de 7 nm et l'autre une taille moyenne de 10 nm.

Références bibliographiques – Chapitre 3 :

1. Massart, R. Preparation of Aqueous Magnetic Liquids in Alkaline and Acidic Media. *Ieee Trans. Magn.* **17,** 1247–1248 (1981).
2. Kotsmar, C., Yoon, K. Y., Yu, H., Ryoo, S. Y., Barth, J., Shao, S., Prodanovic, M., Milner, T. E., Bryant, S. L., Huh, C. & Johnston, K. P. Stable Citrate-Coated Iron Oxide Superparamagnetic Nanoclusters at High Salinity. *Ind. Eng. Chem. Res.* **49,** 12435–12443 (2010).
3. Hohnholt, M. C., Geppert, M., Nuernberger, S., von Byern, J., Grunwald, I. & Dringen, R. Advanced Biomaterials Accumulation of Citrate-Coated Magnetic Iron Oxide Nanoparticles by Cultured Brain Astrocytes. *Adv. Eng. Mater.* **12,** B690–B694 (2010).
4. Bee, A., Massart, R. & Neveu, S. Synthesis of Very Fine Maghemite Particles. *J. Magn. Magn. Mater.* **149,** 6–9 (1995).
5. Bee, A., Massart, R. & Neveu, S. Synthesis of Very Fine Maghemite Particles. *J. Magn. Magn. Mater.* **149,** 6–9 (1995).
6. Yoon, K. Y., Xue, Z., Fei, Y., Lee, J. H., Cheng, V., Bagaria, H. G., Huh, C., Bryant, S. L., Kong, S. D., Ngo, V. W., Rahmani, A.-R., Ahmadian, M., Ellison, C. J. & Johnston, K. P. Control of magnetite primary particle size in aqueous dispersions of nanoclusters for high magnetic susceptibilities. *J. Colloid Interface Sci.* **462,** 359–367 (2016).
7. Ishikawa, T., Kataoka, S. & Kandori, K. The Influence of Carboxylate Ions on the Growth of Beta-Feooh Particles. *J. Mater. Sci.* **28,** 2693–2698 (1993).
8. Sidhu, P., Gilkes, R. & Posner, A. Synthesis and Some Properties of Co, Ni, Zn, Cu, Mn and Cd Substituted Magnetites. *J. Inorg. Nucl. Chem.* **40,** 429–435 (1978).
9. Nunes, E. da S., Brettas Carneiro, M. L., Simoes de Oliveira, R. G., Bao, S. N. & de Souza, A. R. Colloidal stability, surface characterisation and intracellular accumulation of Rhodium(II) citrate coated super paramagnetic iron oxide nanoparticles in breast tumour: a promising platform for cancer therapy. *J. Nanoparticle Res.* **15,** 1683 (2013).
10. Jayaprabha, K. N. & Joy, P. A. Citrate modified beta-cyclodextrin functionalized magnetite nanoparticles: a biocompatible platform for hydrophobic drug delivery. *Rsc Adv.* **5,** 22117–22125 (2015).
11. Jing, J., Zhang, Y., Liang, J., Zhang, Q., Bryant, E., Avendano, C., Colvin, V. L., Wang, Y., Li, W. & Yu, W. W. One-step reverse precipitation synthesis of water-dispersible superparamagnetic magnetite nanoparticles. *J. Nanoparticle Res.* **14,** 827 (2012).
12. Cheraghipour, E., Javadpour, S. & Mehdizadeh, A. R. Citrate capped superparamagnetic iron oxide nanoparticles used for hyperthermia therapy. *J. Biomed. Sci. Eng.* **05,** 715 (2012).
13. Lim, M. S., Feng, K., Chen, X., Wu, N., Raman, A., Nightingale, J., Gawalt, E. S., Korakakis, D., Hornak, L. A. & Timperman, A. T. Adsorption and desorption of stearic acid self-assembled monolayers on aluminum oxide. *Langmuir* **23,** 2444–2452 (2007).
14. Bronstein, L. M., Huang, X., Retrum, J., Schmucker, A., Pink, M., Stein, B. D. & Dragnea, B. Influence of Iron Oleate Complex Structure on Iron Oxide Nanoparticle Formation. *Chem. Mater.* **19,** 3624–3632 (2007).
15. Soderlind, F., Pedersen, H., Petoral, R. M., Kall, P. O. & Uvdal, K. Synthesis and characterisation of Gd2O3 nanocrystals functionalised by organic acids. *J. Colloid Interface Sci.* **288,** 140–148 (2005).
16. Rubim, J. C., Sousa, M. H., Silva, J. C. O. & Tourinho, F. A. Raman spectroscopy as a powerful technique in the characterization of ferrofluids. *Braz. J. Phys.* **31,** 402–408 (2001).
17. Daou, T. J., Pourroy, G., Begin-Colin, S., Greneche, J. M., Ulhaq-Bouillet, C., Legare, P., Bernhardt, P., Leuvrey, C. & Rogez, G. Hydrothermal synthesis of monodisperse magnetite nanoparticles. *Chem. Mater.* **18,** 4399–4404 (2006).
18. Thomas, G., Demoisson, F., Heintz, O., Geoffroy, N., Saviot, L. & Millot, N. Functionalized Fe3O4 nanoparticles: influence of ligand addition sequence and pH during their continuous hydrothermal synthesis. *RSC Adv.* **5,** 78614–78624 (2015).
19. Maurizi, L., Bouyer, F., Paris, J., Demoisson, F., Saviot, L. & Millot, N. One step continuous hydrothermal synthesis of very fine stabilized superparamagnetic nanoparticles of magnetite. *Chem. Commun. Camb. Engl.* **47,** 11706–11708 (2011).

20. da Costa, G. M., Blanco-Andujar, C., De Grave, E. & Pankhurst, Q. A. Magnetic Nanoparticles for in Vivo Use: A Critical Assessment of Their Composition. *J. Phys. Chem. B* **118,** 11738–11746 (2014).
21. International Workshop on Studies of Magnetic Properties of Fine Particles and their Relevance to Materials Science, Dormann, J. L. & Fiorani, D. *Magnetic properties of fine particles: proceedings of the International Workshop on Studies of Magnetic Properties of Fine Particles and their Relevance to Materials Science, Rome, Italy, November 4-8, 1991*. (North-Holland, 1992).
22. Teja, A. S. & Koh, P.-Y. Synthesis, properties, and applications of magnetic iron oxide nanoparticles. *Prog. Cryst. Growth Charact. Mater.* **55,** 22–45 (2009).
23. Chatterjee, K., Sarkar, S., Rao, K. J. & Paria, S. Core/shell nanoparticles in biomedical applications. *Adv. Colloid Interface Sci.* **209,** 8–39 (2014).
24. Tronc, E., Ezzir, A., Cherkaoui, R., Chaneac, C., Nogues, M., Kachkachi, H., Fiorani, D., Testa, A. M., Greneche, J. M. & Jolivet, J. P. Surface-related properties of gamma-Fe2O3 nanoparticles. *J. Magn. Magn. Mater.* **221,** 63–79 (2000).
25. Brice Basly. Conception et caractérisation de nano-objets magnétiques pour l'imagerie par résonance magnétique (IRM). (Strasbourg, 2010).
26. Sun, S. H., Zeng, H., Robinson, D. B., Raoux, S., Rice, P. M., Wang, S. X. & Li, G. X. Monodisperse MFe2O4 (M = Fe, Co, Mn) nanoparticles. *J. Am. Chem. Soc.* **126,** 273–279 (2004).
27. Hui, C., Shen, C., Yang, T., Bao, L., Tian, J., Ding, H., Li, C. & Gao, H.-J. Large-scale Fe3O4 nanoparticles soluble in water synthesized by a facile method. *J. Phys. Chem. C* **112,** 11336–11339 (2008).
28. Carenza, E., Barcelo, V., Morancho, A., Montaner, J., Rosell, A. & Roig, A. Rapid synthesis of water-dispersible superparamagnetic iron oxide nanoparticles by a microwave-assisted route for safe labeling of endothelial progenitor cells. *Acta Biomater.* **10,** 3775–3785 (2014).
29. HongZhang, Q., Biao, Y., ChengKui, L. & Wei, L. Synthesis and characterization of water-soluble magnetite nanocrystals via one-step sol-gel pathway. *Sci. China-Phys. Mech. Astron.* **54,** 1239–1243 (2011).
30. Sondjaja, R., Hatton, T. A. & Tam, M. K. C. Clustering of magnetic nanoparticles using a double hydrophilic block copolymer, poly(ethylene oxide)-b-poly(acrylic acid). *J. Magn. Magn. Mater.* **321,** 2393–2397 (2009).
31. Chatterjee, J., Haik, Y. & Chen, C.-J. Size dependent magnetic properties of iron oxide nanoparticles. *J. Magn. Magn. Mater.* **257,** 113–118 (2003).
32. Arnaud Hillion. Études des propriétés magnétiques d'assemblées de nanoparticules de Co, FeRh et FeAu. (Lyon 1, 2012).
33. Sreeja, V. & Joy, P. A. Effect of inter-particle interactions on the magnetic properties of magnetite nanoparticles after coating with dextran. *Int. J. Nanotechnol.* **8,** 907–915 (2011).
34. Goya, G. F. & Morales, M. P. Field Dependence of Blocking Temperature in Magnetite Nanoparticles. *J. Metastable Nanocrystalline Mater.* **20–21,** 673–678 (2004).
35. Sreeja, V., Jayaprabha, K. N. & Joy, P. A. Water-dispersible ascorbic-acid-coated magnetite nanoparticles for contrast enhancement in MRI. *Appl. Nanosci.* **5,** 435–441 (2015).

Chapitre 4 : Interaction avec les cellules et perspectives de fonctionnalisation

4.1 Interaction avec les cellules des nano-systèmes NPs et NPs@Cit 129

4.1.1 Étude de la stérilisation préalable aux tests biologiques 130

4.1.2 Étude de l'internalisation cellulaire 131

4.1.3 Étude de l'activité mitochondriale 137

4.1.4 Bilan 141

4.2 Modification de la couronne organique 143

4.2.1 Utilisation de la couronne de citrate comme précurseur de fonctionnalisation 143

4.2.2 Synthèse et caractérisation des NPs d'oxyde de fer fonctionnalisées par des polyoxazolines (NPs@POx et NPs@POx-Acide) 148

Références bibliographiques – Chapitre 4

Chapitre 4 : Interaction avec les cellules et perspectives de fonctionnalisation

4.1 Interaction avec les cellules des nano-systèmes NPs et NPs@Cit

Avant d'envisager l'utilisation de nos nano-systèmes pour des essais cliniques, il est primordial de s'assurer des interactions qu'ils peuvent avoir avec les milieux biologiques et ainsi de leur biocompatibilité. Cette étude de la biocompatibilité est réalisée par des tests *in vitro*, c'est-à-dire dans des milieux de culture cellulaire comprenant un type de cellule voulu. Nous nous sommes intéressés ici aux cellules souches mésenchymateuses humaines (CSMs), qui sont des cellules très utilisées en ingénierie tissulaire du cartilage. En effet, associées à un biomatériau tuteur et avec l'application de différents facteurs de croissance, ces cellules ont la capacité de se différencier très facilement en cellules « chondrocyte-like ». Le biomatériau fonctionnalisé, présentant les mêmes caractéristiques qu'un cartilage sain, peut ensuite être implanté au sein d'une lésion focale cartilagineuse lors de greffes pour « reconstruire » le cartilage. Ainsi, les nanoparticules de fer fonctionnalisées par des citrates que nous avons synthétisées seraient d'un grand intérêt dans ce cas. En effet, si celles-ci peuvent s'internaliser dans les cellules CSMs sans les endommager ni affecter leur comportement, elles pourraient permettre de suivre une réparation cartilagineuse par IRM, après implantation du greffon cartilagineux contenant des cellules marquées avec ces nanoparticules[1]. Des études préliminaires sont donc nécessaires pour s'assurer que l'utilisation des nanoparticules pour marquer les cellules ne va pas affecter leur phénotype.

Dans cette partie, nous allons d'abord présenter les tests effectués afin d'apprécier l'internalisation cellulaire c'est-à-dire la capacité des nanoparticules fonctionnalisées par des citrates à pénétrer dans les cellules.

Puis, la cytotoxicité éventuelle de deux lots de nanoparticules fonctionnalisées par des citrates de deux tailles différentes sera évaluée. Cette cytotoxicité sera dans une première approche étudiée par des mesures d'activité mitochondriale sur des lots de cellules exposées à des concentrations croissantes de nanoparticules pendant un temps déterminé.

Afin d'apprécier l'effet de la fonctionnalisation par les citrates des nanoparticules d'oxyde de fer sur leur biocompatibilité, ces deux études seront en parallèle réalisées sur un lot de nanoparticules nues de 14 nm (de type magn14).

4.1.1 Étude de la stérilisation préalable aux tests biologiques

Dans la mesure où ces manipulations incluent l'utilisation de nos nanoparticules dans un milieu biologique, il faut s'assurer de la stérilité de ces dernières. En effet, une contamination bactérienne (ou par d'autres micro-organismes) de nos échantillons est totalement à proscrire pour pouvoir envisager de les utiliser au sein d'une culture cellulaire de plusieurs semaines, pouvant aller jusqu'à une implantation.

Il existe en biologie deux principales méthodes de stérilisation des échantillons. La première est la filtration en seringue par des filtres « 0,22µ » dont les pores de 0,22µm empêchent le passage d'entités biologiques parasites. La seconde méthode consiste à passer l'échantillon à l'autoclave à 120°C pendant 30 min pour se débarrasser de toute entité biologique parasite.

Afin de déterminer quel protocole de stérilisation appliquer pour nos échantillons de nanoparticules nues NPs et de nanoparticules fonctionnalisées par des citrates NPs@Cit, des tests de stérilisation préalable ont été effectués. Trois protocoles de stérilisation différents ont été testés sur un lot de nanoparticules nues de 14 nm (NPs) et sur un lot de nanoparticules fonctionnalisées par des citrates de 10 nm (NPs@Cit10) :

- La stérilisation par filtration de la solution de stockage (10 mg/mL) de nanoparticules.
- La stérilisation par autoclave de la solution de stockage de nanoparticules en solution.
- La stérilisation par autoclave des nanoparticules sous forme de poudre, suivie de leur remise en solution en milieu stérile.

Après ces essais, des caractérisations par DRX, microscopie, mesures magnétiques et DLS ont été effectuées afin de s'assurer que la stérilisation ne modifiait pas les caractéristiques physicochimiques des nanoparticules. De plus, la concentration en nanoparticules des solutions après stérilisation a été déterminée à nouveau afin d'estimer les éventuelles pertes de matière au cours de la stérilisation.

La stérilisation par filtration a été écartée très vite car une grande partie des échantillons restait bloquée dans le filtre, particulièrement dans le cas des nanoparticules nues. La perte d'échantillon étant quasi-totale, les nombreuses caractérisations exigeant une quantité minimale de poudre (20 mg) n'ont pas pu être réalisées dans ces conditions.

Les caractérisations en DRX, MET et mesures magnétiques effectuées sur les échantillons NPs et NPs@Cit10 stérilisés par autoclave n'ont montré aucune modification

physicochimique de ces échantillons quelle que soit leur forme (poudre ou solution concentrée).

Cependant, deux paramètres nous ont conduit à choisir le passage en autoclave des échantillons en solution. D'une part, les mesures DLS effectuées sur des échantillons stérilisés sous forme de poudre, puis remis en solution après stérilisation, ont permis de constater leur agrégation rapide, même dans le cas de nanoparticules fonctionnalisées par des citrates. D'autre part, les difficultés liées à la remise en solution d'échantillons passés par phase sèche conduisent à une perte de 60% de la masse de nanoparticules alors que les pertes (dues essentiellement aux changements de récipients) dans le cas d'échantillons stérilisés en solution sont inférieures à 5% de la masse de nanoparticules. Ajoutons que le choix de cette voie de stérilisation évite également les problèmes de sécurité liés au stockage et à la manipulation en grande quantité de nanoparticules sous forme de poudres sèches.

Pour la suite des tests biologiques, tous les échantillons seront donc stérilisés par autoclave 30 min à 120°C sous forme de solutions concentrées de nanoparticules. Trois lots d'échantillons ont été choisis pour les tests biologiques. Ceux-ci sont NPs et NPs@Cit10 qui ont déjà servi aux tests préliminaires ainsi qu'un échantillon de nanoparticules fonctionnalisées par des citrates de 7 nm que l'on nommera NPs@Cit7. Après stérilisation, plusieurs solutions de nanoparticules avec huit concentrations différentes en µg de Fe par mL ont été réalisées à partir de ces trois échantillons (tableau IV.1). Les concentrations d'origine des échantillons étant de 10,00 ± 0,01 mg/mL pour NPs et NPs@Cit7 et de 6,00 ± 0,01 mg/mL pour NPs@Cit10.

Concentrations en fer (en µg de Fe par mL)							
12,5	25	50	100	200	400	800	1600

Tableau IV.1 : Récapitulatif des concentrations en fer testées en milieu biologique.

Pour chaque concentration de chaque échantillon, deux essais ont été effectués avec ou sans ajout de Poly-L-Lysine (PLL) dans le milieu à une concentration de 375 ng/mL [1]. Ce produit est un agent de transfection qui facilite l'endocytose, c'est-à-dire l'internalisation cellulaire des nanoparticules d'oxyde de fer.

4.1.2 Étude de l'internalisation cellulaire

Pour réaliser les cultures cellulaires, de la moelle osseuse est récupérée dans une solution héparinée supplémentée en antibiotiques lors de la mise en place de prothèse totale de hanche dans le Service de Chirurgie Orthopédique et Traumatologique du CHU de Nancy (Pr D.

Mainard – Collaboration : Pr L. Galois en partenariat avec l'Unité de Thérapie Cellulaire et Tissus du CHU de Nancy : Pr J.F. Stoltz – Collaboration : Dr D. Bensoussan). Après ajout de milieu de culture, la moelle est centrifugée à 1500 tr/min pendant 5 minutes et le culot est repris dans du milieu de culture. Les cellules sont ensuite ensemencées dans des flasques 75 cm² (à raison de $3{,}75.10^6$ cellules par flasque) et placées à l'incubateur à 37°C et avec 5% de CO_2. Le milieu doit être changé après 48 heures afin d'éliminer les cellules hématopoïétiques. Les cellules souches mésenchymateuses sont isolées simplement par leur propriété d'adhésion au plastique des flasques de culture.

Le milieu est changé deux à trois fois par semaine. Le milieu de culture utilisé pour l'expansion cellulaire a la composition suivante : Milieu DMEM 1g/l de glucose (31885, Invitrogen) contenant 10% de Sérum de Veau Fœtal (SVF, Sigma), 1 ng/ml de bFGF (R&D, France).

Ensemencement :

Des cellules CSMs sont ensemencées dans des plaques de 24 puits (25000 cellules/puits) contenant des petites lamelles de verres. A 50-70 % de confluence, les cellules sont marquées ou non (un lot de cellules témoin n'est pas marqué par les nanoparticules) pendant 24h par les différentes concentrations de nanoparticules d'oxyde de fer. Les trois types de nanoparticules testées (NPs, NPs@Cit10 et NPs@Cit7) sont utilisées avec ou sans ajout de l'agent de transfection PLL.

Après 24 heures de mise en contact des différentes nanoparticules avec les cellules, les cellules sont lavées 3 fois avec du PBS puis maintenues dans l'incubateur à 37°C et avec 5% de CO_2 dans le même milieu de culture que celui utilisé précédemment.

Les cellules sont ensuite fixées par une solution de Paraformaldéhyde (PFA) à 4 % pendant 15 minutes à différents temps : 24h, 48h, et 72h. Elles sont conservées ensuite à 4°C jusqu'à la réalisation de la coloration de Perls.

Coloration de Perls :

L'appréciation de l'internalisation cellulaire des nanoparticules a été réalisée par une coloration de Perls (ou bleu de Prusse). Cette coloration met en évidence les complexes insolubles contenant du fer. En milieu acide, les ions ferriques réagissent avec le ferrocyanure

de potassium en donnant un précipité, le ferrocyanure ferrique de formule $Fe_4[Fe(CN)_6]_3$ (appelé bleu de Prusse). Le protocole permettant de réaliser cette coloration est le suivant :

Après le temps souhaité (24, 48 ou 72 heures), les cellules sont tout d'abord fixées par l'ajout de 1 mL de PFA 4% par puits pendant 15 minutes. Les cellules sont ensuite rincées au PBS puis à l'eau afin d'éliminer le PFA.

Puis, les cellules sont mises à incuber avec un volume de ferrocyanure de potassium ($K_4[Fe(CN)_6]$) à 2% et un volume d'acide chlorhydrique (HCl) à 2% pendant 15 minutes. Cette étape vise à colorer les zones où l'oxyde de fer est présent par la création du complexe « bleu de Prusse ». Cette étape est suivie d'un nouveau rinçage à l'eau.

Une contre-coloration est ensuite réalisée avec du Kernchtrot pendant 5 minutes. Cette étape a pour but de colorer les cellules en rose afin de mieux les distinguer lors de l'observation en comparaison avec les nanoparticules mises en évidence par leur coloration en bleu. Après cette deuxième coloration, les cellules sont une fois encore rincées à l'eau puis déshydratées par trois bains successifs d'éthanol absolu.

La dernière étape consiste au « montage » des lames de microscope. Les lamelles contenant les cellules sont retirées des puits, trempées dans un bain de toluène, pour pouvoir être ensuite collées de façon permanente sur des lames de microscope à l'aide d'une résine Eukitt afin d'y être observées (Le toluène fond brièvement la résine avant de s'évaporer, les lames de microscope préparées ainsi restent observables sans modification pendant plusieurs années.).

Observations microscopiques :

Les différents échantillons biologiques observés pour chaque temps et chaque type de NPs (24h, 48h, 72h – NPs, NPs@Cit10, NPs@Cit7) sont présentés dans le tableau IV.2. Les cases coloriées en bleu correspondent aux lames dont les images de microscopie sont présentées dans cette partie. En effet, par souci de lisibilité, une partie seulement des échantillons observés est présentée dans les figures suivantes avec différentes concentrations de fer et avec ou sans PLL :

- Figure IV.1 pour NPs.
- Figure IV.2 pour NPs@Cit10.
- Figure IV.3 pour NPs@Cit7.

Concentration en µg Fe/ml	0	12,5	25	50	100	200	400	800	1600
NPs	+ PLL	+ PLL	+ PLL	+ PLL	+ PLL	+ PLL	+ PLL	+ PLL	+ PLL
NPs	- PLL	- PLL	- PLL	- PLL	- PLL	- PLL	- PLL	- PLL	- PLL
NPs@Cit10	+ PLL	+ PLL	+ PLL	+ PLL	+ PLL	+ PLL	+ PLL	+ PLL	+ PLL
NPs@Cit10	- PLL	- PLL	- PLL	- PLL	- PLL	- PLL	- PLL	- PLL	- PLL
NPs@Cit7	+ PLL	+ PLL	+ PLL	+ PLL	+ PLL	+ PLL	+ PLL	+ PLL	+ PLL
NPs@Cit7	- PLL	- PLL	- PLL	- PLL	- PLL	- PLL	- PLL	- PLL	- PLL

Tableau IV.2 : Tableau représentant les tests d'internalisation réalisés pour le temps d'ensemencement de 72 heures sur les trois types de nanoparticules avec les 8 concentrations de Fe différentes et avec ou sans PLL.

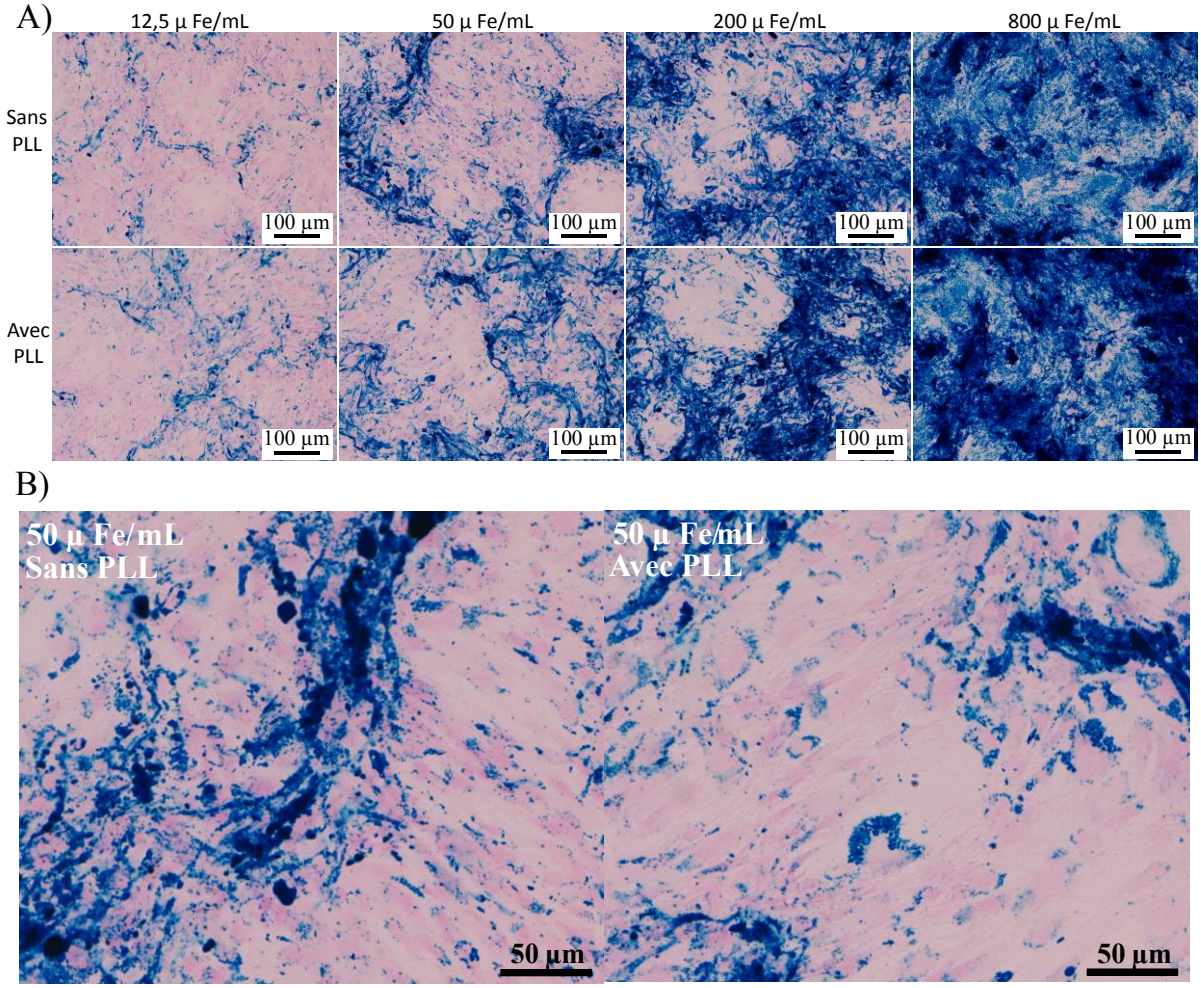


Figure IV.1 : A) Images de microscopie optique pour les tests d'internalisation des nanoparticules NPs avec ou sans utilisation de PLL pour un temps d'ensemencement de 72 heures et quatre concentrations différentes. B) Agrandissement des images pour une concentration en fer de 50 µg de Fe par mL sans et avec PLL.

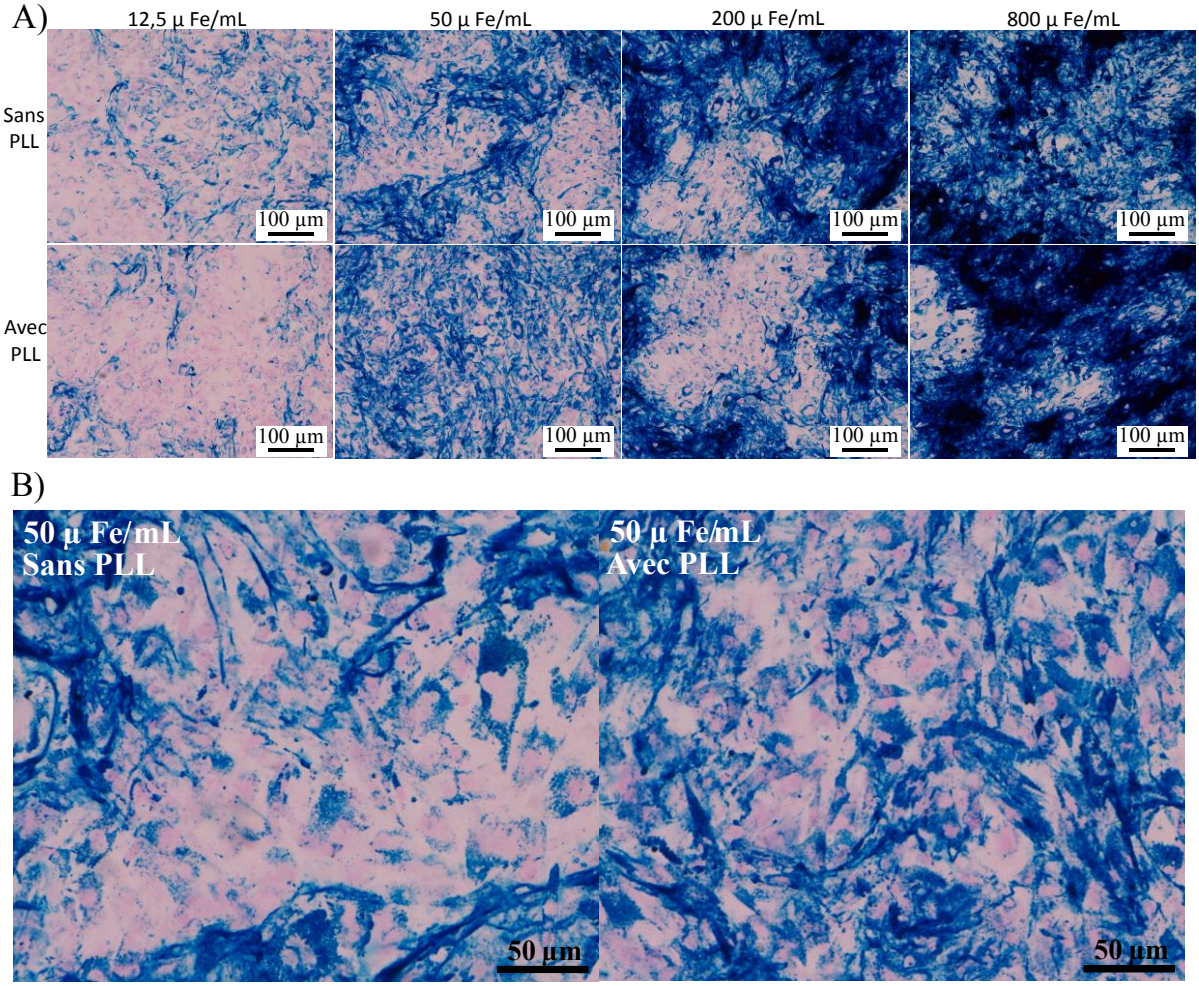


Figure IV.2 : Images de microscopie optique pour les tests d'internalisation des nanoparticules NPs@Cit10 avec ou sans utilisation de PLL pour un temps d'ensemencement de 72 heures et quatre concentrations différentes. B) Agrandissement des images pour une concentration en fer de 50 µg de Fe par mL sans et avec PLL.

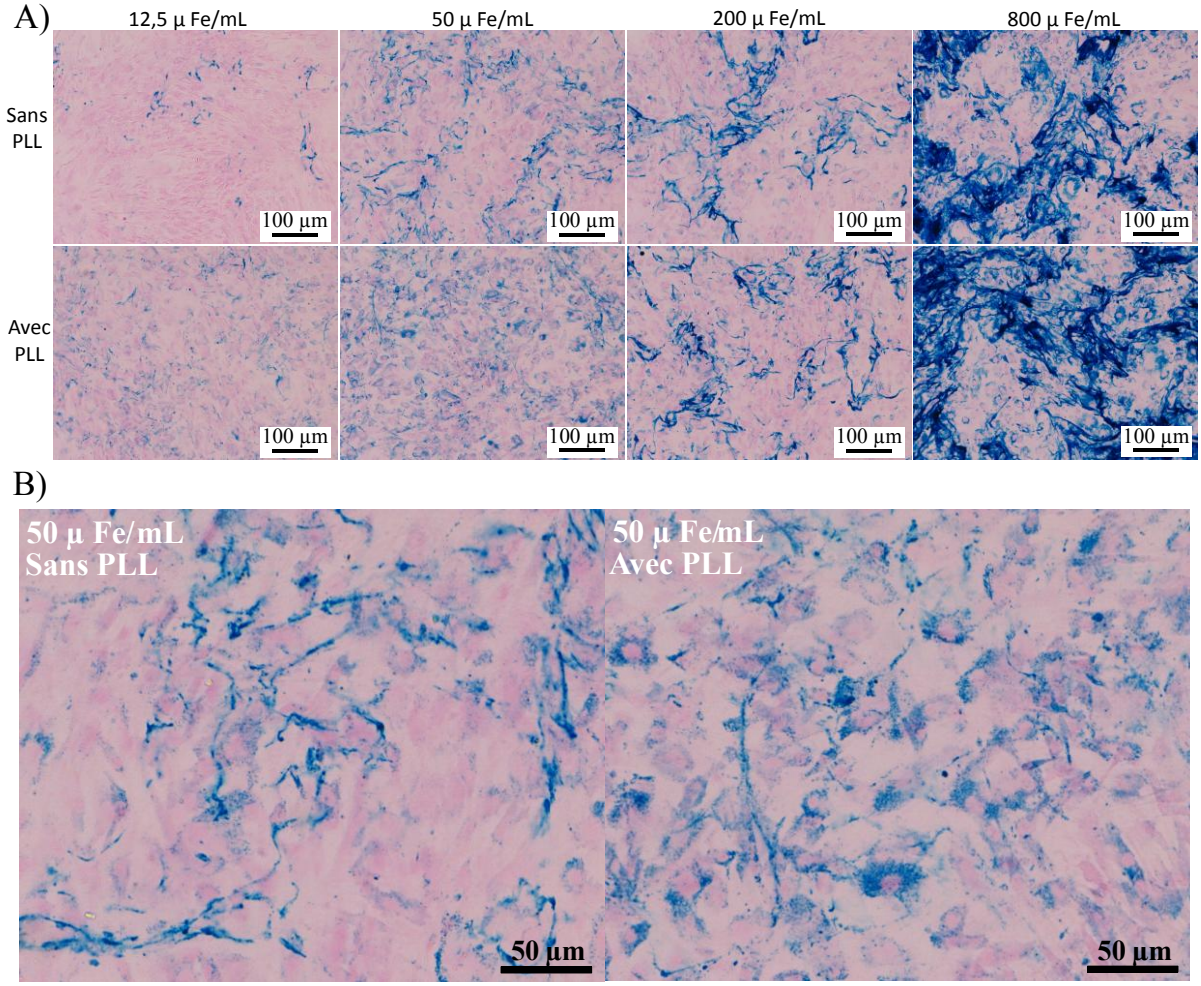


Figure IV.3 : Images de microscopie optique pour les tests d'internalisation des nanoparticules NPs@Cit7 avec ou sans utilisation de PLL pour un temps d'ensemencement de 72 heures et quatre concentrations différentes. B) Agrandissement des images pour une concentration en fer de 50 µg de Fe par mL sans et avec PLL.

Analyse des résultats des tests d'internalisation cellulaire :

Les observations microscopiques réalisées sur les échantillons nous permettent d'estimer visuellement l'internalisation des nanoparticules dans les cellules. En effet, sur les agrandissements proposés de chacune des figures, il est possible d'observer plusieurs éléments :

- les noyaux cellulaires mis en évidence par la coloration en rose du Kernchtrot,
- les nanoparticules internalisées colorées par le bleu de Prusse (halos bleu clair entourant les noyaux cellulaires) qui s'accumulent autour des noyaux cellulaires, dans le cytoplasme des cellules,
- les nanoparticules non internalisées qui s'agrègent entre les cellules (taches bleu foncées entre les noyaux cellulaires).

L'agent de transfection PLL, qui agit sur la membrane cellulaire, a de manière visible amélioré l'internalisation cellulaire des nanoparticules et ce pour tous les échantillons. Cet effet, déjà observé dans plusieurs autres travaux[1–3] est tout particulièrement visible pour les essais à 24 heures. Le PLL améliore ainsi l'efficacité de marquage des cellules par les nanoparticules sans altérer les fonctions biologiques des cellules.

Deuxièmement, il apparaît que les nanoparticules fonctionnalisées par les citrates sont plus facilement internalisées que les nanoparticules nues qui ont plutôt tendance à s'agréger entre les cellules. En comparant les deux échantillons de nanoparticules fonctionnalisées par les citrates, il est possible de se rendre compte que l'échantillon NPs@Cit7 s'internalise mieux que NPs@Cit10. Cela est sans doute lié au fait que les nanoparticules de cet échantillon ont un plus petit diamètre moyen. Enfin, le troisième point remarquable issu de ces images est l'effet de la concentration. Il est en effet possible de constater que pour les tests à 72 heures sur nanoparticules fonctionnalisées par des citrates, jusqu'à une concentration de 50 µg/ml, les nanoparticules sont en quasi-totalité internalisées et il n'y a pas ou peu de gros agrégats de nanoparticules à l'extérieur des cellules. En revanche, pour des concentrations plus importantes, les gros agrégats commencent à apparaître et ce même sur les échantillons de nanoparticules fonctionnalisées par les citrates. Il n'est pas étonnant dans ces conditions que la plupart des applications biomédicales des nanoparticules d'oxyde de fer se limitent à cette gamme de concentration[1].

4.1.3 Étude de l'activité mitochondriale

Les tests d'activité mitochondriale ont été réalisés par ensemencement dans des plaques de 96 puits (2000 cellules/puits) avec les mêmes concentrations, les mêmes échantillons, les mêmes temps (24, 48 et 72 heures) et avec ou sans PLL comme précédemment pour les tests d'internalisation cellulaire. L'activité mitochondriale est mesurée grâce au MTT (Bromure de 3-[4,5-diméthylthiazol-2-yl] -2,5-diphényl-tétrazolium) qui est réduit par la succinate déshydrogénase, une enzyme mitochondriale, en cristaux de « bleu de formazan ».

Le protocole appliqué pour les tests d'activité mitochondriale est le suivant :

20µL de MTT sont ajoutés à 100µL du milieu de culture cellulaire. La plaque contenant le mélange est ensuite incubée à 37°C sous une atmosphère contenant 5% de CO_2 pendant 4h. Après incubation, le surnageant est ensuite éliminé.
Les cellules sont ensuite lysées avec 100µL de SDS-DMF (milieu composé de 80g de Sodium Dodecyl Sulfate, de 200mL de Dimethylformamide et de 200mL d'H_2O ayant un pH de 4,7) à 37°C, sous une atmosphère de 5% de CO_2, pendant 24h.
La densité optique (DO) de chaque lot est finalement mesurée à la longueur d'onde de 550 nm (correspondante au bleu de formazan) grâce à un spectrophotomètre UV-visible.

Les activités mitochondriales des cellules aux différentes concentrations des trois types de nanoparticules testées avec ou sans utilisation de PLL sont présentées après 24 heures et 72 heures d'ensemencement. Le temps d'ensemencement intermédiaire de 48 heures n'apportant pas d'informations supplémentaires ne sera pas présenté ici.

Cette évolution de l'activité mitochondriale est présentée pour les nanoparticules NPs sur la figure IV.4. Les résultats pour l'échantillon NPs@Cit10 sont présentés sur la figure IV.5 et pour NPs@Cit7 sur la figure IV.6.

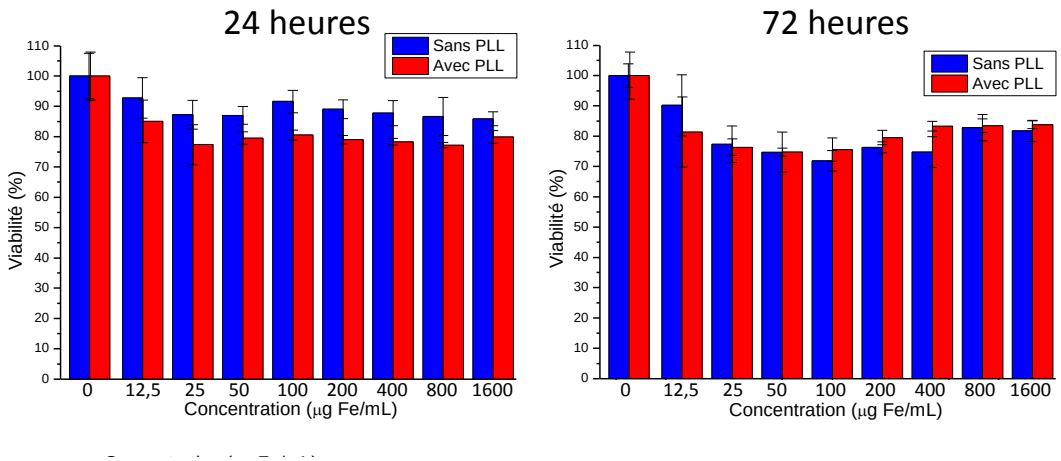


Figure IV.4 : Graphique représentant les résultats des tests MTT pour l'échantillon de nanoparticules NPs à 24 et 72 heures, pour les 8 concentrations testées et avec ou sans PLL.

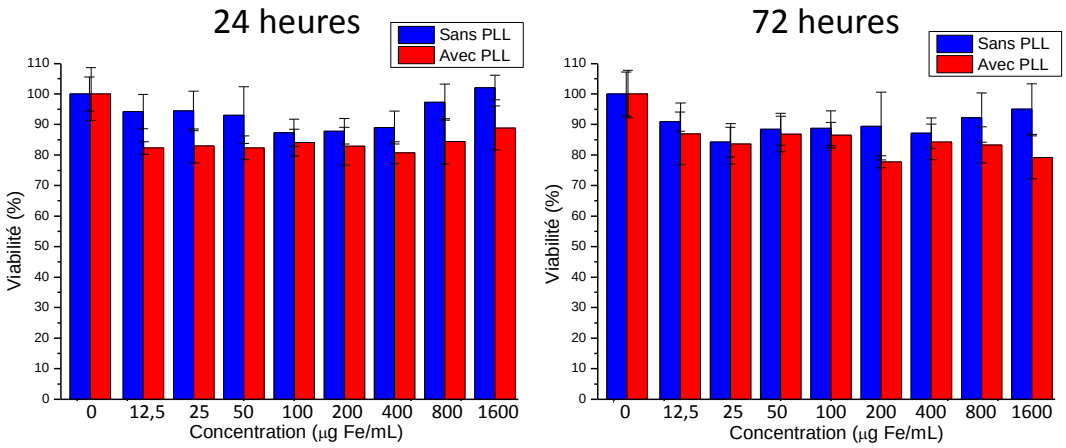


Figure IV.5 : Graphique représentant les résultats des tests MTT pour l'échantillon NPs@Cit10 à 24 et 72 heures, pour les 8 concentrations testées et avec ou sans PLL.

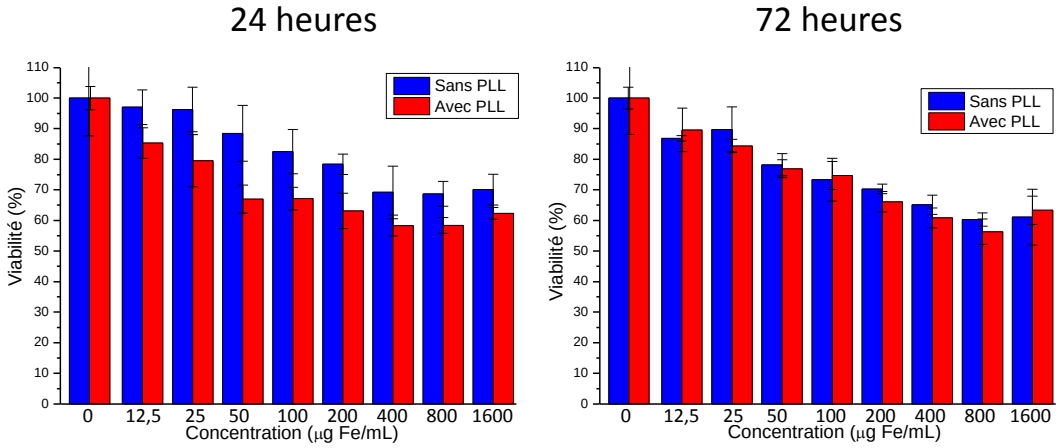


Figure IV.6: Graphique représentant les résultats des tests MTT pour l'échantillon NPs@Cit7 à 24 et 72 heures, pour les 8 concentrations testées et avec ou sans PLL.

Avant de s'intéresser séparément aux tests d'activité mitochondriale pour chaque type de nanoparticules étudié, il convient de faire le point sur la signification qui peut être donnée à une augmentation, ou à une diminution de l'activité mitochondriale du milieu cellulaire qui est le paramètre que nous avons mesuré ici.

Une augmentation de l'activité mitochondriale peut signifier deux choses. Soit qu'il y a une augmentation de la prolifération cellulaire dans le milieu, soit qu'il y a une augmentation de l'activité cellulaire dans le milieu (par exemple lors de la différenciation des cellules).

Une diminution de l'activité mitochondriale peut quant à elle signifier trois choses. Soit une diminution de la prolifération cellulaire si par exemple les cellules ne sont pas dans un environnement favorable à leur prolifération. Soit une diminution de l'activité cellulaire qui est parfois un signe avant-coureur de la mort des cellules. Soit directement une augmentation de la mortalité des cellules et donc un effet cytotoxique avéré.

En premier lieu, un point commun aux trois types de nanoparticules peut être souligné via ces résultats. Il est possible de constater dans le cas des tests d'activité mitochondriale à 24 heures d'ensemencement, que les cellules des échantillons sans utilisation de PLL ont toujours une plus grande activité mitochondriale que celle où l'agent de transfection a été utilisé. Nous pouvons mettre en relation ce résultat avec ceux obtenus par les tests d'internalisation cellulaire. Ces tests ont en effet confirmé l'augmentation de l'endocytose qui accompagne l'utilisation de PLL. Ainsi, sans PLL, l'internalisation à 24 heures étant très limitée, les nanoparticules n'ont que peu d'effet sur les cellules du milieu. En revanche, lorsque nous regardons les résultats obtenus à 72 heures d'ensemencement, il est possible de constater dans tous les cas la disparition de l'impact du PLL sur l'activité mitochondriale. Une interprétation logique et en accord avec les précédentes observations en histologie serait que les nanoparticules finissent par être internalisées dans les cellules à partir d'un certain temps et ce même sans utilisation de l'agent de transfection.
Pour la suite de l'analyse des résultats de MTT et par souci de lisibilité, les tests effectués avec chaque type de nanoparticules seront abordés séparément.

Pour NPs, les tests d'activité mitochondriale montrent une baisse très limitée de l'activité lors de la mise en contact de ce type de nanoparticules avec les cellules. Cependant, les résultats des tests précédents montrant une très faible internalisation cellulaire ainsi que la forte propension de ce type de nanoparticules à former des agrégats nous incite à éliminer d'office cet échantillon des futures comparaisons.

Pour NPs@Cit10, l'activité mitochondriale n'évolue quasiment pas en fonction de la concentration en nanoparticules. Après une légère baisse initiale, celle-ci reste stable à 85-90% quelle que soit la concentration de fer dans l'échantillon et ce jusqu'à 72 heures d'ensemencement. Cette activité stable entre 24 et 72 heures constitue une bonne indication que les cellules ne sont pas mortes entre ces deux temps.

Notre hypothèse dans le cas de cet échantillon est que les particules n'engendrent pas de modification notable de la viabilité cellulaire (absence de cellules mortes visibles en histologie et activité stable). Les nanoparticules auraient dans ce cas plutôt une action sur la prolifération cellulaire en la ralentissant légèrement. D'autres tests pourraient venir compléter cette hypothèse, comme un test de dosage d'ADN par le réactif de Hoechst au cours du temps qui permettrait de connaître le nombre de cellules et d'en extraire l'activité mitochondriale normalisée par le nombre de cellules. Cela permettrait ainsi de confirmer notre hypothèse.

Pour NPs@Cit7, l'augmentation de la concentration de fer s'accompagne d'une diminution quasi linéaire de l'activité mitochondriale à 24 heures comme à 72 heures d'ensemencement. L'activité est en effet de 90% pour une concentration de 12,5 µg/ml à 72 heures et chute à 60% pour une concentration de 1,6 mg/ml au même temps. Dans le cas de cet échantillon, il semblerait que les nanoparticules aient un effet cytotoxique même si celui-ci reste limité. De la même façon que pour l'échantillon précèdent, les tests complémentaires comme le dosage d'ADN s'avèreraient utiles pour confirmer ces résultats.
Dans le cas de cet échantillon, l'utilisation de PLL est donc clairement bénéfique car elle permet d'avoir une efficacité de transfection optimale pour les plus faibles concentrations de particules. La PLL permet ainsi de diminuer les concentrations utilisées et donc les effets négatifs associés.

4.1.4 Bilan

Il ressort de ces résultats que l'échantillon le plus prometteur pour des applications dans le domaine biomédical serait NPs@Cit10. Celui-ci présente en effet le meilleur compromis entre une bonne internalisation et un faible effet sur l'activité mitochondriale. Même si cet échantillon semble avoir une action sur la prolifération cellulaire, celle-ci n'est pas gênante aux faibles concentrations car il reste 80-90% d'activité dans le milieu.
Rappelons que ces cellules sont vouées à être différenciées en cellules « chondrocytes-like » pour des réparations cartilagineuses. Il n'y a donc pas besoin que la prolifération cellulaire soit très importante.
En revanche, un test important qui devra être réalisé avant toute tentative d'application est de voir l'impact des nanoparticules NPs@Cit10 sur la différenciation chondrogénique des CSMs. D'autre part, l'absence de toxicité pourra également être confirmée par des tests LDH qui permettent de mettre en évidence l'apoptose, c'est-à-dire la mort des cellules.

Faisons à présent la comparaison des valeurs d'activité cellulaire obtenues dans d'autres travaux récents sur la cytotoxicité des nanoparticules d'oxydes de fer, par rapport aux valeurs d'activité obtenues pour nos nanoparticules fonctionnalisées par des citrates à des concentrations communément utilisées dans le domaine biomédical, c'est-à-dire inférieures à 50 µg/ml.

Avec des valeurs d'activité à 72 heures et 12,5 µg/ml de respectivement 90% et 88% pour NPs@Cit10 et NPs@Cit7, nos résultats en termes d'activité sont dans la même gamme que pour des tests menés récemment sur des nanoparticules commerciales synthétisées par co-précipitation et fonctionnalisées par du dextran (Endorem, Berguet SA. France) [1].

Nos valeurs de viabilité cellulaire sont même meilleures que pour des nanoparticules synthétisées par co-précipitation, mais fonctionnalisées par des oléates ($C_{18}H_{34}O_2$) qui obtiennent dans leurs cas des valeurs de viabilité inférieure à 80% pour seulement 48 heures d'ensemencement avec des concentrations de fer pourtant inférieures à celles que nous avons utilisées[4].

Enfin, des tests de cytotoxicité menés sur des nanoparticules synthétisées par décomposition thermique et fonctionnalisées par du pluronic F127 ont montré des valeurs de viabilité cellulaire bien inférieures à celles que nous avons obtenues (<50%) pour des concentrations similaires de nanoparticules[5].

Si l'on compare cette étude à celles menées dans la littérature, y compris sur des nanoparticules actuellement utilisées dans le domaine biomédical, nous pouvons remarquer que nos nanoparticules d'oxyde de fer fonctionnalisées par des citrates ne semblent pas présenter de contre-indications par rapport à leur utilisation en biologie ou dans le domaine biomédical.

Ainsi, nos nanoparticules d'oxyde de fer de 10 nm fonctionnalisées par des citrates pourraient être utilisées dans le suivi IRM de la reconstitution cartilagineuse via les cellules CSMs, puisqu'elles ne provoquent aucune modification ultérieure.

4.2 Modification de la couronne organique

4.2.1 Utilisation de la couronne de citrate comme précurseur de fonctionnalisation

4.2.1.1 Intérêt

Afin d'ajouter des nouvelles fonctionnalités (ciblage de cellules spécifiques, transport de médicaments via des chaînes thermo-répondantes ou UV-répondantes…) aux citrates greffés en surface des NPs@Cit, une étude a été entreprise afin de modifier directement ces molécules par un groupe alcyne et de former des NPs@Cit-Alcyne utilisables pour des réactions de « chimie clic ».

La « chimie clic » est une méthode d'assemblage chimique qui doit idéalement être réalisée dans des conditions expérimentales simples et respectueuses de l'environnement, être stéréospécifique, avoir un haut rendement et ne pas utiliser de solvants toxiques. À l'heure actuelle, la plupart des réactions de chimie clic sont basées sur la réaction de cyclo-addition d'Huisgen[6,7] qui permet de faire réagir de manière très sélective un groupe alcyne avec un groupe azoture[8] ; un schéma de cette réaction est présenté sur la figure IV.7.

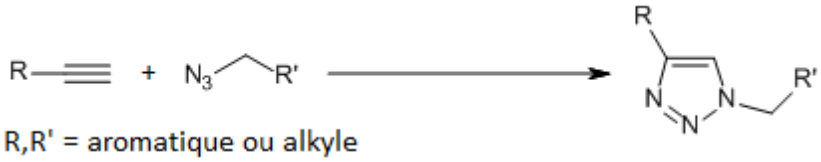
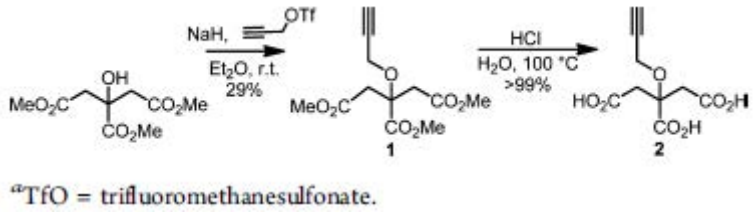


Figure IV.7 : Schéma d'une réaction de chimie clic entre un alcyne et un azoture.

Des précédents travaux conduits par Bishop. L.M et coll.[9] visant à obtenir des citrates modifiés par un groupe alcyne ont déjà été menés. Cependant, ces travaux reposent sur un procédé très complexe incluant plusieurs étapes : Tout d'abord une méthylation des groupements carboxylates du citrate afin de les protéger. Puis la réaction entre le tri méthyl citrate et le propargyl trifluoromethanesulfonate, un composé dont la synthèse est extrêmement complexe et dont le coût est par conséquent très élevé, permet de remplacer le groupe hydroxyle du citrate par un groupe alcyne (figure IV.8). Enfin une phase de chauffage des molécules formées en milieu acide chlorhydrique concentré permet de rendre accessibles les groupes carboxylates et d'obtenir des molécules de citrate modifiées possédant un groupe alcyne.



[a]TfO = trifluoromethanesulfonate.

Figure IV.8 : Réaction de modification du tri méthyl citrate par un alcyne selon Bishop et coll. [9].

Outre la grande complexité de cette méthode, elle doit obligatoirement être conduite sur le citrate seul car le traitement à l'acide chlorhydrique concentré à chaud dégraderait les nanoparticules d'oxyde de fer magnétique synthétisées de manière irréversible.

Dans notre cas, nous avons choisi une autre méthode de greffage direct d'alcyne à notre connaissance jamais utilisée sur les citrates en surface des nanoparticules d'oxyde de fer magnétique. La méthode repose sur la réaction dite « d'amidation du carbodiimide », un procédé bien connu permettant de lier un acide carboxylique à une amine pour former une liaison amide[10](figure IV.9).

4.2.1.2 Modification des citrates par la réaction d'amidation du carbodiimide

La réaction d'amidation, que nous avons initiée consiste à lier un des groupes -COOH du citrate avec le groupe NH_2 d'une amine primaire qui comprend un groupe alcyne en bout de chaîne (dans notre cas la propargyl amine). Cette réaction conduit à la formation d'un amide comme schématisé sur la figure IV.9.



Figure IV.9 Réaction de formation d'un amide à partir d'un acide carboxylique et d'une amine primaire.

Pour catalyser cette réaction, l'acide doit être au préalable activé par l'utilisation d'EDC (1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide) et NHS (N-hydroxysuccinimide). L'activation par EDC (numéro 1 sur figure IV.10) puis par NHS (numéro 2 sur figure IV.10) crée un intermédiaire de réaction très réactif qui pourra ensuite réagir facilement avec l'amine en limitant les risques de réactions parasites (numéro 3 sur figure IV.10).

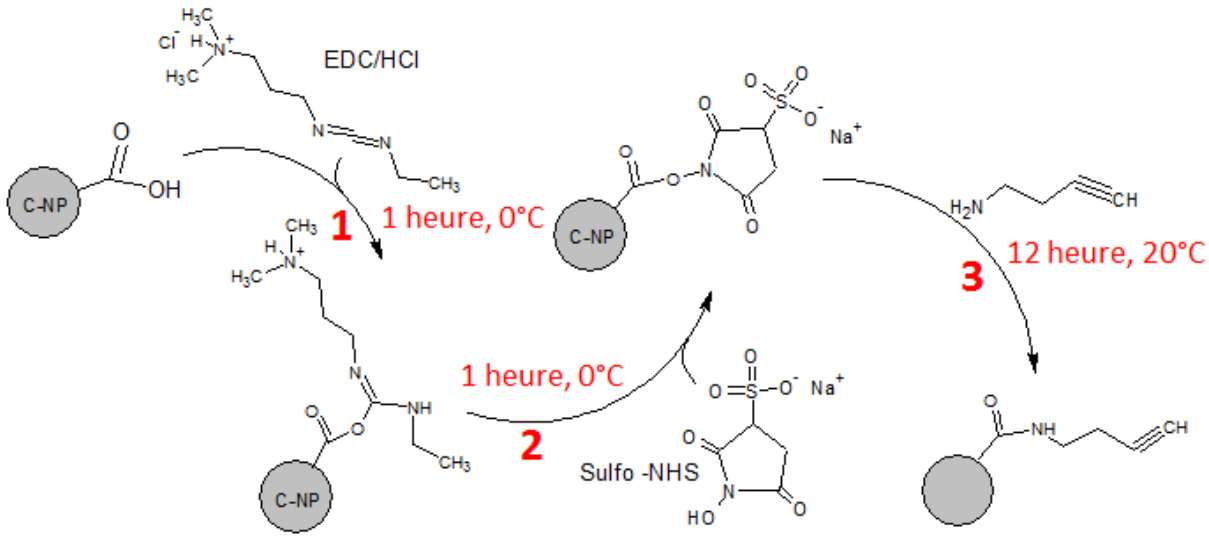


Figure IV.10 : Mécanisme de la réaction d'amidation du carbodiimide. C-NP représente une nanoparticule fonctionnalisée en surface par des citrates (NPs@Cit) dont un groupement carboxyle est protoné.

Dans un premier temps, il faut s'assurer qu'un des groupements carboxylate des citrates en surface des nanoparticules soit sous sa forme d'acide carboxylique car cette réaction n'opère pas avec les groupes carboxylates. Il faut donc fixer le pH de début de réaction à un pH suffisamment bas ($< pKa_3 - 1 = 5,4$) pour que l'un des groupes carboxylates soit protoné. Le lot de nanoparticules fonctionnalisées par des citrates choisi pour cet essai est un lot de nanoparticules RM2-MA1200 car celui-ci est stable, bien dispersé en solution aqueuse et dispose de bonnes propriétés magnétiques. Le diamètre moyen des NPs mesuré au MET est de 10,4 ± 1,6 nm, le pourcentage massique de ligands citrate en surface de 3,5 % et l'aimantation à saturation de 78 emu/g.

Les masses et quantités de matière introduites pendant la réaction sont données ci-dessous (tableau IV.3). Les nanoparticules obtenues après réaction seront appelées RM2-MA1200-Alcyne.

Fonctionnalisation de 100 mg de NP(RM2-MA1200)	**EDC**	**NHS**	**Propargyl amine**
Masse molaire (g/mol)	191,70	115,09	55,08
Masse (mg)	17,00 ± 0,01	10,00 ± 0,01	4988
Nombre de moles (mmol)	88,7 ± 0,1	86,9 ± 0,1	$90,6 * 10^3$
Volume (mL)	-	-	5,80 ± 0,01

Tableau IV.3 : Récapitulatif des quantités de matière et masses introduites pour la modification des citrates en surface des nanoparticules pour 100 mg de nanoparticules.

Le protocole expérimental utilisé est inspiré de la thèse d'Audrey Roy, université du Havre (2015)[11] :

- 100 mg de nanoparticules (RM2-MA1200) en solution aqueuse, stabilisée à pH = 5,4 ± 0,1 par ajout d'HCl, sont introduits dans un ballon refroidi par un bain de glace maintenant le milieu réactionnel à 4°C.
- 5 équivalents de catalyseur EDC (1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide) et de NHS (N-hydroxysuccinimide) sont introduits. On considère généralement que la seule utilisation de l'activation par EDC suffit à provoquer la réaction. Cependant, l'utilisation de NHS pour former un second intermédiaire plus stable diminue le risque de réactions parasites et permet des caractérisations in situ.
- Le ballon est maintenu sous agitation pendant 2 heures en gardant le milieu réactionnel à 4 °C grâce au bain de glace. Le maintien de cette température a pour but de diminuer le risque de réactions parasites.
- La propargyl amine est ensuite ajoutée au milieu réactionnel provoquant l'élévation du pH à 10,0 ± 0,2 et le ballon est conservé sous agitation.
- Les nanoparticules sont ensuite récupérées par séparation magnétique et lavées plusieurs fois à l'eau ultrapure.

4.2.1.3 Caractérisation des nanoparticules modifiées (NPs@Cit-Alcyne).

À l'heure de l'écriture de ce manuscrit, une seule technique de caractérisation qui tend à montrer l'effectivité de ce greffage a pu être mise en œuvre. Il s'agit des mesures en spectroscopie infrarouge. Les mesures effectuées sur les nanoparticules avant et après modification ainsi que sur la propargyl amine seule sont présentées sur la figure IV.11.

Sur ces spectres enregistrés des NPs modifiées, l'absence des bandes étroites caractéristiques de la propargyl amine à 3280 cm^{-1} et 1300 cm^{-1} est remarquée, ce qui permet de confirmer l'efficacité du lavage de l'échantillon. Cela est d'autant plus intéressant que la propargyl amine est un produit très toxique à éliminer absolument de l'échantillon.

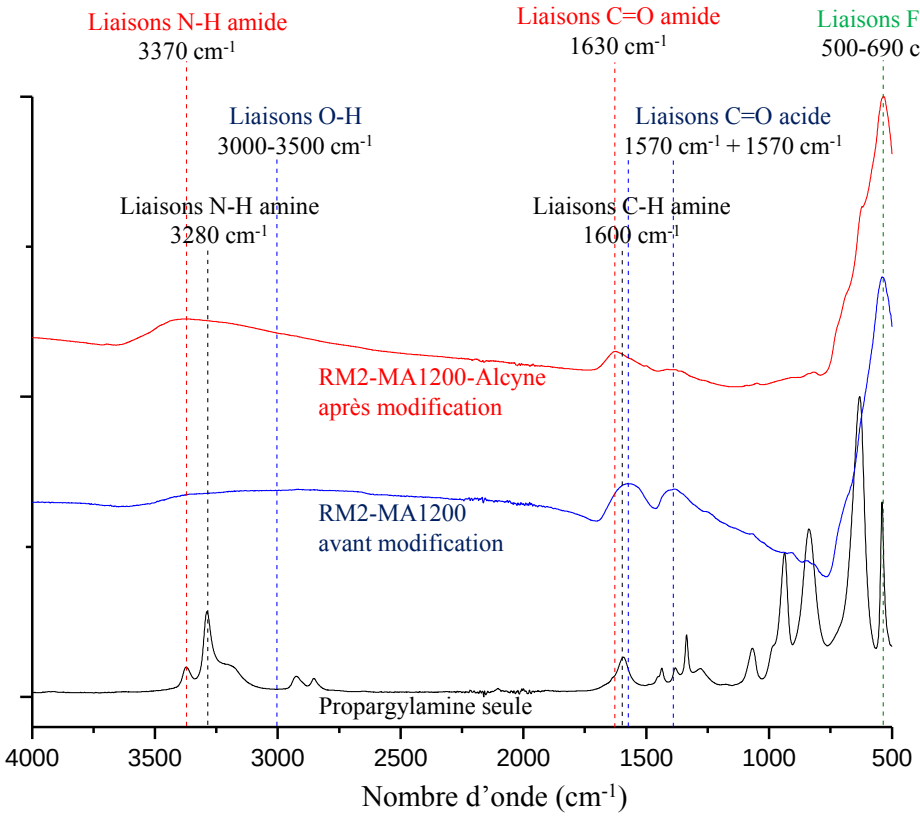


Figure IV.11 : Spectres infrarouges des nanoparticules d'oxyde de fer fonctionnalisées par les citrates RM2-MA1200 avant et après la modification par un alcyne et de la propargyl amine pure servant à la modification.

L'autre constatation pouvant être faite est le décalage voire la modification du profil de certaines bandes du spectre avant et après la modification des citrates.

Ainsi les deux bandes bien visibles des carboxylates à 1390 et 1570 cm^{-1} sur l'échantillon avant modification laissent place à une bande à 1630 cm^{-1} ayant un épaulement à 1570 cm^{-1}. L'intensité relative de la bande à 1390 cm^{-1} est drastiquement diminuée, ces données peuvent correspondre à la disparition d'une partie des groupes carboxylates de l'échantillon (1 par citrate si la réaction est totale) qui sont alors remplacés par des groupes amides dont la bande caractéristique est attendue à 1620-1630 cm^{-1} [12].

De plus, la bande OH très large entre 3000 et 3500 cm^{-1} sur le spectre des NPs avant modification laisse place après modification à une bande mieux définie centrée autour de 3370 cm^{-1} avec un épaulement entre 3300 et 3000 cm^{-1}. Ce changement pourrait, d'après notre hypothèse, être dû à l'apparition des liaisons N-H de l'amide formée.

Il est possible de constater l'absence de la bande associée aux liaisons C≡C sur ces spectres, y compris sur celui de la propargylamine pure. Ceci peut être expliqué car cette zone du spectre est mal définie avec cet appareil du fait de l'utilisation du cristal servant au mode ATR.

4.2.2 Synthèse et caractérisation des NPs d'oxyde de fer fonctionnalisées par des polyoxazolines (NPs@POx et NPs@POx-Acide)

Les Polyoxazolines (POx) sont des polymères bio-inspirés. En effet, les POx sont des isomères de structure de deux autres polymères présents dans la nature : les polyacrylamides avec une fonction amide latérale et les polypeptides portant une fonction amide sur la chaîne principale [13,14]. Les POx ont déjà été utilisés dans le domaine biomédical du fait de leur biocompatibilité, de leur bonne bio distribution et du fait de leur élimination naturelle par les reins[13,15,16].

Les POx ont été utilisés comme antibactériens, comme vecteur de médicament ou comme alternative au Polyéthylène Glycol (PEG)[17,18].

Par ailleurs, les POx, une fois modifiés par fonctionnalisation, ont montré des facultés thermo répondantes, ce qui pourrait en faire une alternative au Poly(*N*-isopropylacrylamide) ou PNiPAM qui a été reporté comme n'étant pas bio compatible[13].

De multiples fonctionnalisations peuvent être effectuées sur les POx grâce au grand nombre de fonctions chimiques réactives présentes sur ce polymère[13].

En prenant en considération les nombreux avantages des POx, la synthèse de nanoparticules d'oxyde de fer recouvertes par ces polymères (NPs@POx), dont les tailles et les propriétés magnétiques peuvent être contrôlées, a été conduite. Cette nouvelle fonctionnalisation de nanoparticules d'oxyde de fer par des POx par voie directe et sans échange de ligand n'est pas référencée dans la littérature à notre connaissance.

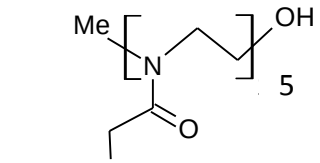
4.2.2.1 Synthèse des POx et POx-Acide

Des POx ayant 5 unités par oligomère ont été synthétisés. La figure IV.14.A présente la formule semi-développée de ces POx.

Puis, le groupe terminal alcool (OH) d'une des POx classiques a été substitué par un groupe acide terminal via une réaction d'estérification pour élaborer des POx acide (figure IV.14.B).

L'objectif ici est de savoir si la présence d'un groupe terminal acide facilite le greffage de l'oligomère en surface des nanoparticules d'oxyde de fer. En d'autres termes, il serait alors possible de comparer l'efficacité de greffage des POx et POx-Acide en surface des nanoparticules d'oxyde de fer.

PolyOxazoline (POx) classique :

A 

PolyOxazoline (POx) acide:

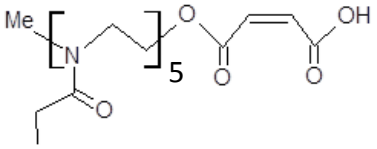
B 

Figure IV.14: Formules semi-développées A) des POx (n=5) et B) des POx-Acides (n=5).

Synthèse des POx :

Les POx classiques ont été préparés par polymérisation cationique avec ouverture de cycle (CROP) à partir du monomère ÉthylOxazoline (EtOx) et de l'amorceur MéthylTosylate (MeOTs).

Les réactifs sont dissous dans de l'acétonitrile (MeCN) et introduits dans un ballon.

La réaction de polymérisation est ensuite assistée par micro-onde pendant 30 min à T = 140°C et à P = 4 bar.

La terminaison des chaînes est assurée par l'ajout d'hydroxyde de potassium (KOH) dilué dans du méthanol en fin de polymérisation, le mélange est gardé sous agitation 24 heures.

Les POx sont ensuite récupérés par précipitation dans l'éther froid et séché sous vide.

Les POx classiques avec 5 unités formulaires sont de couleur jaune.

Le tableau IV.4 présente les masses et le nombre de moles permettant la synthèse de POx n=5.

POx (n=5)	**MeOTs / 1 eq.**	**EtOx (monomère) / 5 eq.**	**KOH / 5 eq.**
M (g/mol)	186,0	99,0	56,0
n (mol)	0,010 ± 0,001	0,050 ± 0,001	0,050 ± 0,001
m (g)	1,86 ± 0,01	4,95 ± 0,01	2,80 ± 0,01

Tableau IV.4 : Récapitulatif des masses et nombres de moles introduites pour la synthèse des POx (n=5).

Le schéma représentant le mécanisme réactionnel de la polymérisation cationique avec ouverture de cycle (CROP) est présenté en figure IV.15, ce mécanisme peut s'expliquer en trois étapes :

La première **étape de la polymérisation**, également appelée « phase d'amorçage », consiste en l'attaque de l'amorceur de type tosylate (ici MeOTs) par un monomère de type 2-éthyl-2-oxazoline. Une espèce chargée positivement appelée « oxazolinium » possédant un contre-ion tosylate est générée.

Un autre monomère oxazoline peut alors attaquer cette espèce réactive provoquant l'ouverture du cycle, lors de **l'étape de propagation**, et la formation d'une chaîne polymère en croissance possédant une unité répétitive et une extrémité de chaîne oxazolinium. Par ce même mécanisme, n-2 unités répétitives sont insérées le long de la chaîne polymère.

Pour ce dernier, dont l'extrémité de chaîne est réactive et stable, une **étape de terminaison** est nécessaire pour stopper la polymérisation par ajout d'hydroxyde de potassium permettant ainsi la formation de chaînes poly(2-éthyl-2-oxazoline). On note que ce qui définit la longueur de la chaîne polymère est le rapport initial monomère/amorceur qui est ici $n_{monomère}/n_{amorceur} = 5$.

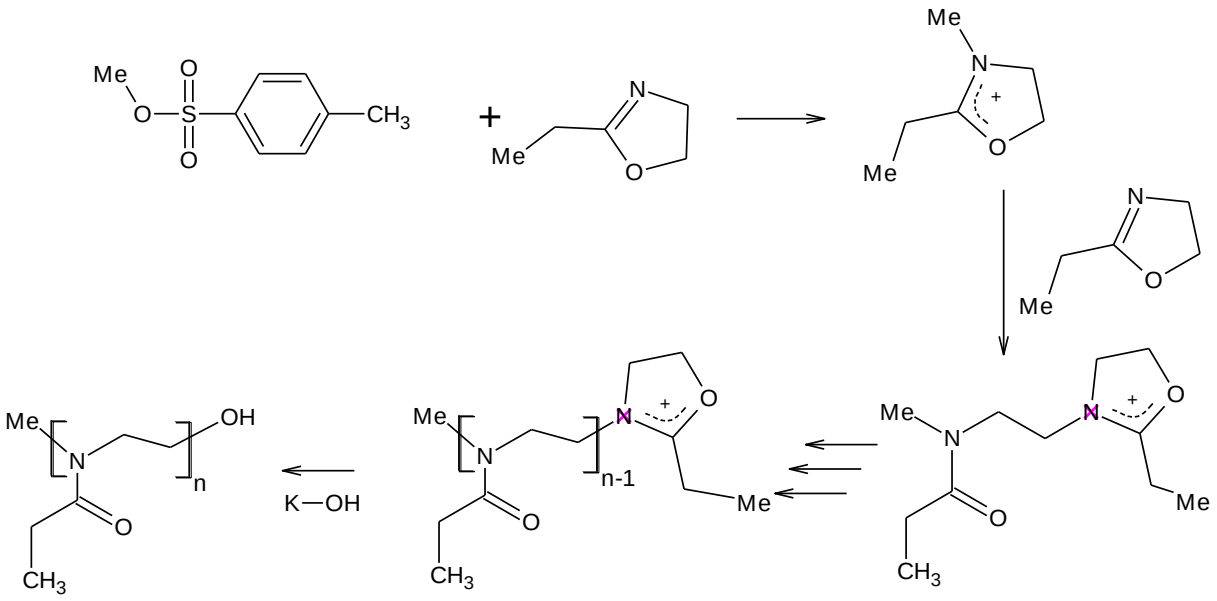


Figure IV.15 : Schéma du mécanisme de la réaction de polymérisation dite « CROP » qui permet la synthèse des POx à partir de monomère, d'amorceur et d'un agent de terminaison.

Modification des POx en POx-Acide :

La modification du groupe terminal des POx permettant de remplacer l'alcool par un acide est effectuée par estérification en utilisant l'anhydride maléique.

Les POx et l'anhydride d'acide sont dissous dans du chloroforme dans le ballon d'un montage de type Dean Stark (figure IV.16) permettant d'éliminer l'eau formée par la réaction au fur et à mesure qu'elle apparaît et ainsi d'éviter les réactions parasites dues à l'eau.

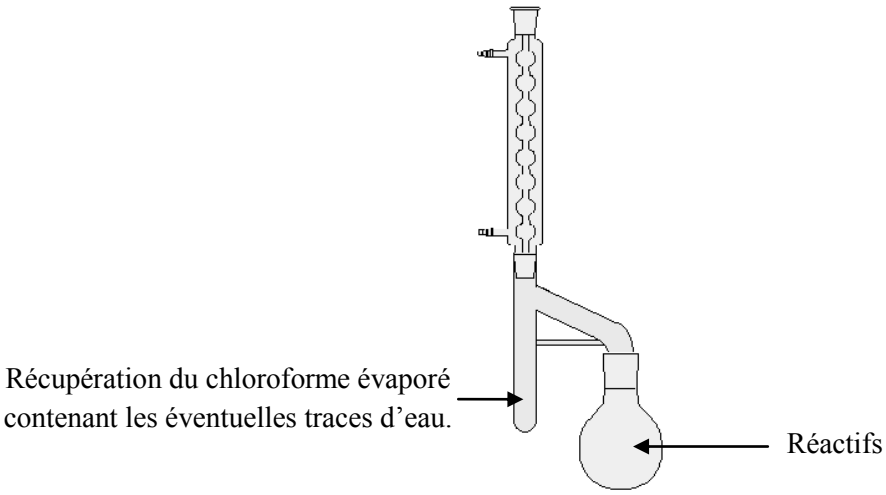


Figure IV.16 : Représentation schématique d'un « DeanStark ».

L'Acide ParaToluèneSulfonique (APTS) est ensuite ajouté pour catalyser la réaction et le ballon est chauffé au bain marie pendant 8 heures.

Les POx-Acide sont récupérés par précipitation dans l'éther froid comme précédemment pour les POx classiques puis séchés sous vide pendant 12 heures.

Le tableau IV.5 suivant donne les masses et nombres de moles introduits pour la modification des POx n = 5. La figure IV.17 présente un schéma de la réaction.

POx-Acide (n=5)	**POx (n=5) / 1 eq.**	**Anhydride maléique / 1,3 eq.**	**APTS / 0,25 eq.**
M (g/mol)	527,0	98,0	190,2
n (mmol)	3,800 ± 0,001	4,940 ± 0,001	0,950 ± 0,001
m (g)	2,00 ± 0,01	0,48 ± 0,01	0,18 ± 0,01

Tableau IV.5 : Récapitulatif des masses et nombres de moles introduites pour la modification des POx (n=5) en POx-Acide.

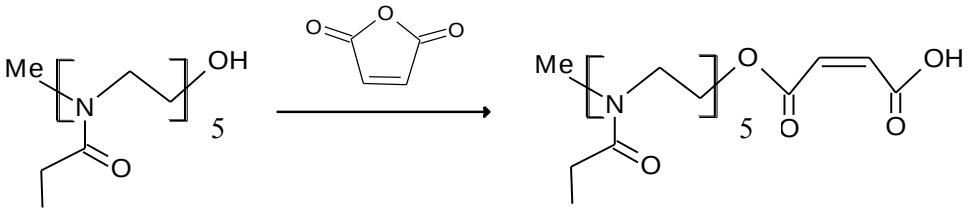


Figure IV.17 : Schéma de la réaction d'estérification des POx en POx-Acide.

4.2.2.2 Caractérisation des POx et des POx-Acide

La vérification de la nature des POx (n=5) a dans un premier temps été réalisée par des mesures par Résonnance Magnétique Nucléaire (RMN) et par FTIR en mode ATR.

Ces mesures ont été réalisées avant et après la modification des groupements terminaux afin de vérifier que le groupe acide avait bien été greffé à la place du groupe -OH terminal des

POx. Les spectres FTIR des POx et des POx-Acide sont présentés figure IV.18. Les spectres RMN des POx et des POx-Acide sont présentés figure IV.19.

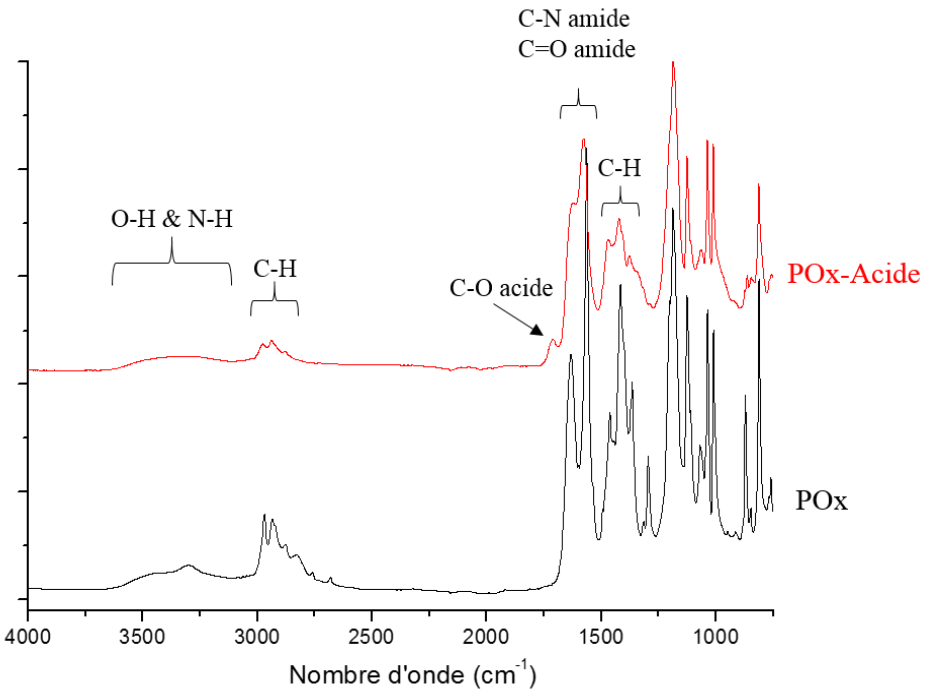


Figure IV.18 : Spectres infrarouges des échantillons de POx et de POx-Acide.

Sur les deux spectres, un grand nombre de bandes sont visibles :

Les bandes larges correspondantes aux liaisons N-H des amides ainsi qu'aux liaisons O-H des hydroxyles sont visibles dans la zone 3500-3000 cm^{-1}.

Les bandes correspondantes aux liaisons C-H des chaînes carbonées peuvent être observées dans la zone 2800-3000 cm^{-1} d'une part et dans la zone 1350-1450 cm^{-1}d'autre part.

Les bandes visibles dans la zone 1500-1650 cm^{-1} sont caractéristiques des liaisons C-N et C=O des amides[12].

Enfin, il apparaît sur le spectre des POx-Acide uniquement la bande caractéristique des acides carboxyliques à 1715 cm^{-1}.

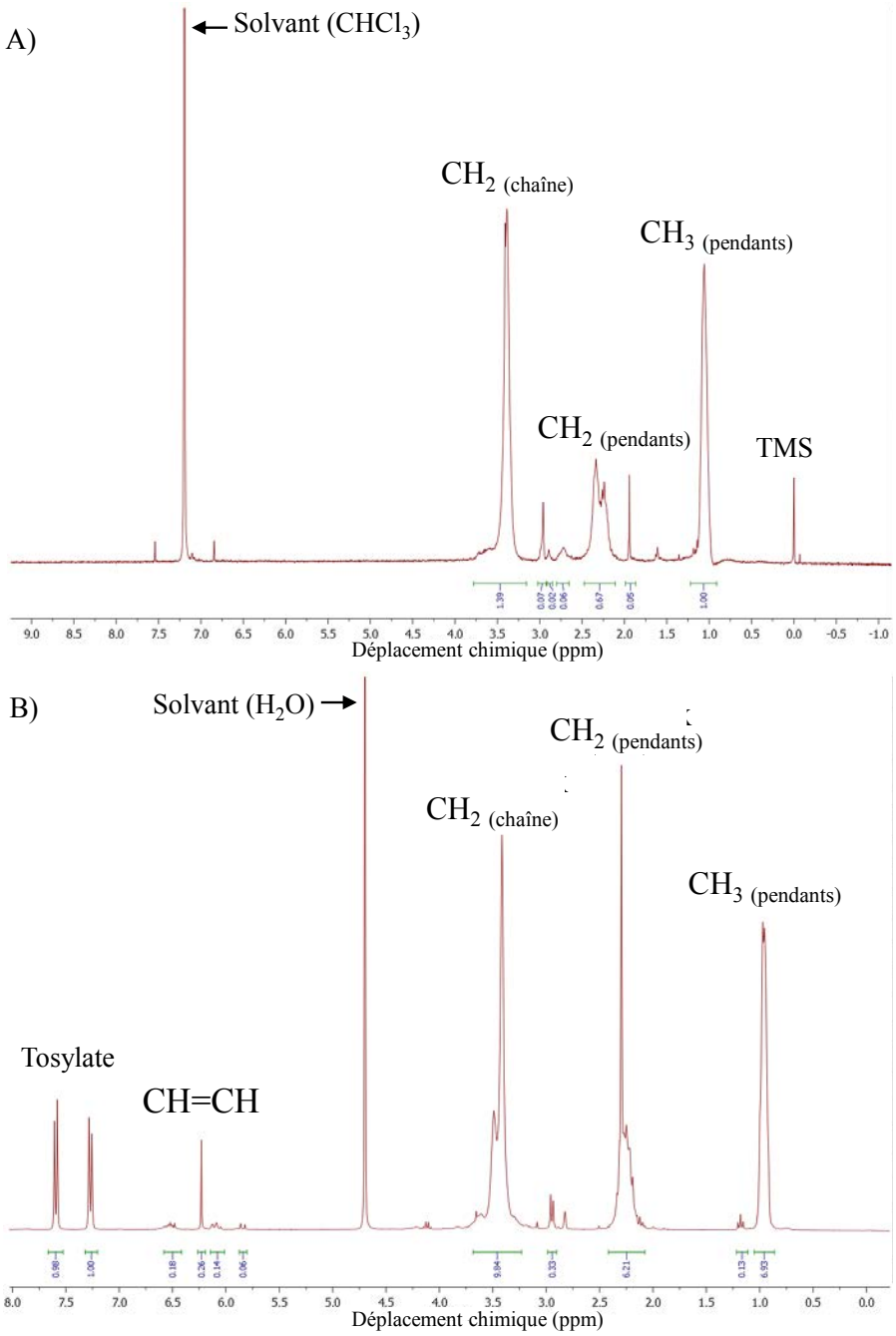


Figure IV.19 : Spectres RMN ^{1}H A) des POx et B) des POx-Acide.

Par l'indexation et l'intégration de ces spectres, il est possible d'identifier les protons appartenant aux CH_2 et au CH_3 des chaînes POx respectivement représentés par les multiplets à 3,5 ppm et 2,2 ppm sur les deux polymères. Il est également possible de voir apparaître le singulet provenant des protons appartenant aux CH=CH à 6,25 ppm sur le spectre des POx-Acide. Cette double liaison provient du groupe anhydride d'acide greffé en bout de chaîne des POx-Acide.

Les spectres RMN ayant été enregistrés juste après la synthèse des polymères, on peut encore y voir la présence de solvant (chloroforme et eau) non évaporé. Un pic encore non identifié au moment de la rédaction de ce manuscrit est présent sur les deux spectres à 1ppm.

4.2.2.3 Élaboration et caractérisation des NPs@POx et des NPs@POx-Acide

Les nanoparticules d'oxyde de fer sont synthétisées par co-précipitation selon la procédure décrite dans le chapitre 3 et ont été fonctionnalisées par des POx classiques ainsi que par des POx-Acide selon la procédure mise en place pour les citrates. Les échantillons sont respectivement notés NPs@POx et NPs@POx-Acide.
Le ligand (POx ou POx-Acide) a été introduit avec un rapport molaire fer/ligand (RM) de 16. L'introduction est faite 15 minutes (MA = 900s) après le début de la germination. La récupération et le lavage des échantillons ont été effectués par séparation magnétique.

Dans le cas de la fonctionnalisation par des citrates, les NPs@Cit synthétisées selon ces paramètres présentaient un diamètre moyen et un écart-type de 10,7 ± 2,1 nm, un rayon hydrodynamique moyen de 42 ± 1 nm et un pourcentage massique de ligand de 5%. Ces NPs@Cit étaient de plus superparamagnétiques à 300K avec une aimantation à saturation de 67 emu/g.

Plusieurs caractérisations ont été effectuées afin d'une part de vérifier le greffage des POx ou POx-Acide et d'autre part, de déterminer les propriétés morphologiques, structurales et magnétiques de ces nouveaux systèmes cœur-coquille.
Des mesures en spectroscopie infrarouge en mode ATR sont effectuées sur les échantillons sous forme de poudres sèches. Les spectres caractéristiques obtenus pour les NPs@POx et NPs@POx-Acide sont présentés sur la figure IV.20. Les spectres des POx et des POx-Acide sont également reportés ici pour comparaison.
Un agrandissement de la zone de nombres d'onde allant de 1300 cm^{-1} à 1700 cm^{-1} est présenté sur la figure IV.21.

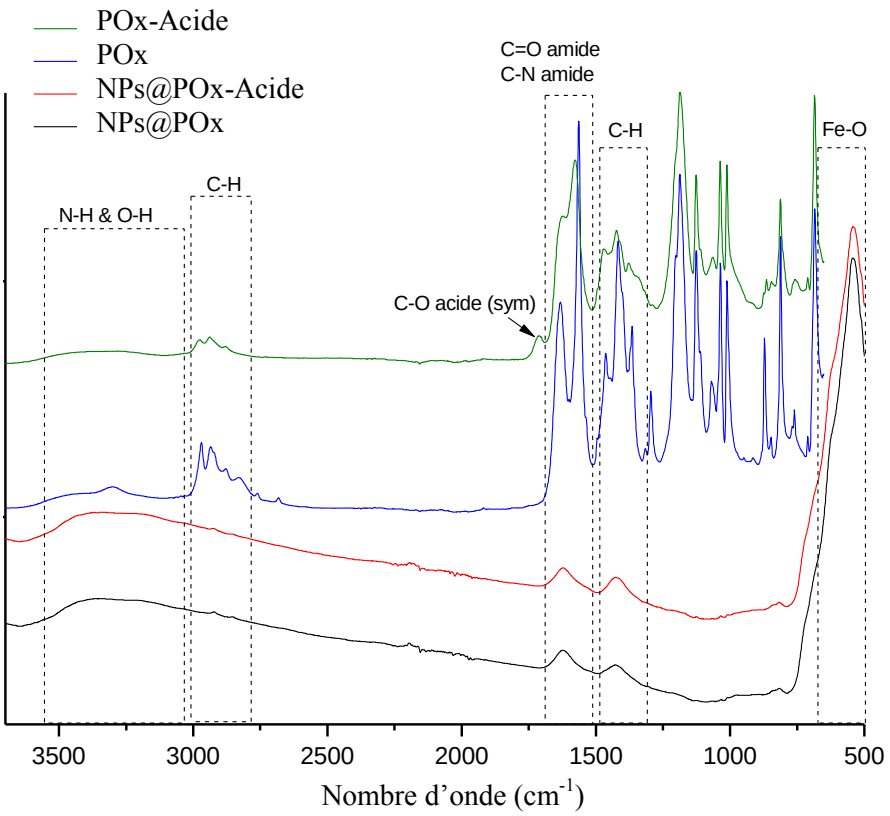


Figure IV.20 : Spectres FTIR-ATR des échantillons NPs@POx et NPs@POx-Acide ainsi que des POx et POx-Acide.

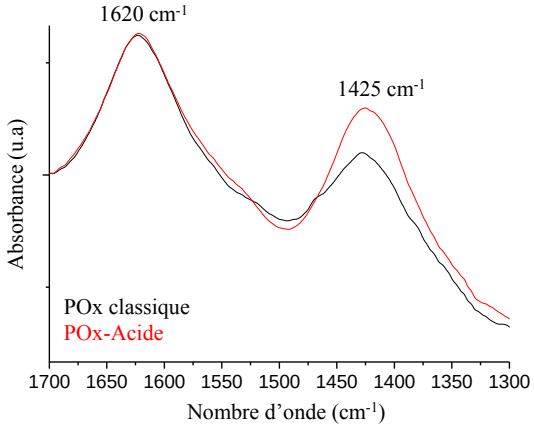


Figure IV.21 : Agrandissement de la plage des nombres d'onde allant de 1300 cm^{-1} à 1700 cm^{-1} des spectres FTIR des POx et POx-Acide.

4 zones sont identifiables sur les spectres des NPs@POx et des NPs@POx-Acide:

- Un pic très intense entre 500 cm^{-1} et 740 cm^{-1} associé aux liaisons Fe-O.
- Une bande centrée sur 1425 cm^{-1} correspondant aux liaisons C-H. La différence d'intensité des bandes à 1425 cm^{-1} sur les deux spectres de la figure IV.21 peut s'expliquer par l'ajout de la contribution des liaisons C-OO^- dans le cas de NP@POx-Acide (À pH = 7, les groupements carboxyles des POx-Acide sont sous la forme de carboxylates.).

- Une bande centrée sur 1620 cm^{-1} qui correspond aux liaisons C-N et C=O des amides[12].
- Un domaine plus étendu entre 3000 et 3500 cm^{-1} caractéristique des liaisons N-H des amides et des liaisons O-H des hydroxyles.

Ces spectres indiquent que les greffages des POx et des POx-Acide en surface des NPs ont bien été effectués.

Afin de connaître le pourcentage massique de ligand en surface, des analyses thermogravimétriques (ATG) sous air jusqu'à 800°C ont été conduites. Les thermogrammes obtenus (figure IV.22) permettent d'observer des pertes de masse totales de 2% et 3,5% respectivement pour NPs@POx et NPs@POx-Acide. Sur ces deux spectres, les pertes de masse liées respectivement au départ de l'eau puis à la décomposition des ligands sont bien définies car elles n'interviennent pas simultanément.
L'eau est désorbée dans l'intervalle de température allant de 25°C à 150°C.
Les ligands se décomposent en deux étapes : Une première étape voit la perte de la majorité du ligand entre 200°C et 350°C. Une deuxième étape entre 600°C et 700°C correspond à la décomposition des chaînes carbonées restantes.
Une fois la perte de masse liée à l'eau déduite, il est possible de calculer des pourcentages massiques de ligands de l'ordre de 1,1 ± 0,1 % et 1,8 ± 0,1 % pour NPs@POx et NPs@POx-Acide respectivement (tableau IV.6). Il faut également signaler qu'une prise de masse vraisemblablement liée à l'oxydation de la magnétite en maghémite puis en hématite est observable lorsqu'elle n'est pas compensée par une perte de masse simultanée. On peut notamment voir cette prise de masse entre 150°C et 200°C ainsi qu'entre 400°C et 600°C pour NPs@POx. Cette prise de masse est certainement responsable d'une sous-évaluation du pourcentage de ligand en surface des NPs.

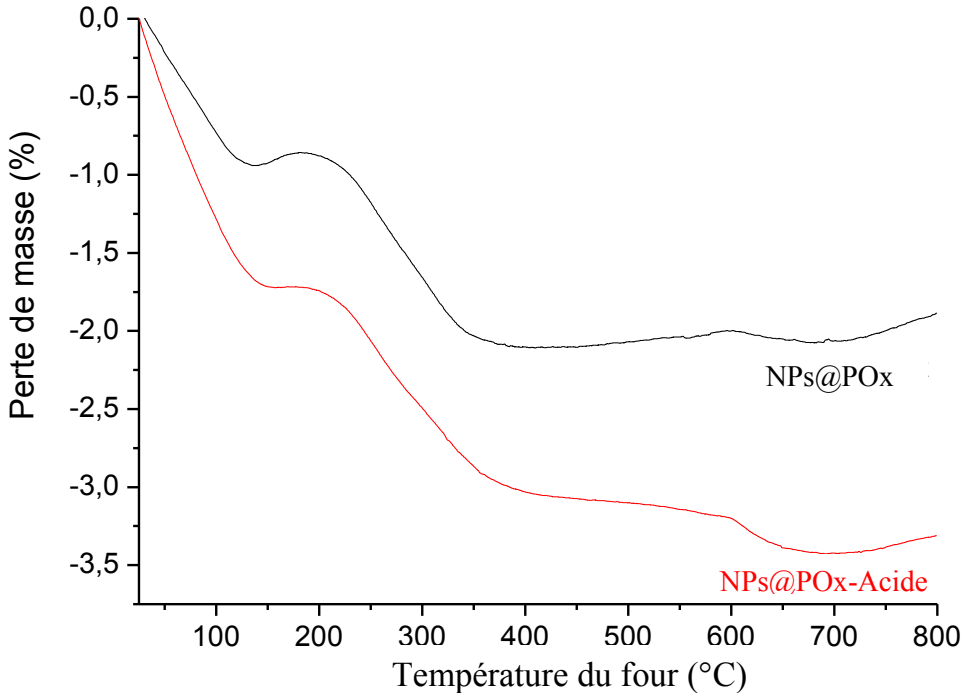


Figure IV.22: Thermogrammes obtenus par ATG sous air des échantillons NPs@POx et NPs@POx-Acide.

Une ATG sous hélium couplée à une mesure en spectrométrie de masse a également été effectuée sur l'échantillon NPs@POx-Acide afin de connaître la nature des espèces chimiques qui sont dégagées lors de la décomposition du ligand. Les résultats de la spectrométrie de masse (figure IV.23) montrent que des espèces carbonées (C, CO et CO_2) et des espèces azotées (NO et NO_2) s'échappent du four lors de la décomposition du ligand. Ces départs ont lieu entre 200°C et 500°C puis entre 650°C et 800°C pour les espèces carbonées et entre 200°C et 400°C pour les espèces azotées, celles-ci proviennent de toute évidence de la décomposition des fonctions amides des POx-Acide.

De plus, cette analyse thermogravimétrique étant faite sous hélium, il n'y a pas cette fois d'oxydation possible de la magnétite. Par un simple calcul, il est possible de connaître la prise de masse liée à l'oxydation d'une quantité donnée de magnétite pure en maghémite pure. Cette prise de masse due à l'oxydation est d'environ 7%. Or, la perte de masse calculée pour l'ATG sous hélium est de 5,3 ± 0,1 % soit 3,5% supplémentaire par rapport à l'ATG sous air des même NPs. Il y a donc bien une sous-évaluation du taux de ligand calculé sur la base de l'ATG sous air pour des nanoparticules d'oxyde de fer fonctionnalisées si celles-ci ne sont pas déjà totalement oxydées en maghémite.

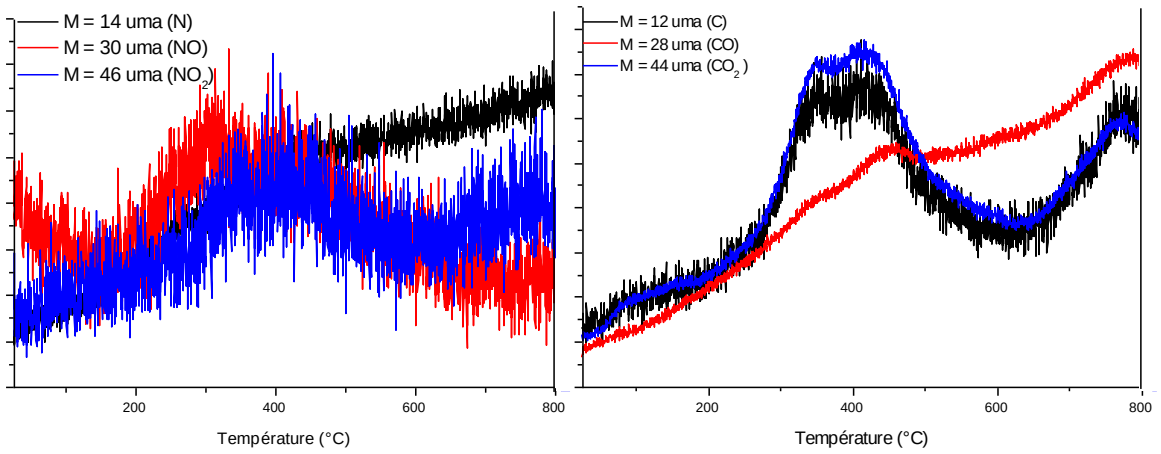


Figure IV.23 : Spectres de masse obtenus lors des mesures ATG-SM sur l'échantillon NPs@POx-Acide. Les canaux choisis sont ceux des espèces azotées et carbonées pouvant être dégagées lors de la décomposition des POx-Acide.

Échantillon	Diamètre moyen (MET)	Aimantation à saturation	wt% de ligand (ATG sous air)	wt% de ligand (ATG sous He)
NPs@POx	11,9 ± 2,3 nm	72,6 ± 0,1 emu/g	1,1 ± 0,1 %	
NPs@POx-Acide	11,4 ± 2,3 nm	72,3 ± 0,1 emu/g	1,8 ± 0,1 %	5,3 ± 0,1 %

Tableau IV.6 : Valeurs numériques obtenues par les différentes analyses conduites sur les deux échantillons NPs@POx et NPs@POx-Acide.

Des mesures en DRX ont été effectuées pour vérifier si la structure cristalline des nanoparticules avait été modifiée.

Aucune modification structurale par rapport à notre échantillon de magnétite de référence magn14 n'est observable sur la figure IV.24 de même qu'aucune impureté cristallisée n'apparaît. On peut également noter que les pics caractéristiques de la maghémite organisée ne sont pas visibles car la structure Fd-3m est partagée par les deux phases magnétite/maghémite. Cette observation cumulée à l'importante prise de masse par oxydation en ATG sous air pourrait indiquer que les POx protègent mieux les NPs d'oxyde de fer de l'oxydation que les citrates. Des mesures en XPS ou par spectroscopie Mössbauer sur ces nanoparticules fonctionnalisées par des POx et POx-Acide seront nécessaires pour tirer des conclusions sur ce point.

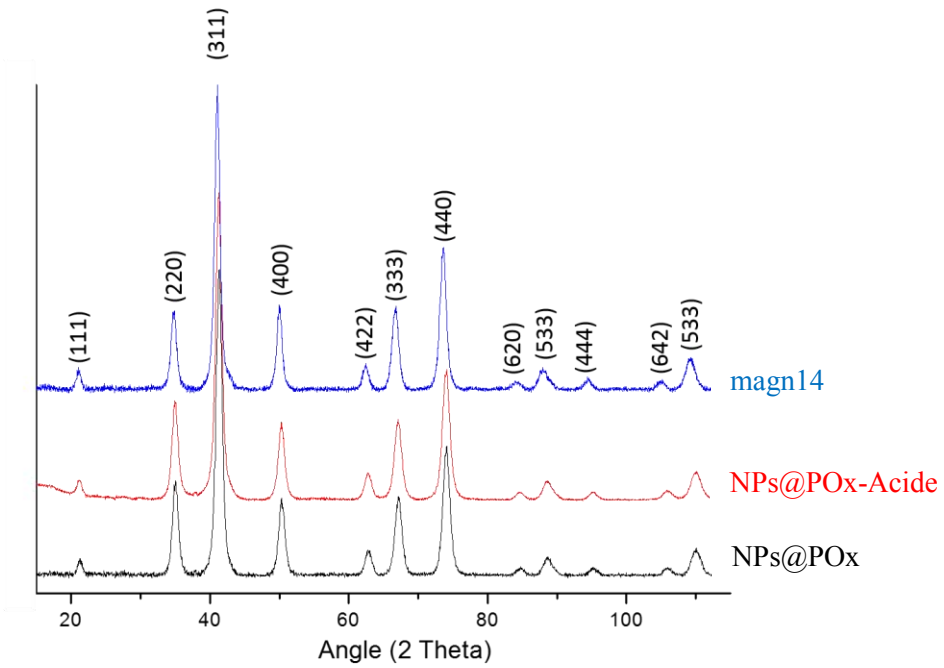


Figure IV.24 : Clichés de DRX pour les échantillons NPs@POx et NPs@POx-Acide ainsi qu'un échantillon de magnétite de référence (magn14) indexés avec les données cristallographiques de la structure Fd-3m de la magnétite/maghémite.

À partir des micrographies MET (figure IV.25) et des histogrammes de répartition de tailles associés (figure IV.26), la morphologie et les diamètres moyens des NPs@POx et des NPs@POx-Acide ont été déterminés.

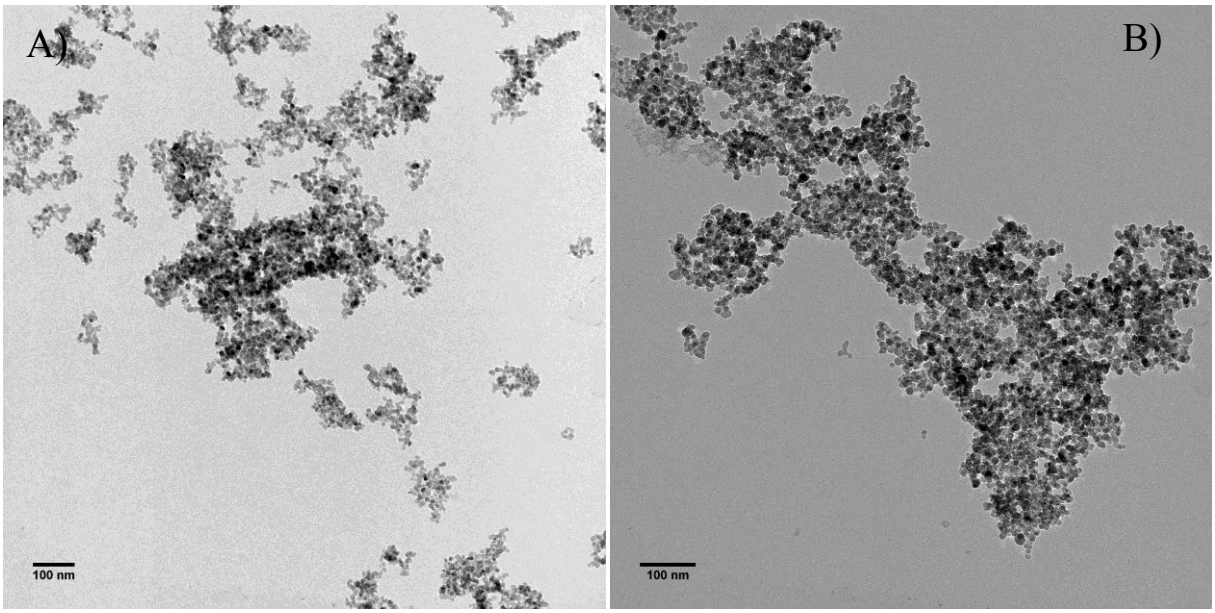


Figure IV.25 : Micrographies MET A) des NPs@POx et B) des NPs@POx-Acide.

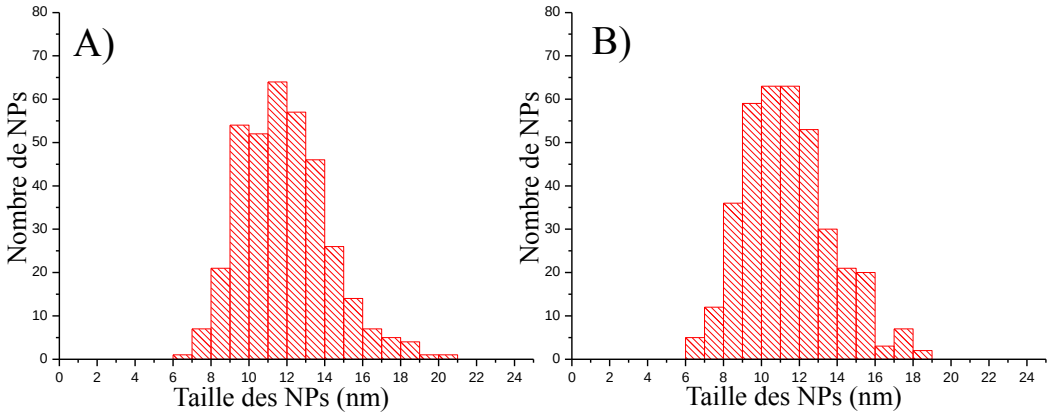


Figure IV.26 : Histogrammes de répartition de taille A) des NPs@POx et B) des NPs@POx-Acide effectués à partir des micrographies MET.

Les NPs@POx et des NPs@POx-Acide présentent toutes une morphologie sphérique comme dans le cas des NPs@Cit. Les diamètres moyens et les écarts-types des NPs@POx et des NPs@POx-Acide sont respectivement de 11,9 ± 2,3 nm et 11,4 ± 2,3 nm (tableau IV.6). Ces diamètres et écarts-types sont équivalents à ceux des NPs@Cit pour RM = 16 et MA = 900s. Ainsi les POx et POx-Acide semblent avoir une action identique sur la germination et croissance des nanoparticules d'oxyde de fer. Toutefois, une étude plus poussée notamment en nombres d'essais avec des RM et des MA différents à la manière de celle conduite avec les ions citrates sera nécessaire pour confirmer cette hypothèse.

Les images MET (figure IV.25) montrent également que les NPs@POx et les NPs@POx-Acide ont tendance à former des agglomérats de l'ordre de 100 nm, cette formation d'agglomérats a été confirmée par des mesures de rayon hydrodynamique en DLS (figure IV.27).

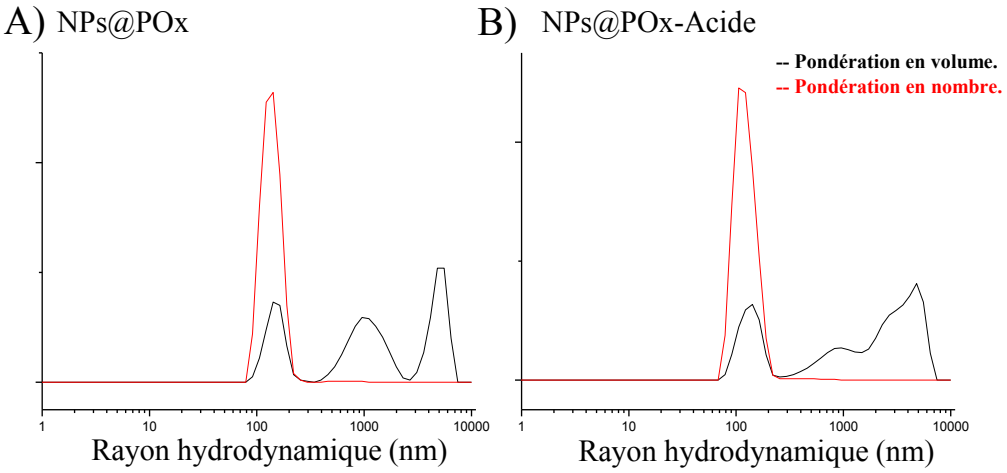


Figure IV.27 : Mesures en DLS du rayon hydrodynamique A) des NPs@POx et B) des NPs@POx-Acide pondérées en nombre et en volume.

Cette formation d'agglomérats peut cependant être expliquée en prenant en compte le ratio fer/ligand introduit. Une augmentation du taux de ligand initial pourrait à la manière de NPs@Cit diminuer le rayon hydrodynamique des NPs@POx et NPs@POx-Acide.

Afin de visualiser la couronne de POx ou de POx-Acide en surface des NPs, des micrographies en microscopie électronique à haute résolution ont également été effectuées (figure IV.28). Grâce à ces micrographies, l'épaisseur de la couche de ligand a pu être mesurée. Celle-ci fait 3,5 ± 0,1 nm et 4,2 ± 0,1 nm respectivement pour NPs@POx et NPs@POx-Acide. Deux cas de figure dans le recouvrement de la surface d'oxyde par les ligands ont pu être observés : soit les NPs sont recouvertes individuellement, soit ce sont de petits groupes de NPs qui sont entourés par une couche de ligand. Sur le cliché de droite, on peut également noter que la distance bien visible entre les plans atomiques a pu être mesurée. Cette mesure inter réticulaire de 3 Å nous permet de conclure que ces plans atomiques sont les plans (220) de la structure Fd-3m dont l'écartement théorique est de 2,97 Å.

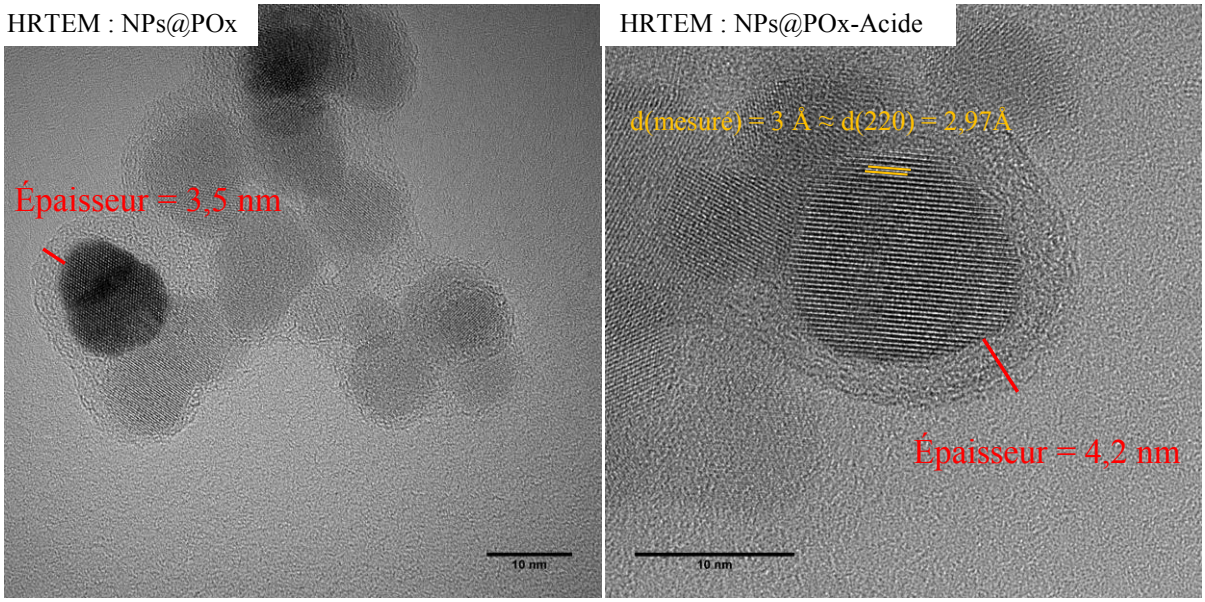


Figure IV.28 : Micrographies HRTEM des NPs@POx et des NPs@POx-Acide. L'épaisseur des couronnes de ligand est matérialisée en rouge.

Les cycles d'aimantation représentés en figure IV.29 ont permis de calculer les aimantations à saturation en emu/$g_{\text{oxyde de fer}}$ des NPs@POx et des NPs@POx-Acide (tableau IV.6). Avec respectivement 72,6 emu/g et 72,3 emu/g, ces aimantations sont du même ordre de grandeur que celles des nanoparticules d'oxyde de fer fonctionnalisées par des citrates de tailles équivalentes et, plus globalement, comparables à celles présentées dans la littérature pour des nanoparticules d'oxyde de fer fonctionnalisées par des ligands organiques [19–21] (tableau Annexe 3). De plus, l'absence d'ouverture du cycle d'aimantation confirme le comportement

superparamagnétique à température ambiante de ces nouveaux systèmes. Il n'y a donc pas eu de perte des propriétés magnétiques avec la fonctionnalisation par les POx et POx-Acide.

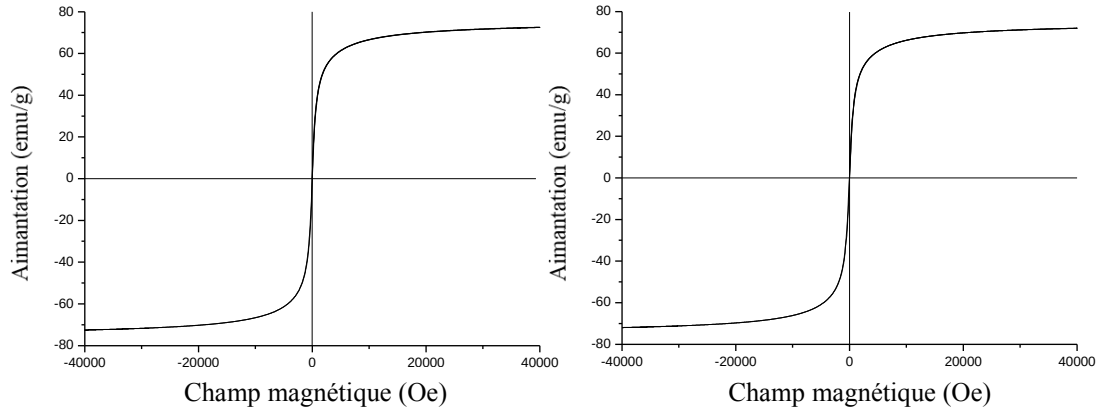


Figure IV.29 : Cycles d'aimantation en fonction du champ à 300K pour les échantillons NPs@POx et NPs@POx-Acide.

4.2.2.4 Bilan

Nous sommes parvenus à synthétiser de nouvelles nanoparticules hybrides oxyde de fer/POx ou POx-Acide à la fois superparamagnétiques et multifonctionnelles de par la présence des ligands.

Nous avons prouvé que la fonctionnalisation était effective et nous avons montré que les propriétés physicochimiques des nanoparticules d'oxyde de fer n'étaient pas affectées. Il reste cependant une phase d'optimisation à mener sur ces systèmes, notamment pour améliorer la dispersion des NPs@POx et NPs@POx-Acide en solution et limiter l'agglomération (par exemple par l'augmentation de la quantité de POx comme nous l'avons fait pour les citrates).

De manière générale, il n'a pas été observé de différences majeures entre les NPs@POx et NPs@POx-Acide concernant la quantité de ligands greffés et leurs propriétés physicochimiques. Cependant, des mesures complémentaires en XPS et en spectroscopie Mössbauer pourraient apporter d'autres informations utiles, notamment sur la composition en terme de ratio magnétite/maghémite des NPs et sur le mode de greffage.

Références bibliographiques – Chapitre 4 :

1. Roeder, E., Henrionnet, C., Goebel, J. C., Gambier, N., Beuf, O., Grenier, D., Chen, B., Vuissoz, P.-A., Gillet, P. & Pinzano, A. Dose-Response of Superparamagnetic Iron Oxide Labeling on Mesenchymal Stem Cells Chondrogenic Differentiation: A Multi-Scale In Vitro Study. *PLOS ONE* **9,** e98451 (2014).
2. Babic, M., Horak, D., Trchova, M., Jendelova, P., Glogarova, K., Lesny, P., Herynek, V., Hajek, M. & Sykova, E. Poly(L-lysine)-modified iron oxide nanoparticles for stem cell labeling. *Bioconjug. Chem.* **19,** 740–750 (2008).
3. Montet-Abou, K., Montet, X., Weissleder, R. & Josephson, L. Transfection agent induced nanoparticle cell loading. *Mol. Imaging* **4,** 165–171 (2005).
4. Jarockyte, G., Daugelaite, E., Stasys, M., Statkute, U., Poderys, V., Tseng, T.-C., Hsu, S.-H., Karabanovas, V. & Rotomskis, R. Accumulation and Toxicity of Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles in Cells and Experimental Animals. *Int. J. Mol. Sci.* **17,** (2016).
5. Gonzales, M., Mitsumori, L. M., Kushleika, J. V., Rosenfeld, M. E. & Krishnan, K. M. Cytotoxicity of iron oxide nanoparticles made from the thermal decomposition of organometallics and aqueous phase transfer with Pluronic F127. *Contrast Media Mol. Imaging* **5,** 286–293 (2010).
6. Huisgen, R. Kinetics and Mechanism of 1,3-Dipolar Cycloadditions. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2,** 633–645 (1963).
7. Huisgen, R. 1,3-Dipolar Cycloadditions. Past and Future. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2,** 565–598 (1963).
8. Rostovtsev, V. V., Green, L. G., Fokin, V. V. & Sharpless, K. B. A Stepwise Huisgen Cycloaddition Process: Copper(I)-Catalyzed Regioselective "Ligation" of Azides and Terminal Alkynes. *Angew. Chem. Int. Ed.* **41,** 2596–2599 (2002).
9. Bishop, L. M., Yeager, J. C., Chen, X., Wheeler, J. N., Torelli, M. D., Benson, M. C., Burke, S. D., Pedersen, J. A. & Hamers, R. J. A Citric Acid-Derived Ligand for Modular Functionalization of Metal Oxide Surfaces via 'Click' Chemistry. *Langmuir* **28,** 1322–1329 (2012).
10. Montalbetti, C. A. G. N. & Falque, V. Amide bond formation and peptide coupling. *Tetrahedron* **46,** 10827–10852 (2005).
11. AUdrey Roy. Synthèse et caractérisation de dérivés amphiphiles du xanthane. (2015).
12. Lassenberger, A., Bixner, O., Gruenewald, T., Lichtenegger, H., Zirbs, R. & Reimhult, E. Evaluation of High-Yield Purification Methods on Monodisperse PEG-Grafted Iron Oxide Nanoparticles. *Langmuir* **32,** 4259–4269 (2016).
13. How to Modulate the Chemical Structure of Polyoxazolines by Appropriate Functionalization - Guillerm - 2012 - Macromolecular Rapid Communications - Wiley Online Library. Available at: http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/marc.201200266/abstract. (Accessed: 14th September 2017)
14. Schlaad, H., Diehl, C., Gress, A., Meyer, M., Demirel, A. L., Nur, Y. & Bertin, A. Poly(2-oxazoline)s as Smart Bioinspired Polymers. *Macromol. Rapid Commun.* **31,** 511–525 (2010).
15. Hoogenboom, R. Poly(2-oxazoline)s: A Polymer Class with Numerous Potential Applications. *Angew. Chem. Int. Ed.* **48,** 7978–7994 (2009).
16. Hoogenboom, R. & Schlaad, H. Bioinspired Poly(2-oxazoline)s. *Polymers* **3,** 467–488 (2011).
17. Knop, K., Hoogenboom, R., Fischer, D. & Schubert, U. S. Poly(ethylene glycol) in drug delivery: pros and cons as well as potential alternatives. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* **49,** 6288–6308 (2010).
18. Barz, M., Luxenhofer, R., Zentel, R. & Vicent, M. J. Overcoming the PEG-addiction: well-defined alternatives to PEG, from structure–property relationships to better defined therapeutics. *Polym. Chem.* **2,** 1900–1918 (2011).
19. Sun, S. H., Zeng, H., Robinson, D. B., Raoux, S., Rice, P. M., Wang, S. X. & Li, G. X. Monodisperse MFe2O4 (M = Fe, Co, Mn) nanoparticles. *J. Am. Chem. Soc.* **126,** 273–279 (2004).
20. Hui, C., Shen, C., Yang, T., Bao, L., Tian, J., Ding, H., Li, C. & Gao, H.-J. Large-scale Fe3O4 nanoparticles soluble in water synthesized by a facile method. *J. Phys. Chem. C* **112,** 11336–11339 (2008).
21. Carenza, E., Barcelo, V., Morancho, A., Montaner, J., Rosell, A. & Roig, A. Rapid synthesis of water-dispersible superparamagnetic iron oxide nanoparticles by a microwave-assisted route for safe labeling of endothelial progenitor cells. *Acta Biomater.* **10,** 3775–3785 (2014).

Conclusion Générale

Conclusion générale :

Le thème de l'étude présentée dans ce manuscrit était la synthèse et la caractérisation de nanoparticules d'oxyde de fer superparamagnétiques fonctionnalisées en surface par des molécules de citrates et ayant des applications potentielles dans le domaine biomédical. Il s'agissait en outre du premier travail des deux équipes de recherche à l'origine de cette thèse traitant des nanoparticules d'oxyde de fer. En ce sens, il se devait de poser les bases du développement de cette thématique de recherche au sein des équipes en question. Le premier objectif de ce travail était de développer et d'optimiser une méthode de synthèse et de purification permettant d'obtenir des nanoparticules d'oxyde de fer fonctionnalisées par des citrates (NPs@Cit) stables en solution aqueuse et aux paramètres physicochimiques contrôlés. Le deuxième objectif était de discuter, grâce à l'établissement d'un plan d'expérience, de l'influence des conditions de synthèse sur les paramètres des nanoparticules synthétisées et de comprendre les relations existantes entre la microstructure des nanoparticules, leur composition chimique et leurs propriétés magnétiques entre autres. Enfin, il était également prévu pour compléter ce travail, d'initier des collaborations avec d'autres laboratoires spécialisés en biologie afin de réaliser des tests in vitro sur les NPs@Cit et spécialisés en chimie organique pour donner de nouvelles fonctionnalités à nos nano-systèmes.

L'étude a commencé par la synthèse et la caractérisation de nanoparticules de référence, de magnétite et de sa forme oxydée, la maghémite ainsi que par la caractérisation du ligand citrate utilisé pour fonctionnaliser les nanoparticules. Des références d'échelle nanométrique sont rarement utilisées dans la littérature où les propriétés des nanoparticules sont souvent comparées à celles des matériaux massifs. Celles-ci nous ont fourni une base de comparaison fiable pour la suite de notre travail, notamment du point de vue des propriétés structurales et magnétiques des nanoparticules synthétisées. Elles ont également servi de témoin de nanoparticules d'oxyde de fer magnétiques nues pour appréhender l'influence des molécules de citrates en surface sur les propriétés physicochimiques, magnétiques et biologiques des nanoparticules.

Des nanoparticules d'oxyde de fer fonctionnalisées *in situ* par des citrates ont ensuite été synthétisées, *via* une version modifiée de la méthode de synthèse très utilisée dite de co-précipitation. Les deux conditions de synthèse qui ont été étudiées en détail par le biais du plan d'expérience établi étaient liées toutes deux à l'ajout de ligand. Il s'agissait du ratio molaire fer/ligand introduit (RM) et du moment d'ajout du ligand citrate dans le milieu réactionnel (MA). Comme nous l'avions évoqué dans le premier chapitre bibliographique, la

présence de citrate en quantité variable au moment de la germination des nanoparticules synthétisées par co-précipitation avait déjà été examinée dans les années 90. Cependant, il n'y avait jamais eu à notre connaissance d'étude approfondie de l'influence couplée du ratio molaire et du moment d'ajout du ligand citrate lors de la synthèse par co-précipitation de nanoparticules d'oxyde de fer magnétiques.

Nous avons pu mettre en évidence que le moment d'ajout du citrate avait une importance capitale sur la taille finale des nanoparticules obtenues. En effet, la taille moyenne des NPs@Cit a pu être modulée entre 4 nm et 13 nm très précisément en faisant varier ce paramètre.

Le ratio molaire de fer/ligand introduit pendant la synthèse a montré une influence sur le pourcentage massique de citrate greffé en surface des échantillons après synthèse et lavage. Ce taux de citrate est lui-même directement lié au diamètre hydrodynamique des nanoparticules en solution aqueuse et donc à leur tendance à former des agglomérats. Il a en effet été constaté que, plus le ratio molaire fer/ ligand introduit pendant la synthèse est élevé, plus le diamètre hydrodynamique mesuré et donc la tendance des nanoparticules à s'agglomérer augmentent. Cette agglomération n'est cependant pas irréversible puisque la diminution du ratio fer/ligand par ajout de citrates après synthèse permet de disperser les agglomérats formés.

L'influence de la taille moyenne et du taux de ligand en surface des nanoparticules sur leur composition chimique et leur microstructure a également été étudiée par les techniques de spectroscopies XPS, Raman et Mössbauer ainsi que par diffraction des rayons X. Il a été observé que les nanoparticules les plus petites présentaient une tendance à l'oxydation marquée, corrélable à un rapport surface/volume important maximisant la surface d'échange avec l'air. D'autre part, nous avons montré que l'augmentation du pourcentage massique de ligand en surface avait, au contraire, pour effet de protéger les nanoparticules de l'oxydation et de garder une forme plus proche de la magnétite. Le compromis entre ces deux paramètres, qui permet de conserver une structure proche de celle de la magnétite pure malgré l'exposition à l'air, a été trouvé pour des nanoparticules ayant une taille moyenne de 7 à 8 nm et un pourcentage massique de ligand de l'ordre de 20%.

L'influence de ces mêmes paramètres sur les propriétés magnétiques des nanoparticules a également été étudiée. Il est apparu que lorsque la taille moyenne des nanoparticules diminue, leur aimantation à saturation et leur température de blocage moyenne diminuaient également. De plus, l'aimantation à saturation et la température de blocage moyenne des échantillons diminuent également lorsque le pourcentage massique de ligand dans l'échantillon augmente.

Pour des NPs@Cit ayant des tailles moyennes de 10 à 11 nm, l'aimantation à saturation moyenne observée est de l'ordre de 70 emu/g. Cette valeur est en accord avec les données rapportées dans la littérature et elle est compatible avec l'utilisation de ces nanomatériaux pour des applications biomédicales, telles que l'usage en tant qu'agent de contraste pour l'IRM ou la séparation magnétique de matériel biologique *in vitro*.

Les tests visant à étudier l'interaction entre nos nanoparticules et les milieux biologiques ont été effectués en collaboration avec le laboratoire IMoPA (Vandoeuvre-lès-Nancy). Ceux-ci ont montré une bonne internalisation cellulaire des NPs@Cit de 7 nm et 10 nm. Il a été mis en évidence que la fonctionnalisation des nanoparticules d'oxyde de fer par des citrates favorisait leur internalisation par comparaison avec les nanoparticules d'oxyde de fer nues de référence. Les tests d'activité mitochondriale ont, quant à eux, montré un impact quasi nul des nanoparticules de 10 nm sur les cellules, ce qui est un signe très encourageant quant à l'absence de cytotoxicité des NPs@Cit synthétisées. Cela permet ainsi par exemple des perspectives d'utilisations dans le suivi en IRM de la réparation de cartilage par des cellules de culture.

D'autres travaux ont été menés en collaboration avec le laboratoire LCPM (Nancy) afin de se servir des citrates en surface des nanoparticules comme précurseur de fonctionnalisation. Une fonction alcyne a ainsi été greffée sur l'un des groupes carboxylates des citrates par une réaction d'amidation du carbodiimide. Le but de cette modification de la couronne de citrate est de permettre par la suite l'utilisation des nanoparticules fonctionnalisées par des citrates modifiés pour des réactions de chimie clic afin d'y greffer de nouvelles molécules d'intérêt. Les premiers résultats en spectroscopie infrarouge semblent encourageants pour la réussite de cette modification. Cependant, d'autres analyses notamment en XPS devront être effectuées pour une caractérisation plus fine.

Une autre collaboration, cette fois avec l'ICGM (Montpellier), visait à adapter la méthode de synthèse optimisée avec des ligands citrates à la synthèse de nanoparticules d'oxyde de fer fonctionnalisées par des polymères bio-inspirés de type polyoxazoline (NPs@POx). Plusieurs techniques de caractérisation ont montré le succès du greffage de ces polymères en surface des nanoparticules d'oxydes de fer magnétiques. La synthèse de ces NPs@POx a été effectuée par un procédé en une seule étape et directement en milieu aqueux, ce qui n'avait pas été fait jusqu'alors. La couche de POx en surface des nanoparticules a notamment pu être visualisée directement par microscopie électronique à haute résolution. Les propriétés structurales et magnétiques des nouvelles nanoparticules hybrides obtenues sont identiques à celles des NPs@Cit, ce qui rend ces nano-objets très prometteurs. Ils allient en effet les avantages des

NPs d'oxyde de fer en terme de propriétés magnétiques et de faible toxicité avec la grande polyvalence des fonctions qui peuvent être apportées aux polyoxazolines par le biais de modifications de leurs chaînes latérales (exemple de la synthèse de POx-Acide).

Durant ce travail, de nombreuses synthèses ont été réalisées et un grand nombre de résultats a été obtenu via une multitude de techniques de caractérisation. Toutefois, il reste encore plusieurs points qu'il sera nécessaire de développer ou compléter par la suite.

Sur la caractérisation des NPs@Cit et la compréhension des relations entre les conditions de synthèses et les caractéristiques des nanoparticules, des mesures de potentiel zêta devront être effectuées et viendront compléter les résultats obtenus à ce jour en DLS concernant la stabilité en solution des nanoparticules. Des nouvelles mesures en spectroscopie Mössbauer, en évitant cette fois l'étape de broyage, pourront également être menées et comparées aux résultats de spectroscopie XPS et Raman. Enfin, des rapports molaires (RM) et des moments d'ajouts (MA) non testés pourront venir compléter cette étude (notamment des RM > 24 et des MA compris entre 10s et 60s).

Les premiers tests en milieu biologique n'ont pas révélé de toxicité flagrante des NPs@Cit mais d'autres tests plus précis permettant de mettre en évidence des éventuelles morts cellulaires par apoptose devront être effectués. De plus, avant d'utiliser les NPs@Cit in vivo, une étude de l'influence potentielle de ces dernières sur la différenciation chondrogénique des cellules CSMs, nécessaire à leur utilisation pour des réparations cartilagineuses, devra être menée. Les nouvelles nanoparticules hybrides obtenues NPs@POx et NPs@Cit-Alcyne devront également voir leurs interactions avec les cellules testées de la même façon que cela été fait pour les NPs@Cit.

La modification des citrates de surface par une fonction alcyne doit encore être prouvée de manière irréfutable ; il est envisagé pour cela de réaliser une réaction de chimie clic entre les nanoparticules fonctionnalisées par des ligands citrates modifiés par l'alcyne et des molécules facilement identifiables en spectroscopie infrarouge ou UV par exemple.

Quant aux nanoparticules hybrides innovantes NPs@POx, une étude similaire à celle réalisée sur les paramètres de synthèse des NPs@Cit pourrait être conduite afin de contrôler au mieux les caractéristiques des nanoparticules fonctionnalisées par ce polymère lors de leur synthèse. Des travaux devront également être menés pour améliorer la dispersion en solution aqueuse des NPs@POx, qui ont pour le moment tendance à former des agglomérats de 100 nm environ. Ces travaux passeront notamment par l'augmentation du taux de ligand en surface des nanoparticules.

ANNEXES 173

Annexe 1 : Techniques de caractérisation 173

A.1.1 Méthodes et modes de mesures en DLS 173

A.1.2 Diffraction des rayons X (DRX) 174

A.1.3 Spectroscopie XPS 175

A.1.4 Mesures magnétiques 175

Annexe 2 : Tableau global des résultats 179

Annexe 3 : Aimantation à saturation des nanoparticules d'oxyde de fer de la littérature 180

Annexe 4 : Quantification élémentaire issue des données XPS 181

ANNEXES

Annexe 1 : Techniques de caractérisation

A.1.1 Méthodes et modes de mesures en DLS

Les mesures réalisées par la technique de la diffusion dynamique de la lumière (ou DLS de l'anglais « Dynamic Light Scattering ») permettent la mesure du rayon hydrodynamique des particules en suspension dans un solvant dans une gamme comprise entre 0,6 nanomètres et 6 micromètres[1]. Ces mesures permettent d'estimer la monodispersité d'un échantillon mais aussi de mettre en évidence l'agglomération partielle des nanoparticules en clusters et l'agrégation si elle a lieu. Ces mesures ont été réalisées sur un appareil zetasizer NanoZS de Malvern Instruments. Cet appareil permet l'expression des résultats en intensité, volume et nombre. La différence entre ces modes dépend du traitement des données par le logiciel de l'appareil.

La figure A.1 présente de manière schématique les différentes réponses de l'appareil à un même échantillon en fonction du mode de mesure : On considère pour cet exemple un échantillon dans lequel se trouvent des nanoparticules appelées A de 5 nm de diamètre hydrodynamique et des agglomérats de nanoparticules appelées B de 50 nm de diamètre hydrodynamique. On considère également pour les besoins de l'exemple qu'il y a dans l'échantillon autant de nanoparticules A que d'agglomérats B.

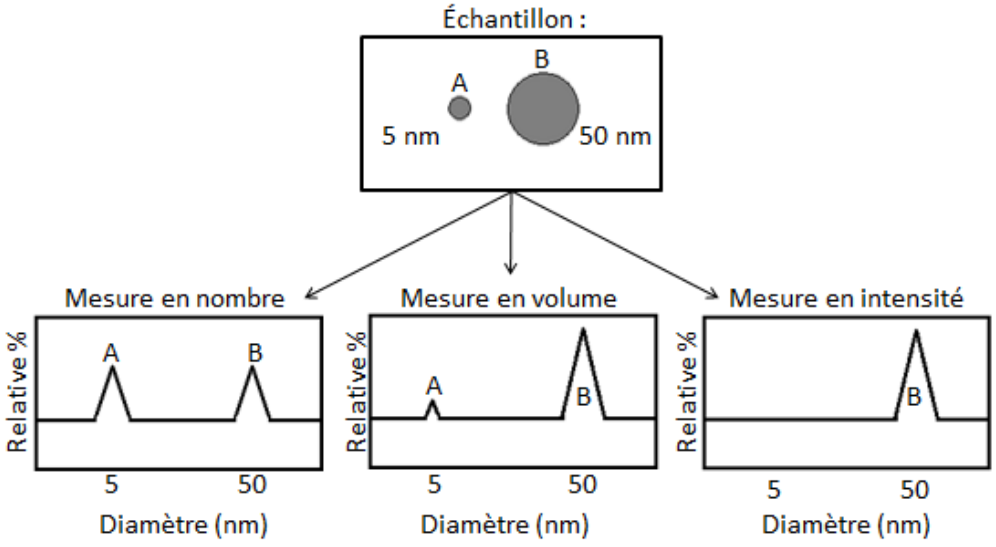


Figure A.1 : Schéma explicatif des différentes réponses possibles en fonction du mode de mesure en DLS sur un même échantillon de nanoparticules (figure inspirée du manuel de l'utilisateur de l'appareil de DLS utilisé[1]).

Pour la mesure en nombre, dans la mesure où il y a dans l'échantillon autant de A que de B, la réponse est logiquement deux pics de même intensité. La mesure en volume montre un pic A 1000 fois moins intense que le pic B, étant donné qu'une nanoparticule de 50 nm aura un volume mille fois supérieur à celui d'une nanoparticule de 5 nm. Enfin, la mesure en intensité fait totalement disparaître le pic des nanoparticules A. En effet, d'après l'approximation de Rayleigh, la réponse en intensité d'une nanoparticule de 50 nm sera un million de fois supérieure à celle d'une nanoparticule de 5 nm du fait que celle-ci diffusera bien plus la lumière[1], la diffusion d'une nanoparticule étant proportionnelle à son diamètre à la puissance 6. Avec la mesure en intensité, le pic A,un million de fois moins intense, ne sera plus visible.

Les mesures de rayons hydrodynamiques réalisées au cours de ce travail ont toujours été enregistrées avec les trois modes de pondération. Cependant, pour plus de lisibilité, seules les mesures pondérées en volume sont exposées dans ce manuscrit. Nous avons choisi ce mode car contrairement à la mesure en intensité, la présence d'une seule impureté de grande taille (par exemple une poussière de contamination) ne risque pas d'écraser en intensité de réponse tout le reste de la population de l'échantillon. A l'inverse, la mesure en nombre a tendance à occulter la présence éventuelle d'agrégats dans l'échantillon s'ils sont en sous nombre par rapport aux nanoparticules. La mesure en volume est donc un bon compromis pour avoir une idée précise des différentes populations présentes de manière significative au sein d'un échantillon.

Pour réaliser les mesures DLS sur nos échantillons, ceux-ci sont préalablement fortement dilués pour avoir une concentration de l'ordre de 0,1mg/mL par rapport à 5mg/mL pour la concentration des solutions de stockage. De plus, le pH des échantillons est voisin de 7 afin de connaître le comportement en solution des échantillons dans un milieu proche du milieu biologique. Les mesures effectuées ont toutes une durée minimale de 3 minutes et chaque mesure a été répétée trois fois afin d'obtenir une valeur fiable du diamètre hydrodynamique.

A.1.2 Diffraction des rayons X (DRX)

Les diffractogrammes des rayons X ont été enregistrés grâce à un diffractomètre INEL CPS120 CoK_{α} muni d'un détecteur courbe permettant l'enregistrement du spectre sur 110° simultanément. Les mesures ont été effectuées sur des poudres sèches sans préparation particulière des échantillons simplement déposés sur un support en rotation avec un angle entre l'échantillon et le faisceau incident de rayons X de 10°. La hauteur de l'échantillon dans

l'appareil est réglée manuellement grâce à deux pointeurs laser, ce réglage manuel de la position de l'échantillon pourra être responsable d'une erreur sur le paramètre de maille calculé qu'il faudra corriger au moment du traitement des données. Pour tous les échantillons, le temps d'enregistrement est de 1h30 au minimum mais, dans certains cas (très petites nanoparticules mal cristallisées), les mesures ont été réalisées pendant une nuit entière dans le but de disposer d'un meilleur rapport signal/bruit. Les diffractogrammes obtenus ont ensuite été traités avec le logiciel Diffrac.Eva afin d'en soustraire le bruit de fond puis indexés manuellement grâce aux données cristallographiques extraites de la base de données du logiciel Pearson's Crystal Data[2].

A.1.3 Spectroscopie XPS

Les analyses en XPS ont été réalisées avec un spectromètre Kratos Axis Ultra connecté à une boîte à gants sous atmosphère d'argon. La préparation des échantillons est également effectuée en boîte à gants par dépôt de quelques milligrammes de poudre sèche sur le porte-échantillon maintenus en place par un bout de ruban adhésif cuivré afin de s'assurer de la dispersion des charges. Pour minimiser les effets de charge qui nuisent à l'analyse, un flood gun a été utilisé pour toutes nos mesures. Enfin un scan rapide de contrôle a été effectué avant et après chaque analyse afin de vérifier que l'échantillon ne s'était pas dégradé sous le faisceau de rayons X. Les spectres présentés ont été traités via le logiciel Casa XPS et sont calibrés sur la raie C 1s du carbone de contamination fixée à 285,0 eV. De plus, la même ligne de base (Shirley) a été choisie pour le traitement de tous les échantillons.

A.1.4 Mesures magnétiques

Les mesures magnétiques sur nos échantillons ont été effectuées au centre de compétence magnétisme de l'Institut Jean Lamour. L'appareil de mesure utilisé est un PPMS (Physical Property Measurement System) doté d'une tête VSM (Vibrating Sample Magnetometer). La bobine supraconductrice produisant le champ magnétique au sein de l'appareil peut délivrer un champ allant jusqu'à 9 Tesla et le cryostat refroidi à l'hélium liquide dans lequel est introduit l'échantillon pour les mesures permet le contrôle précis de la température dans une plage comprise entre 2 et 350 K. La sensibilité de mesure du PPMS-VSM est de l'ordre de 10^{-6} emu.

Préparation des échantillons

Le protocole utilisé pour la préparation des échantillons est le même pour tous les échantillons présentés dans ce manuscrit. Ce protocole a trois objectifs principaux : d'une part de connaître précisément la masse de l'échantillon mesuré, d'autre part d'empêcher tout mouvement de l'échantillon une fois ce dernier introduit dans le PPMS et enfin d'éviter une contamination des mesures suivantes par une perte de poudre dans l'appareil.
La figure A.2 propose une représentation schématique d'un échantillon prêt à être introduit dans le cryostat du PPMS-VSM.

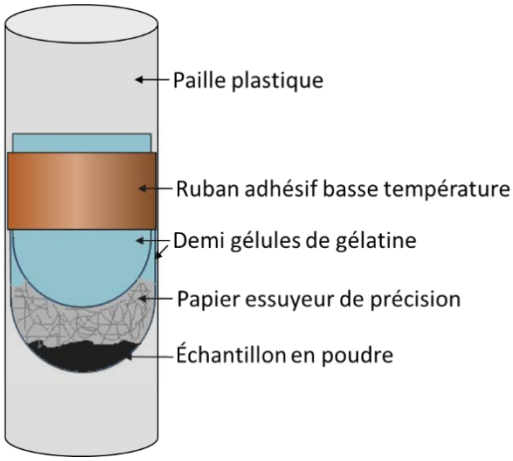


Figure A.2 : Schéma d'un échantillon prêt à être introduit dans le PPMS.

Une masse d'environ 5,00 mg de poudre sèche connue avec une précision de 0,01 mg à l'aide d'une balance de précision est prélevée dans le récipient de stockage puis introduite dans une demi-gélule en gélatine. Une petite quantité de papier essuyeur de précision destiné à des utilisations scientifiques est ensuite introduite dans la demi-gélule et poussée à l'aide d'une baguette non magnétique au fond de la demi-gélule pour y maintenir l'échantillon en poudre. Une seconde demi-gélule est ensuite introduite dans la première pour maintenir l'échantillon et le papier, puis de l'adhésif spécifique (KAPTON) résistant aux très basses températures est utilisé pour solidariser les deux demi-gélules entre elles. Enfin, l'échantillon est glissé dans une paille en plastique à une position définie afin que celui-ci soit à une distance optimale du capteur lorsque la paille fixée à la canne porte-échantillon est introduite dans le cryostat. Des mesures ont été effectuées sur l'ensemble porte-échantillon paille/KAPTON/gélule/papier sans échantillon afin de vérifier son comportement magnétique et de s'assurer que ce dernier ne fausse pas les mesures. Cet ensemble s'avère avoir un comportement diamagnétique avec

une réponse de l'ordre de (– 2.10^{-8} emu/Oe) et peut donc être ignoré lors de l'interprétation des résultats car négligeable par rapport au comportement magnétique des nanoparticules d'oxyde de fer.

Mesures magnétiques effectuées :

Cycles d'aimantation à 300K :

Les mesures de cycles d'aimantation consistent à étudier l'aimantation de notre échantillon à une température donnée en fonction du champ magnétique $\vec{H}$ appliqué. Ces cycles d'aimantation sont effectués à la température de 300K. Les mesures sont effectuées en faisant varier le champ de +5 Tesla à -5 Tesla, puis en le faisant remonter de -5 Tesla à +5 Tesla. Sur les cycles à 300K, les deux courbes obtenues sont généralement superposables, il n'y a pas d'ouverture de cycle et donc pas de champ coercitif ni d'aimantation à saturation. Les aimantations mesurées lors de ces cycles sont exprimées en emu mais les résultats sont traités grâce aux mesures ATG afin d'exprimer l'aimantation en emu/g de fer.

Cycles d'aimantation à 4K avec ou sans champ pendant le refroidissement :

Ces cycles d'aimantation servent à mettre en évidence les interactions d'échanges révélatrices d'une structure cœur/coquille pour des NPs. Ils consistent à étudier l'aimantation d'un échantillon en fonction du champ magnétique $\vec{H}$ comme précédemment. Toutefois, ces cycles sont cette fois enregistrés à la température de 4K et sont réalisés deux fois. Une première fois sur l'échantillon qui a au préalable été amené à la température de 4 K sans qu'aucun champ magnétique ne soit appliqué et dans l'autre cas sur un échantillon qui a été amené à 4 K sous un champ appliqué de 4 Tesla. Ces cycles présentent normalement une ouverture du cycle (hystérèse), un champ coercitif et une aimantation à saturation. C'est le décalage éventuel du cycle réalisé sur l'échantillon refroidi sous champ qui peut permettre la mise en évidence de l'interaction d'échange.

Mesures d'aimantation en fonction de la température (ZFC/FC) :

L'autre type de mesure magnétique couramment effectuée est celle de l'aimantation d'un échantillon en fonction de la température. Cette mesure d'aimantation est faite entre 5 K et 300 K avec un petit champ constant de 75 Oe appliqué. Ce type de mesure couramment

appelé ZFC/FC pour « Zéro Field Cool/Field Cool » est effectuée deux fois consécutivement. Pour la première mesure, l'échantillon est refroidi jusqu'à 5 K sans qu'aucun champ magnétique ne soit appliqué. Pour la seconde mesure, l'échantillon est à nouveau refroidi à 5 K mais avec un champ de 75 Oe appliqué pendant le refroidissement. En règle générale, les deux courbe ZFC et FC lorsqu'elles sont superposées sur un même graphique se rejoignent à la température maximum de la courbe ZFC qui est la température de blocage T_B de l'échantillon. Cette température correspond à la température de transition entre ferrimagnétisme et superparamagnétisme.

Annexe 2 : Tableau global des résultats

Ratio molaire	Moment ajout (s)	Taille MET (nm)	Taille DRX (nm)	Diamètre hydrodynamique à pH 7 (nm)	Taux de ligand (%)	Ms (4T) (emu/g)	T_B moyenne (K)
1	**0**	4,5	3,6	4,6	37	7,8	21
1	**0**	4,5	3,6	5,4	16	11,6	38
1	**0**	3,8	3,6	10,4	37	6	11
1	**10**	8,1	7,8	33	21	50,9	188
1	**60**	9,4	7,9	68	14	68,5	195
1	**300**	10,8	9,4	79	3	67,1	292
1	**600**	11	9,2	68	3,5	69,9	194
1	**900**	11,4	9,7	50	3,5	71,9	289
1	**900**	10,4	9,6	40	15	49,2	192
1	**1200**	10,7	9,4	60	4	72,2	294
1	**1800**	12,3	9,5	65	2,5	68,9	>300
1	**2400**	12,7	9,7	70	4	73,8	291
1	**4800**	12,6	9,9	78	2,5	68,9	>300
2	**0**	4,1	3,5	6	38	6,2	14
2	**0**	4,2	3,5	20	35,5	14	16
2	**10**	7,5	7,8	50	5	74,8	222
2	**900**	10,4	8,8	32	6	68,6	226
2	**1200**	10,4	9,8	46	3,5	77	290
2	**2400**	12,4	9,5	60	4	70,4	>300
4	**0**	4	3,5	15,5	26	10,5	19
4	**10**	8,7	8,8	140	3	68,9	190
4	**900**	10,5	9,2	41	5	66,4	247
8	**0**	3,9	3,5	29	30	14,4	16
8	**0**	4,9	3,5	42	7	35,4	45
8	**10**	8	7,7	68	4,5	67	185
8	**60**	9	8,1	105	8	67	214
8	**300**	10	9	55	4,5	68,9	287
8	**600**	11,8	9,4	68	3	67,8	>300
8	**900**	11,6	9,4	42	3,5	70,5	>300
8	**900**	11,2	9,2	43	4	69,7	287
8	**1200**	11,5	9,2	48	2,7	68,6	>300
8	**1800**	12,1	9,8	95	4	70,6	>300
8	**2400**	12,2	9,6	79	3	68,9	>300
8	**4800**	12,4	9,8	90	3	67,7	>300
16	**0**	4,3	3,5	77	12	32,1	49
16	**10**	8,2	8,2	140	3,5	72,2	205
16	**900**	10,7	8,6	42	5	66,4	220
24	**0**	5,6	4,6	99	4,7	65	149
24	**10**	8,7	7,5	79	4	67,1	175
24	**60**	8,9	8,6	80	4,5	72,3	202
24	**300**	10,9	8,5	79	4	62	204
24	**600**	11,5	8,9	0,91	4	69,7	>300
24	**900**	11,6	9,4	62	3	69,7	>300
24	**1200**	11,9	9	100	3	69,7	>300
24	**1800**	13,1	9,1	63	2,7	65,6	245
24	**2400**	13,4	8,9	90	3	59	206
24	**4800**	12,8	10,7	78	2,7	73,9	>300

Tableau A.1 : Résumé des résultats obtenus en termes de tailles des NPs (MET et DRX), diamètre hydrodynamique (DLS), taux de ligand (ATG), et mesures magnétiques pour tous les échantillons.

Annexe 3 : Aimantation à saturation des nanoparticules d'oxyde de fer de la littérature

Méthode de synthèse	Ligand utilisé	Taille moyenne des NPs (nm)	Ms (emu/g)	Référence
Co-précipitation	Acide citrique	12	66	Ramos Guivar 2016[3]
Co-précipitation	Acide citrique	55 (clusters)	48	Saikia C 2016[4]
Co-précipitation	Dextran	8	16	Sreeja V 2015[5]
Co-précipitation	-	12	72	Mascolo M C 2013[6]
Co-précipitation	-	10	64	Mascolo M C 2013[6]
Co-précipitation	-	8	55	Mascolo M C 2013[6]
Co-précipitation	Acide oléique	11	47	El Ghandoor H 2012[7]
Co-précipitation	PEG	8	70	Hervé K 2008[8]
Co-précipitation	-	14	66	Drbohlavova J 2009[9]
Co-précipitation	TMAOH	15	68	Fazilati M 2013[10]
Co-précipitation	Acide folique	35	32	Fazilati M 2013[10]
Co-précipitation	Acide oléique	10	35	Zablotskaya A 2009[11]
Co-précipitation	-	7	42	Jafari A 2015[12]
Co-précipitation	-	10	48	Jafari A 2015[12]
Co-précipitation	Acide oléique/undecylénate	13	17	Zhu H 2013[13]
Co-précipitation	Fécule	15	65	Linh P H 2009[14]
Co-précipitation	-	12	65	Nedkov I 2004[15]
Co-précipitation	-	33	82	Nedkov I 2004[15]
Décomposition thermique	Acide oléique	5	51	Baaziz W 2014[16]
Décomposition thermique	Acide oléique	8	58	Baaziz W 2014[16]
Décomposition thermique	Acide oléique	11	61	Baaziz W 2014[16]
Décomposition thermique	Acide oléique	15	71	Baaziz W 2014[16]
Décomposition thermique	Acide oléique	20	82	Baaziz W 2014[16]
Décomposition thermique	Éthylène diamine	6	64	Barick K C 2009[17]
Décomposition thermique	DMSA	12	66	Salas G 2012[18]
Décomposition thermique	DMSA	14	69	Salas G 2012[18]
Décomposition thermique	DMSA	18	70	Salas G 2012[18]
Décomposition thermique	DMSA	22	69	Salas G 2012[18]
Décomposition thermique	PFPA	6	20	Lu X 2014[19]
Hydrothermale	TMAOH	12	60	Daou T J 2006[20]
Hydrothermale	TMAOH	39	82	Daou T J 2006[20]
Hydrothermale	-	15	53	Ge S 2009[21]
Hydrothermale	-	17	65	Ge S 2009[21]
Hydrothermale	-	22	81	Ge S 2009[21]
Polyols	Triéthylène glycol	7	69	Cai W 2007[22]
Polyols	PVP	5	50	Arndt D 2014[23]
Sol-Gel	Acide benzoïque	8	55	Sciancalepore C 2014[24]
Sol-Gel	2-pyrrolidone	7	48	Qi H Z 2011[25]
Sol-Gel	2-pyrrolidone	10	54	Qi H Z 2011[25]
Sol-Gel	2-pyrrolidone	13	62	Qi H Z 2011[25]
Sol-Gel	-	8	47	Lemine O M 2012[26]
Sol-Gel	Diethanolamine	10	57	Hasanpour A 2012[27]

Tableau A.2 : Résumé des tailles des nanoparticules et aimantations à saturation obtenues dans la littérature pour différentes techniques de synthèses et ligands.

Annexe 4 : Quantification élémentaire issue des données XPS

	RM1-MA2400		RM1-MA1200		RM1-MA10		RM1-MA0	
	EL (FWMH)	% at.	EL (FWMH)	% at.	EL (FWMH)	% at.	EL (FWMH)	% at.
C1s C-C	285,0 (1,3)	30,3	285,0 (1,3)	11,2	285,0 (1,3)	30,9	285,0 (1,3)	34,6
C1s C-OH	286,6 (1,1)	4,7	286,5 (1,9)	10,8	286,5 (1,3)	7,4	286,6 (1,0)	5,4
C1s O-C-O	288,8 (1,3)	5,9	288,5 (1,5)	5,0	288,5 (1,5)	14,9	288,6 (1,5)	13,8
%atomique carbone		**40,9**		**27,0**		**53,2**		**53,8**
O1s O-Fe	530,3 (1,2)	26,5	530,1 (1,3)	37,1	529,9 (1,2)	5,8	530,2 (1,3)	7,2
O1s O-C-O	531,5 (1,6)	10,1	531,4 (1,2)	10,1	531,5 (1,4)	20,7	531,5 (1,3)	18,3
O1s C-OH	532,9(1,8)	3,6	532,7 (1,8)	3,2	532,6 (1,8)	7,1	532,5 (1,6)	6,0
%atomique oxygène		**40,2**		**50,4**		**33,6**		**31,5**
Fe2p 3/2 Fe2+	709,4 (2,0)	1,3	709,4 (2,0)	1,7	709,4 (1,6)	0,7	709,4 (2,2)	0,7
Fe2p 3/2 Fe3+ O	710,8(2,2)	4,7	710,6 (2,0)	5,3	710,7 (2,2)	1,2	710,9 (2,4)	1,9
Fe2p 3/2 Fe3+ T	712,5 (2,2)	2,3	712,3 (2,2)	3,7	712,6 (2,2)	0,6	713,1 (2,8)	1,1
Fe2p 3/2 Fe2+ sat	715,2 (3,2)	0,6	714,8 (2,3)	0,7	715,2 (3,8)	0,3	715,3 (5,0)	0,2
Fe2p 3/2 Fe3+ sat	719,4 (3,6)	1,1	719,2 (4,0)	1,5	718,8 (4,0)	0,3	719,3 (4,1)	0,4
Fe2p 1/2 Fe2+	722,6 (2,2)	0,6	722,6 (1,9)	0,8	722,8 (3,2)	0,5	723,0 (2,2)	0,4
Fe2p 1/2 Fe3+ O	724,2 (2,3)	2,3	724,1 (2,2)	2,7	724,0 (3,2)	0,6	724,4 (2,8)	0,9
Fe2p 1/2 Fe3+ T	726,2 (2,2)	1,1	725,8 (2,8)	1,8	725,9 (3,4)	0,3	726,6 (2,9)	0,5
Fe2p 1/2 Fe2+ sat	728,0 (3,7)	1	727,8 (3,9)	1,5	727,8 (3,2)	0,2	729,2 (2,3)	0,2
Fe2p 1/2 Fe3+ sat	732,3 (4,6)	1,3	732,5 (4,9)	1,7	732,2 (3,4)	0,1	732,5 (4,4)	0,3
%atomique fer		**16,3**		**21,4**		**4,8**		**6,6**
Cl2p 3/2	200,5(1,3)	1,0	-	-	198,4 (1,2)	2,3	198,6 (1,2)	2,5
Cl2p ½	202,2 (1,6)	0,7	-	-	200,0 (1,2)	1,2	200,2 (1,3)	1,4
%atomique chlore		**1,7**				**3,5**		**3,9**
Na1s	1073,7 (1,4)	0,9	1071,5 (1,6)	1,2	1071,2 (1,4)	5,0	1071,6 (1,7)	4,2
%atomique sodium		**0,9**		**1,2**		**5,0**		**4,2**

Tableau A.3 Quantification élémentaire des échantillons RM1-MAy (avec y = 0, 10, 1200 et 2400 secondes) réalisée à partir des spectres XPS de ces échantillons. Les énergies de liaison E_L et largeurs à mi-hauteur (FWHM) sont exprimées en eV.

Références bibliographiques – Annexes :

1. Malvern Instruments. *Zetasizer Nano Series User Manual*. **1.1,** (2004).
2. K.Cenzual, P. V. *Pearson's Crystal Data : Crystal structure Database for inorganic compounds (On DVD)*. (ASM International, 2016).
3. Ramos Guivar, J. A., Sanches, E. A., Bruns, F., Sadrollahi, E., Morales, M. A., López, E. O. & Litterst, F. J. Vacancy ordered γ-Fe_2O_3 nanoparticles functionalized with nanohydroxyapatite: XRD, FTIR, TEM, XPS and Mössbauer studies. *Appl. Surf. Sci.* **389,** 721–734 (2016).
4. Saikia, C., Das, M. K., Ramteke, A. & Maji, T. K. Effect of crosslinker on drug delivery properties of curcumin loaded starch coated iron oxide nanoparticles. *Int. J. Biol. Macromol.* **93,** 1121–1132 (2016).
5. Sreeja, V., Jayaprabha, K. N. & Joy, P. A. Water-dispersible ascorbic-acid-coated magnetite nanoparticles for contrast enhancement in MRI. *Appl. Nanosci.* **5,** 435–441 (2015).
6. Mascolo, M. C., Pei, Y. & Ring, T. A. Room Temperature Co-Precipitation Synthesis of Magnetite Nanoparticles in a Large pH Window with Different Bases. *Materials* **6,** 5549–5567 (2013).
7. El Ghandoor, H., Zidan, H. M., Khalil, M. M. H. & Ismail, M. I. M. Synthesis and Some Physical Properties of Magnetite (Fe_3O_4) Nanoparticles. *Int. J. Electrochem. Sci.* **7,** 5734–5745 (2012).
8. Herve, K., Douziech-Eyrolles, L., Munnier, E., Cohen-Jonathan, S., Souce, M., Marchais, H., Limelette, P., Warmont, F., Saboungi, M. L., Dubois, P. & Chourpa, I. The development of stable aqueous suspensions of PEGylated SPIONs for biomedical applications. *Nanotechnology* **19,** 465608 (2008).
9. Drbohlavova, J., Hrdy, R., Adam, V., Kizek, R., Schneeweiss, O. & Hubalek, J. Preparation and Properties of Various Magnetic Nanoparticles. *Sensors* **9,** 2352–2362 (2009).
10. Fazilati, M. Folate decorated magnetite nanoparticles: Synthesis and targeted therapy against ovarian cancer. *Cell Biol. Int.* **38,** 154–163 (2014).
11. Zablotskaya, A., Segal, I., Lukevics, E., Maiorov, M., Zablotsky, D., Blums, E., Shestakova, I. & Domracheva, I. Water-soluble magnetic nanoparticles with biologically active stabilizers. *J. Magn. Magn. Mater.* **321,** 1428–1432 (2009).
12. Jafari, A., Shayesteh, S. F., Salouti, M. & Boustani, K. Effect of annealing temperature on magnetic phase transition in Fe_3O_4 nanoparticles. *J. Magn. Magn. Mater.* **379,** 305–312 (2015).
13. Zhu, D., Liu, F., Ma, L., Liu, D. & Wang, Z. Nanoparticle-Based Systems for T-1-Weighted Magnetic Resonance Imaging Contrast Agents. *Int. J. Mol. Sci.* **14,** 10591–10607 (2013).
14. Linh, P. H., Thach, P. V., Tuan, N. A., Thuan, N. C., Manh, D. H., Phuc, N. X. & Hong, L. V. Magnetic fluid based on Fe_3O_4 nanoparticles: Preparation and hyperthermia application. *J. Phys. Conf. Ser.* **187,** 012069 (2009).
15. Nedkov, I., Vanderberghe, R. E., Vissokov, G., Merodiiska, T., Kolev, S. & Krezhov, K. Phase and structural particularities of nanosized granular inverse spinels. *Phys. Status Solidi A* **201,** 1001–1010 (2004).
16. Baaziz, W., Pichon, B. P., Fleutot, S., Liu, Y., Lefevre, C., Greneche, J.-M., Toumi, M., Mhiri, T. & Begin-Colin, S. Magnetic Iron Oxide Nanoparticles: Reproducible Tuning of the Size and Nanosized-Dependent Composition, Defects, and Spin Canting. *J. Phys. Chem. C* **118,** 3795–3810 (2014).
17. Barick, K. C., Aslam, M., Lin, Y.-P., Bahadur, D., Prasad, P. V. & Dravid, V. P. Novel and efficient MR active aqueous colloidal Fe_3O_4 nanoassemblies. *J. Mater. Chem.* **19,** 7023–7029 (2009).

18. Salas, G., Casado, C., Teran, F. J., Miranda, R., Serna, C. J. & Puerto Morales, M. Controlled synthesis of uniform magnetite nanocrystals with high-quality properties for biomedical applications. *J. Mater. Chem.* **22,** 21065–21075 (2012).
19. Lu, X., Jiang, R., Yang, M., Fan, Q., Hu, W., Zhang, L., Yang, Z., Deng, W., Shen, Q., Huang, Y., Liu, X. & Huang, W. Monodispersed grafted conjugated polyelectrolyte-stabilized magnetic nanoparticles as multifunctional platform for cellular imaging and drug delivery. *J. Mater. Chem. B* **2,** 376–386 (2014).
20. Daou, T. J., Pourroy, G., Begin-Colin, S., Greneche, J. M., Ulhaq-Bouillet, C., Legare, P., Bernhardt, P., Leuvrey, C. & Rogez, G. Hydrothermal synthesis of monodisperse magnetite nanoparticles. *Chem. Mater.* **18,** 4399–4404 (2006).
21. Ge, S., Shi, X., Sun, K., Li, C., Uher, C., Baker, J. R., Holl, M. M. B. & Orr, B. G. Facile Hydrothermal Synthesis of Iron Oxide Nanoparticles with Tunable Magnetic Properties. *J. Phys. Chem. C* **113,** 13593–13599 (2009).
22. Cai, W. & Wan, J. Facile synthesis of superparamagnetic magnetite nanoparticles in liquid polyols. *J. Colloid Interface Sci.* **305,** 366–370 (2007).
23. Arndt, D., Zielasek, V., Dreher, W. & Baeumer, M. Ethylene diamine-assisted synthesis of iron oxide nanoparticles in high-boiling polyolys. *J. Colloid Interface Sci.* **417,** 188–198 (2014).
24. Sciancalepore, C., Rosa, R., Barrera, G., Tiberto, P., Allia, P. & Bondioli, F. Microwave-assisted nonaqueous sol-gel synthesis of highly crystalline magnetite nanocrystals. *Mater. Chem. Phys.* **148,** 117–124 (2014).
25. HongZhang, Q., Biao, Y., ChengKui, L. & Wei, L. Synthesis and characterization of water-soluble magnetite nanocrystals via one-step sol-gel pathway. *Sci. China-Phys. Mech. Astron.* **54,** 1239–1243 (2011).
26. Lemine, O. M., Omri, K., Zhang, B., El Mir, L., Sajieddine, M., Alyamani, A. & Bououdina, M. Sol-gel synthesis of 8 nm magnetite (Fe_3O_4) nanoparticles and their magnetic properties. *Superlattices Microstruct.* **52,** 793–799 (2012).
27. Hasanpour, A., Niyaifar, M., Asan, M. & Amighian, J. Synthesis and characterization of Fe_3O_4 and ZnO nanocomposites by the sol-gel method. *J. Magn. Magn. Mater.* **334,** 41–44 (2013).

Curriculum vitae

Communications scientifiques et publications

Communications scientifiques orales :

5. Magnetic characterization of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. P. Venturini, J-C. Dupin, H. Martinez, T. Hauet, F. Cleymand, S. Fleutot. Colloque « What about magnetism ? » Faculté des Sciences et Technologies – Vandoeuvre-lès-Nancy, France (3 octobre 2017).

4. Elaboration, functionalization and characterization of inorganic nanoparticles for biomedical applications. S. Fleutot, P. Venturini, D. Rouxel, H. Martinez, J-C Dupin, F. Cleymand. 4th USM-UL Colloquium – Penang, Malaysia (17-19th January 2017).

3. Elaboration and characterization of water soluble capped superparamagnetic iron oxide nanoparticles. P. Venturini, J-C. Dupin, H. Martinez, C. Carteret, B. Malaman, T. Hauet, F. Cleymand, S. Fleutot. Chemical Physics Conference 2016 – Nancy, France (17-20 octobre 2016).

2. Caractérisation magnétique de nanoparticules d'oxyde de fer pour utilisation biomédicale. P. Venturini, J-C. Dupin, H. Martinez, T. Hauet, F. Cleymand, S. Fleutot. Journée annuelle CC Magnétisme Institut Jean Lamour UMR CNRS UL 7198 – Nancy, France (7 octobre 2015).

1. Synthèse et caractérisation physico-chimique de nanoparticules d'oxydes de fer magnétiques. P. Venturini, J-C. Dupin, H. Martinez, F. Cleymand, S. Fleutot. 2nde Journée Scientifique « Matériaux et Vivant » **-** Nancy, France (13 novembre 2014).

Communications scientifiques par affiche :

5. Synthesis and Physicochemical Characterization of TiO_2 Nanoparticles for Toxicological studies. S. Fleutot, D. Rouxel, P. Venturini, C. Thevenot, S. Fontana, C. Carteret, C. Fontana, Y. Guichard. C. Fontana, Y. Guichard, C. Darne, S. Binet. Chemical Physics Conference 2016 – Nancy, France (17-20 octobre 2016).

4. Caractérisation physico-chimique et structurale de nanoparticules d'oxydes de fer fonctionnelles. P. Venturini, J-C. Dupin, H. Martinez, B. Malaman, T. Hauet, C. Carteret, F. Cleymand, S. Fleutot. Ecole thématique OXYFUN - Carry-le-Rouet, France (25-30 septembre 2016).

3. Influence of the synthesis parameters in the development of magnetic nanoparticles for biomedical applications. P. Venturini, M. François, C. Carteret, H. Martinez, J-C. Dupin, F. Cleymand, S. Fleutot. DocSciLor – Nancy (june 2015).

2. Influence of the synthesis parameters in the development of magnetic nanoparticles for biomedical applications. P. Venturini, M. François, C. Carteret, H. Martinez, J-C. Dupin, F. Cleymand, S. Fleutot. SFNano – Nancy, France (9-12 novembre 2014).

1. A study of inorganic complexes precursors for nanoparticles synthesis. P.Venturini, L. Aranda, G. Venturini, B. Malaman, H. Martinez, J-C. Dupin, F. Cleymand, S. Fleutot. SFNano – Nancy, France (9-12 novembre 2014).

Publications :

3. Facile one-step synthesis of polyoxazoline coated iron oxide nanoparticles. P. Venturini, S. Fleutot, J-C. Dupin, J. Ghanbaja, H. Martinez, F. Cleymand, V. Lapinte. *Belstein Journal of Nanotechnology (soumise).*

2. Study of the ligand addition parameters on size and aggregation of water dispersible citrate coated superparamagnetic iron oxide nanoparticles. P. Venturini, J-C. Dupin, H. Martinez, T. Hauet, C. Carteret, B. Malaman, F. Cleymand, S. Fleutot. *Advanced powder Technology (soumise).*

1. "Elaboration of Hydroxyapatite nanoparticles and - chitosan-Hydroxyapatite composites: a Present Status". D. Boudemagh, P. Venturini, S. Fleutot, F. Cleymand. *Polymer Bulletin (acceptée avec révisions mineures).*

Activités d'enseignement :

- **Doctorant contractuel chargé d'enseignement (DCCE)** 2014-2017.

192 heures équivalentes TD effectuées au sein de la Faculté des Sciences et Technologies (FST) de Vandœuvre-lès-Nancy :

- Méthodologie expérimentale en chimie

- Dépôts chimiques par voie liquide

- Travaux pratiques de Corrosion

- Chimie minérale

- Chimie expérimentale

Responsabilités électives :

- Élu du collège doctorant au **conseil du pôle scientifique « Matière, Matériaux, Métallurgie, Mécanique (M4) »** de l'Université de Lorraine – 2015-2017.

- Élu du collège doctorant au **conseil de laboratoire de l'Institut Jean Lamour** (IJL) – 2016-2017.

Depuis quelques décennies, les nanomatériaux et tout particulièrement les nanoparticules d'oxyde de fer (magnétite/maghémite) superparamagnétiques ont connus un intérêt croissant en nano-médecine. Leur biocompatibilité et leurs propriétés magnétiques permettent notamment leur utilisation à des fins de diagnostic (IRM, Imagerie optique et nucléaire…) et de thérapie (Hyperthermie, nano vectorisation…).
Au cours de cette thèse, la première étape a consisté à étudier en détails l'influence de plusieurs paramètres de synthèse sur les propriétés finales des nanoparticules d'oxyde de fer magnétique. Cette étude avait pour but de développer et d'optimiser une méthode de synthèse dérivée de la méthode de synthèse classique dite de co-précipitation mais modifiée par ajout de ligand citrates au cours de la synthèse. Des nanoparticules d'oxyde de fer d'une taille pouvant être contrôlée entre 4 et 13 nm recouvertes par une couronne de ligands citrates ont ainsi été synthétisées, celles-ci présentent une aimantation à saturation atteignant jusqu'à 75 emu/g d'oxyde de fer qui est une valeur particulièrement haute pour des nanoparticules de cette taille. Tout au long de ce travail, la caractérisation de ces nanoparticules par un panel étendu de techniques (MET, DRX, Mössbauer, IRTF, XPS, mesures magnétiques, DLS …) à permis notamment d'étudier de façon précise les relations existantes entre la taille, le taux de ligand, la composition et les propriétés magnétiques des nanoparticules synthétisées.
Ces nanoparticules fonctionnalisées par des citrates ont ensuite été testées en milieu biologique afin d'évaluer leur internalisation dans les cellules et leur cytotoxicité.
Dans un deuxième temps, d'autres travaux ont été menés sur les nanoparticules d'oxyde de fer. Notamment le remplacement des ligands citrates par un polymère bio-inspiré pouvant, selon les fonctions chimiques qui lui sont adjointes, avoir de multiples applications dans le domaine biomédical.

Mots-clés : Nanoparticules hybrides, magnétite, maghémite, co-précipitation, IRM, biomédical.

From decades now, nanomaterials and especially superparamagnetic iron oxide nanoparticles are studied for their numerous applications in nanomedecine area. The biocompatibility and the magnetic properties of such nano-objects allow their utilization for diagnostic (MRI, optical imagery, PET…) and for therapy application (nanovectorization, hyperthermia…)
During this thesis work, the first step was to study the influence of several synthesis parameters on the final properties of the magnetic iron oxide nanoparticles. The aim of this study was the development and the optimization of the widely used way of synthesis by co-precipitation modified by a ligand addition during the growth step of the synthesis. Citrate capped iron oxide nanoparticles with a controlled size between 4 and 13 nm have been synthesized, the saturation magnetization of these nanoparticles reach 75 emu/g of iron oxide, this value is particularly high for nanoparticles of such sizes. During this work, the large panel of characterizations performed on these nanoparticles (TEM, XRD, Mössbauer, FTIR, XPS, DLS, Magnetic measurement) allowed to study precisely the relations between size, ligand ratio, composition and magnetic properties of the synthesized nanoparticles.
The interaction between the synthesized citrate capped nanoparticles and biological materials such as human cells have been investigated in-vitro notably to evaluate cells internalization and citotoxicity.
In a second step, some additional works have been performed on the citrate capped iron oxide nanoparticles in order to replace the citrate ligand by a bio-inspired polymer (poly-oxazoline). This polymer can have multiple biomedical applications depending of the pendent chemical groups that have been fixed on it.

Key-words: Hybrids nanoparticles, magnetite, maghemite, co-precipitation synthesis, MRI contrast agents, biomedical applications.