

# THESE

Présenté par

**Brice BASLY**

pour obtenir le grade de

**Docteur de l'Université de Strasbourg**

Spécialité : Physique et Chimie-Physique



## **CONCEPTION ET CARACTERISATION DE NANO- OBJETS MAGNETIQUES POUR L'IMAGERIE PAR RESONANCE MAGNETIQUE (IRM)**

Soutenance le 14 décembre 2010 à Strasbourg

### **Membre du Jury :**

<b>Rapporteur:</b>	<b>Pr. Nadine Millot, Professeur, CNRS-ICB, Dijon.</b>
<b>Rapporteur :</b>	<b>Dr. Anne-Marie Caminade, Directrice de recherche, CNRS-LCC, Toulouse.</b>
<b>Examineur :</b>	<b>Pr. Pierre Schaaf, Professeur, CNRS-ICS, Strasbourg.</b>
<b>Examineur :</b>	<b>Pr. Olivier Tillement, Professeur, CNRS-LPCM, Lyon.</b>
<b>Invités :</b>	<b>Pr. Pascal Perriat, Professeur, INSA, Lyon.</b>
<b>Invités :</b>	<b>Dr. Claire Billotey, Docteur, CREATIS-LRMN, Lyon.</b>
<b>Directrice de Thèse :</b>	<b>Pr. Sylvie Begin-Colin, Professeur, UDS-IPCMS, Strasbourg.</b>
<b>Directrice de Thèse :</b>	<b>Dr. Delphine Felder-Flesch, Chargée de recherche, CNRS-IPCMS, Strasbourg.</b>

*Institut de Physique et Chimie des Matériaux de Strasbourg  
23 rue du Loess, BP 43, 67034 STRASBOURG Cedex 2*

*Je dédie ce manuscrit à ma compagne Laetitia sans qui je n'aurai pas eu le courage et la force d'aller au bout de ce travail.*

# REMERCIEMENTS

---

Les travaux présentés dans ce manuscrit n'auraient jamais pu voir le jour sans l'aide précieuse de nombreuses personnes. Ils ont été réalisés au sein de l'Institut de Physique et de Chimie de Matériaux de Strasbourg (IPCMS) à l'Université de Strasbourg. Je remercie sincèrement le Directeur de l'institut, Monsieur Marc Drillon de m'avoir accueilli dans son laboratoire et permis de réaliser une recherche de qualité avec les outils puissants mis à disposition et les très grandes compétences scientifiques, multi et interdisciplinaires, de son personnel.

Je remercie également Madame Geneviève POURROY, responsable du Département de Chimie des Matériaux Inorganiques, et Monsieur Jean-Louis Gallani, responsable du Département des Matériaux Organiques, de m'avoir accueilli au sein de leurs groupes respectifs.

Je tiens à exprimer ma grande gratitude à Madame Sylvie Begin-Colin et Madame Delphine Felder-Flesch, pour avoir dirigé ce travail et pour m'avoir confié ce sujet de thèse. J'aimerais leur exprimer ma reconnaissance pour leurs aides précieuses, leurs intérêts et leurs disponibilités. Toutes leurs compétences, leurs qualités humaines, leurs optimismes m'ont été d'un grand soutien au cours de ces trois années de thèse.

Je tiens à remercier les membres de mon jury de thèse, Mme Nadine Millot, Professeur à l'Université de Bourgogne, Mme Anne-Marie Caminade, directrice de Recherche CNRS au Laboratoire de Chimie de Coordination de Toulouse, Mr Pierre Schaaf, Professeur à l'Université de Strasbourg, Mr Olivier Tillement, Professeur à l'Université Claude Bernard de Lyon, Mr Pascal Perriat, Professeur à l'INSA de Lyon et Mme Claire Billotey, Médecin à l'hôpital Edouard Herriot et au laboratoire CREATIS-LRMN de Lyon.

Je remercie également le Pr. Pascal Perriat et Leandro-Carlos Figueiredo, du Groupe d'Etudes de Métallurgie Physique et de Physique des Matériaux de l'INSA de Lyon) pour leur accueil, leur investissement et l'aide qu'ils m'ont procurée, ainsi que pour les mesures de relaxation. Je remercie également le Dr. Claire Billotey, du Laboratoire CREATIS-LRMN pour son accueil et pour tous les travaux réalisés en IRM, *in vitro* et *in vivo*.

Je désire témoigner toute ma gratitude au Dr. Jean-Marc Grenèche, Directeur de recherche CNRS au LPEC de l'Université du Maine, pour les caractérisations par spectrométrie Mössbauer ; au Dr Hervé Martinez, Professeur à l'IPREM de Pau, pour les caractérisations par photo-émission X (XPS) ; à Jacqueline Taleb et Aurélie Berniard de l'équipe de Claire Billotey au laboratoire CREATIS-LRMN pour les mesures IRM et les tests biologiques. Je les remercie pour tout le temps passé sur mes échantillons ainsi que sur l'interprétation des résultats.

Je voudrais remercier l'ensemble des personnes de l'IPCMS et surtout celles des départements de Chimie des Matériaux Inorganiques et de Matériaux Organiques avec lesquelles j'ai pu passer ces années qui n'auraient pas été ce qu'elles ont été sans elles : les Emilie's, Nicolas B, les Benoit's, Cédric, Cyril, Didier, Corinne, Alain, Driss, Céline, Christophe, François, Guillaume, Sylvie, Rose-Marie et tous les autres.

Je voudrais remercier également Hind Mamlouk, Marie Kueny-Stotz et Cynthia Ghobril pour leur aide et les conseils précieux qu'elles m'ont donnés en synthèse organique.

Je remercie également très chaleureusement tous les stagiaires, thésards et post doctorants qui ont su me supporter, me soutenir, me guider : Alexandre, Virginie, Julien, Pierre Olivier, Romain, Guillaume, Hakam, Lai, Séraphin, Walid, Laurent, Ezeddine, Solenne, Williams, Alfonso, Benjamin, Arnaud, les Nicolas's (les petits, les grands), Morgan, Herrade, Paulin, Christophe, Annabelle, Matthias, Laureen, Julie, Emilie, Geoffrey, Brice, Guiseppe, Axelle et tous les autres.

Mes dernières pensées vont à ma famille, mes amis de Bordeaux, mes amis de mon ancienne promo et surtout à ma compagne Laetitia pour leurs encouragements et leur soutien.



# SOMMAIRE

---

<b>INTRODUCTION GENERALE</b> -----	<b>0</b>
<b>CHAPITRE I : BIBLIOGRAPHIE</b> -----	<b>6</b>
<b>1 LES NANOPARTICULES D'OXYDE DE FER MAGNETIQUES : PROPRIETES ET SYNTHESSES</b> -----	<b>8</b>
<b>1.1 Propriétés générales des oxydes de fer magnétiques</b> -----	<b>8</b>
1.1.1 Structures cristallines et caractérisations de la magnétite et de la maghémite -----	8
1.1.2 Structure magnétique de la maghémite et de la magnétite -----	11
1.1.3 Effet de la taille des nanoparticules sur les propriétés magnétiques de la magnétite et de la maghémite	13
<b>1.2 Principales voies de synthèse des nanoparticules d'oxyde de fer magnétiques</b> -----	<b>14</b>
1.2.1 Les principales méthodes de synthèses existantes -----	14
1.2.2 Les voies de synthèses retenues-----	15
A. La co-précipitation-----	15
B. La décomposition thermique -----	19
<b>1.3 Conclusion</b> -----	<b>21</b>
<b>2 LA FONCTIONNALISATION DES NANOPARTICULES D'OXYDE DE FER</b> -----	<b>23</b>
<b>2.1 Stabilité des nanoparticules en suspensions</b> -----	<b>23</b>
<b>2.2 Fonctionnalisation des nanoparticules dans le domaine biomédical</b> -----	<b>25</b>
2.2.1 Fonctionnalisation suivant la méthode de synthèse des nanoparticules -----	26
2.2.2 Modes d'interaction des molécules avec la surface des nanoparticules -----	26
2.2.3 Les principales molécules greffées -----	28
2.2.4 Les dendrons étudiés -----	29
<b>2.3 Conclusion</b> -----	<b>30</b>
<b>3 L'IRM ET LES AGENTS DE CONTRASTE</b> -----	<b>31</b>
<b>3.1 Historique sur L'IRM</b> -----	<b>31</b>
<b>3.2 Les agents de contraste en IRM</b> -----	<b>32</b>
3.2.1 Les temps de relaxation et l'imagerie IRM -----	33
3.2.2 La relaxation longitudinale -----	33
3.2.3 La relaxation transversale-----	34
3.2.4 La conception de l'image -----	34
3.2.5 La relaxivité ou taux de relaxation-----	35
<b>3.3 Les deux types d'agents de contraste</b> -----	<b>35</b>
3.3.1 Les agents de contraste positifs (paramagnétiques)-----	36
3.3.2 Les agents de contraste négatifs (superparamagnétiques)-----	36
A. Le mécanisme -----	37
B. La relaxation superparamagnétique-----	37
C. Problématique sur la conception du cœur-----	39

D.	Problématique sur la fonctionnalisation des nanoparticules -----	40
E.	Les agents de constats négatifs actuellement développés -----	40
	Quelques performances d'agents cités dans la littérature-----	42
<b>3.4</b>	<b>Conclusion -----</b>	<b>43</b>
<b>4</b>	<b>BILAN : CADRE DE LA THESE -----</b>	<b>44</b>
<b>4.1</b>	<b>Contexte de l'étude -----</b>	<b>44</b>
<b>4.2</b>	<b>Objectifs des travaux-----</b>	<b>45</b>
A.	Premiers objectifs : optimisation du greffage du dendron ANA à la surface des nanoparticules synthétisées par co-précipitation et synthèse de nouveaux dendrons -----	45
B.	Seconds objectifs : greffage des dendrons sur des nanoparticules synthétisées par deux méthodes -----	46
C.	Derniers objectifs : étude préliminaire sur les potentialités de ces nano-objets comme agents de contraste pour l'IRM-----	46
	 <b>CHAPITRE II : SYNTHÈSE ET CARACTÉRISATIONS DES NANOPARTICULES-----</b>	<b>48</b>
<b>1</b>	<b>LA SYNTHÈSE DES NANOPARTICULES -----</b>	<b>50</b>
<b>1.1</b>	<b>Les synthèses et les caractérisations des nanoparticules -----</b>	<b>50</b>
1.1.1	La synthèse par co-précipitation -----	50
	Le protocole-----	50
1.1.2	La synthèse par décomposition thermique et la sélection de taille par précipitation -----	51
	La synthèse-----	51
	Le procédé de sélection de taille par précipitation (SSP) -----	52
<b>1.2</b>	<b>Caractérisation des nanoparticules obtenues par les deux méthodes -----</b>	<b>53</b>
1.2.1	Caractérisations structurales et morphologiques -----	53
A.	Analyses structurales -----	53
	MET -----	53
	Spectroscopie infrarouge (IR) -----	54
	La diffraction des rayons X (DRX) -----	55
	Spectrométrie Mössbauer -----	57
B.	Analyses morphologiques -----	61
	Diffraction des RX -----	61
	MET -----	61
	Surface spécifique (BET)-----	63
	Bilan -----	64
1.2.2	Caractérisation de surface-----	64
	Spectroscopie infrarouge -----	64
	Analyse thermogravimétrique sous air (ATG) -----	65
1.2.3	Stabilité colloïdale des nanoparticules -----	66
	Mesures de potentiel zêta en fonction du pH-----	66
	Mesures granulométriques par DLS-----	67
1.2.4	Analyse des propriétés magnétiques-----	68
	Courbes ZFC/FC -----	68
	Cycles d'aimantation-----	69
<b>1.3</b>	<b>Conclusion -----</b>	<b>73</b>

## **2 LES DENDRONS : SYNTHÈSE ET CARACTÉRISATION-----74**

<b>2.1 La synthèse des dendrons -----</b>	<b>74</b>
2.1.1 Le dendron de départ : ANA -----	74
Greffage des chaînes TEG -----	75
Formation du groupement phosphonate -----	76
2.1.2 Les dendrons fonctionnalisés en périphérie: : ANACOOH et ANANH <sub>2</sub> -----	76
A. Le composé intermédiaire -----	76
Protection sélective de la position para du cœur aromatique et greffage des chaînes TEG-----	77
Formation du groupement phosphonate d'éthyle-----	77
B. La finalisation : ANACOOH -----	78
C. La finalisation : ANANH <sub>2</sub> -----	79
<b>2.2 Caractérisations des molécules obtenues -----</b>	<b>80</b>
2.2.1 RMN du proton -----	80
2.2.2 Spectroscopie Infrarouge -----	81
Les bandes du groupement phosphonate -----	83
<b>2.3 Conclusion -----</b>	<b>85</b>

## **CHAPITRE III : FONCTIONNALISATION DES NANOPARTICULES-----86**

### **1 FONCTIONNALISATION DES NANOPARTICULES SYNTHÉTISÉES PAR CO-PRECIPITATION -----88**

<b>1.1 Greffage du dendron ANA : travaux antérieurs (NPSco@ANA)-----</b>	<b>88</b>
Le protocole (méthode A)-----	88
Les résultats-----	89
Bilan et problématique-----	90
<b>1.2 Greffage du dendron ANA : optimisation du taux de greffage et de la stabilité des suspensions-----</b>	<b>90</b>
1.2.1 Première approche : utilisation d'un solvant organique -----	90
Bilan -----	92
1.2.2 Seconde approche : favoriser la dispersion (méthode B)-----	92
A. Expériences réalisées dans le THF-----	93
B. Expériences réalisées dans l'eau -----	94
C. Bilan-----	95
1.2.3 Troisième approche : greffage dans l'eau en ajustant le pH (méthode B/pHréa)-----	95
A. Evolution du taux de greffage en fonction du pH et de la température -----	96
Hypothèse et conditions de greffage -----	96
Le protocole (méthode B/pHréa) -----	96
Les expériences-----	97
Détermination des taux de greffage -----	98
Stabilité colloïdale des nanoparticules dendronisées -----	100
Bilan -----	101
B. Isotherme d'adsorption à pH constant-----	102
Le protocole (méthode B/pHréa op) -----	102
Les taux de greffage-----	104
1.2.4 Caractérisations des nanoparticules fonctionnalisées élaborées pour construire l'isotherme d'adsorption	108

A.	Stabilité colloïdale des nanoparticules dendronisées -----	108
	Mesures de potentiel zêta en fonction du pH-----	108
	Mesures granulométriques -----	109
B.	Caractérisation de surface des nanoparticules dendronisées -----	110
	MET -----	110
	Spectroscopie infrarouge -----	110
	Photoémission X (XPS) -----	112
C.	Analyses structurales des nanoparticules dendronisées -----	116
	Diffraction des RX -----	116
	Spectrométrie Mössbauer -----	116
D.	Analyse des propriétés magnétiques des nanoparticules dendronisées -----	118
	Cycle d'aimantation-----	118
	Courbes ZFC/FC -----	120
E.	Bilan -----	121
1.2.5	Conclusions sur les meilleures conditions de greffage direct-----	121
<b>1.3</b>	<b>Greffage des dendrons ANACOOH et ANANH2-----</b>	<b>122</b>
1.3.1	Détermination des conditions de greffage -----	122
A.	Le protocole de greffage des dendrons ANACOOH et ANANH2-----	123
	Les taux de greffage-----	124
B.	Stabilité colloïdale des nanoparticules dendronisées -----	124
	Mesures de potentiel zêta en fonction du pH-----	124
	Mesures granulométriques.-----	125
C.	Spectres infrarouges des nanoparticules dendronisées avec les dendrons ANACOOH et ANANH2	126
D.	Bilan-----	127
<b>1.4</b>	<b>Conclusion -----</b>	<b>128</b>
<b>2</b>	<b>FONCTIONNALISATION DES NANOPARTICULES</b>	
	<b>SYNTHETISEES PAR DECOMPOSITION THERMIQUE -----</b>	<b>129</b>
<b>2.1</b>	<b>Premiers travaux : échange direct dans le THF des molécules d'acide oléique par les dendrons ANA -----</b>	<b>129</b>
A.	Le protocole (méthode EL.THF)-----	129
B.	Stabilité colloïdales des nanoparticules dendronisées -----	131
C.	Bilan-----	133
<b>2.2</b>	<b>Procédé d'échange de ligands avec transfert de phase -----</b>	<b>133</b>
2.2.1	Transfert de phase des NPStd@OA avec les trois dendrons-----	134
A.	Le protocole (méthode TR)-----	134
	Taux de greffage-----	135
B.	Stabilité colloïdale des suspensions de nanoparticules dendronisées NPStd@ANA et NPStd@ANACOOH-----	135
C.	Caractérisations de surface des nanoparticules dendronisées NPStd@ANA et NPStd@ANACOOH-----	136
	MET -----	136
	Analyse thermogravimétrique sous air-----	137
	Spectroscopie infrarouge -----	138
	Photoémission X -----	140
D.	Analyse structurale des nanoparticules dendronisées-----	142
	Diffraction des RX -----	142
	Spectrométrie Mössbauer -----	142
E.	Analyse des propriétés magnétiques des nanoparticules dendronisées -----	144

F. Bilan -----	145
<b>2.3 Application de ce protocole d'échange de ligands et transfert de phase aux nanoparticules synthétisées par co-précipitation -----</b>	<b>145</b>
2.3.1 Le protocole -----	146
A. Le greffage des molécules d'acide oléique à la surface des nanoparticules synthétisées par co-précipitation (NPSco) -----	146
B. Le transfert de phase (méthode TR) -----	147
2.3.2 Caractérisation des nanoparticules dendronisées -----	148
A. Stabilité colloïdale des nanoparticules dendronisées -----	148
B. Spectre Infrarouge des NPSco@ANA (EL) -----	149
2.3.3 Bilan -----	149
<b>2.4 Conclusion -----</b>	<b>149</b>
<b>3 TABLEAU RECAPITULATIF DES PROPRIETES DES NANOPARTICULES AVANT ET APRES GREFFAGE DES DENDRONS ET SELON LEUR METHODE DE SYNTHESE -----</b>	<b>151</b>
<b>CHAPITRE IV : APPLICATIONS POTENTIELLES DANS LE DOMAINE BIOMEDICAL -----</b>	<b>154</b>
<b>1 LES MESURES DE RELAXIVITE ET LES FANTÔMES -----</b>	<b>156</b>
<b>1.1 Les mesures de temps de relaxation à 1,5 T -----</b>	<b>156</b>
Le protocole -----	156
1.1.1 Les mesures de relaxivité -----	157
1.1.2 Interprétation des résultats -----	159
1.1.3 Bilan -----	159
<b>1.2 Les fantômes et les temps de relaxation à 7 T -----</b>	<b>160</b>
Protocole -----	160
1.2.1 Les mesures -----	160
1.2.2 Interprétation des résultats -----	161
1.2.3 Mesure de relaxation à 7 T in vitro -----	163
<b>1.3 Conclusion -----</b>	<b>163</b>
<b>2 STABILITE DANS LES MILIEUX PHYSIOLOGIQUE ET TESTS IN VIVO -----</b>	<b>165</b>
<b>2.1 Stabilité dans les milieux physiologiques -----</b>	<b>165</b>
2.1.1 Les premières expériences avec les suspensions de NPSco@ANA -----	165
Protocole -----	165
Les expériences -----	166
2.1.2 La deuxième série de tests sur une plus large gamme de suspensions de nanoparticules dendronisées	168
2.1.3 Bilan -----	169
<b>2.2 Les tests de toxicité et les premières images IRM -----</b>	<b>170</b>
2.2.1 Les tests de toxicité et d'internalisation cellulaire -----	170
A. Les premiers essais sur des cellules de rats avec les suspensions de NPSco@ANA. -----	170
Protocole -----	170

Les comptes-----	171
B.    Les autres essais sur des cellules d'origine humaine avec des suspensions de NPSco@ANA, NPSco@ANACOOH, NPStd@ANA et NPStd@ANACOOH -----	171
C.    Autres observations in vivo-----	172
D.    Bilan-----	173
2.2.2    Les premières images IRM -----	174
<b>2.3    Conclusion -----</b>	<b>175</b>

## **CONCLUSION GENERALE----- 178**

Résultats sur la caractérisation des nanoparticules d'oxyde de fer et des dendrons -----	180
Mise au point d'une stratégie de greffage suivant le type de nanoparticules et la charge du dendron -----	180
Conservation des propriétés des nano-objets magnétiques après greffage et étude des interactions dendron-surface des nanoparticules -----	181
Evaluation préliminaire de l'intérêt de ces nano-objets en IRM -----	181
Les perspectives -----	182

## **ANNEXE ----- 184**

<b>1 PROPRIETES MAGNETIQUES DES NANOPARTICULES-----</b>	<b>186</b>
Introduction -----	186
Magnétisme d'une particule unique -----	188
<b>2 LES TEMPS DE RELAXATION-----</b>	<b>192</b>
<b>3 POLARITE DE QUELQUES SOLVANTS -----</b>	<b>196</b>
<b>4 LA DIFFRACTION DES RAYONS X -----</b>	<b>196</b>
<b>5 LE POTENTIEL ZETA -----</b>	<b>198</b>
<b>6 LA DIFFUSION DYNAMIQUE DE LA LUMIERE -----</b>	<b>200</b>
<b>7 PROTOCOLE DETAILLE DE LA SYNTHESE DE DENDRONS-----</b>	<b>202</b>
7.1    Synthèse du dendron ANA-----	202
7.2    Synthèse du composé intermédiaire -----	205
7.3    Synthèse du dendron ANACOOH : finalisation -----	208
7.4    Synthèse du dendron ANANH2 : finalisation -----	209
<b>8 L'ULTRAFILTRATION-----</b>	<b>212</b>
<b>9 SCHEMA DU PROTOCOLE DE GREFFAGE PAR LA METHODE B/PHREA</b>	<b>213</b>
<b>10 EXEMPLE DES PREMIERS SPECTRES INFRAROUGES ET ATG DES NPSco@ANA -----</b>	<b>214</b>

**11 SPECTRE RMN <sup>1</sup>H ET <sup>13</sup>C DES DIFFERENTS COMPOSES OBTENUS  
DURANT LES ETAPES DE SYNTHESE DE DENDRONS ANACOOH ET ANANH2  
215**

<b>11.1</b>	<b>Synthèse du composé intermédiaire -----</b>	<b>216</b>
<b>11.2</b>	<b>Synthèse du dendron ANACOOH : finalisation -----</b>	<b>222</b>
<b>11.3</b>	<b>Synthèse du dendron ANANH2 : finalisation -----</b>	<b>225</b>

**LISTE DES ABREVIATIONS LES PLUS UTILISEES ----- 230**

**REFERENCES ----- 232**



# INTRODUCTION GENERALE



Cette dernière décennie, les nanoparticules d'oxyde de fer superparamagnétiques (SPIO) ont suscité un intérêt scientifique croissant et marqué. Leurs propriétés magnétiques originales ont largement été étudiées pour être utilisées dans le domaine de l'électronique de spin (ou spintronique)<sup>1 2 3 4</sup> pour le stockage de données, mais également dans le domaine biomédical.

Dans ce dernier domaine, le superparamagnétisme est une propriété très attractive : en effet, les nanoparticules superparamagnétiques (en dessous d'un diamètre allant de 3 à 50 nanomètres selon les matériaux) ne sont pas magnétiques à température ambiante. Les nanoparticules magnétiques peuvent être assimilées à un domaine magnétique unique avec un moment magnétique important. La particule monodomaine possède un macrospin (somme des moments magnétiques des atomes qui la constituent), qui, à l'instar d'un moment paramagnétique interagit avec le champ externe et fluctue sous l'agitation thermique. L'absence de force attractive magnétique à température ambiante permet ainsi de réduire les phénomènes d'agglomération et d'agrégation entre nanoparticules et donc d'obtenir une meilleure dispersion et stabilisation de celles-ci en suspension. Les nanoparticules d'oxyde de fer sont donc utilisées aussi bien pour le diagnostic que pour la thérapie comme l'illustre la figure ci-dessous (Figure 1) :

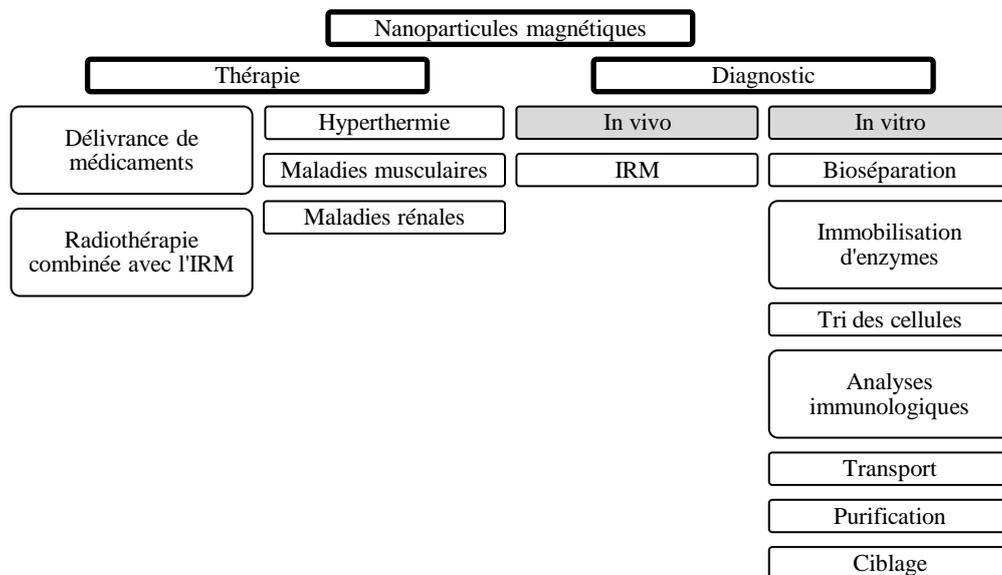


Figure 1: applications biomédicales des nanoparticules magnétiques<sup>5 6 7 8 9</sup>.

Dans le cadre de l'imagerie par résonance magnétique nucléaire (IRM(N)), qui est un outil puissant de diagnostic médical, les nanoparticules d'oxyde de fer superparamagnétiques sont utilisées en tant qu'agents de contraste négatifs. En interagissant avec les molécules d'eau du corps, les nanoparticules influencent le signal IRM en augmentant la vitesse de relaxation magnétique des protons de l'eau et réduisent les temps de mesures. Elles permettent alors un meilleur diagnostic sur les images en réhaussant les contrastes noirs entre tissus sains et tissus malades.

Pour de telles applications biomédicales, il est nécessaire de disposer de nanoparticules fonctionnalisées présentant, lorsqu'elles sont en suspension, une taille moyenne de particules inférieure à 100 nm et une distribution de taille étroite. La fonctionnalisation des nanoparticules par des molécules organiques est un aspect très important car elle favorise la stabilité des nanoparticules en suspension ; d'autre part, les molécules greffées peuvent également apporter des fonctions nécessaires supplémentaires pour des applications biomédicales. En effet, le cahier des charges à respecter impose de nombreuses contraintes et notamment au niveau de la nanoparticule fonctionnalisée :

- avoir de très bonnes propriétés magnétiques ;
- être biocompatible : les nanoparticules ne doivent pas être toxiques et doivent pouvoir être éliminées par le corps ;
- être stables dans les milieux physiologiques : cette stabilité est obtenue en modifiant les propriétés de surface des nanoparticules en faisant appel à la chimie aux interfaces ou chimie des surfaces. Les nanoparticules sont alors enrobées dans une couche fonctionnelle pour créer des répulsions stériques et/ou électrostatiques afin qu'elles ne s'agglomèrent pas ;
- avoir un ancrage fort entre la couche fonctionnelle et les nanoparticules : il faut un lien robuste pour éviter la désorption de la couche organique dans le corps et donc la déstabilisation des nanoparticules ;
- avoir une biodistribution favorable : les nanoparticules doivent être de petite taille pour pouvoir circuler facilement dans le corps et/ou passer des barrières, atteindre des organes sensibles ;
- porter des vecteurs ; des groupes fonctionnels, comme des anticorps ou des protéines, qui, une fois greffés à la surface des nanoparticules permettront de cibler des organes, tumeurs, ou encore de délivrer des médicaments.

Ainsi, de nombreux paramètres entrent en jeu dans la conception de tels nano-objets. La plupart des études actuelles sur les nanoparticules d'oxyde de fer fonctionnalisées pour le biomédical et en particulier l'IRM sont centrées sur l'amélioration de leur biocompatibilité et sur leur vectorisation. Très peu d'études s'attachent à améliorer les propriétés magnétiques des nanoparticules, leur distribution de taille en suspension, et à relier l'effet du greffage sur les propriétés structurales et magnétiques. De plus, des challenges restent encore à relever : la fonctionnalisation doit être optimisée pour assurer une bonne biodistribution dans le corps humain ; les molécules greffées ne doivent pas se désorber *in vivo* ; la taille moyenne des particules fonctionnalisées, en suspension, doit être inférieure à 100 nm et les propriétés magnétiques demeurer non altérées par cette étape de fonctionnalisation.

Dans le domaine de l'IRM, de nombreux polymères synthétiques ont été utilisés afin de couvrir la surface des SPIOs parmi lesquels le dextran, des lipides, l'oxyde de polyéthylène (PEO) et le polyvinylpyrrolidone (PVP). Tous ces polymères sont connus pour être biocompatibles et faciliter la dispersion en milieu aqueux. Néanmoins, ces enrobages polymériques ne sont pas robustes et peuvent facilement se détacher de la surface des SPIOs en conditions *in vivo* et ainsi induire une agrégation préjudiciable. D'autre part, ils forment très souvent une large coque organique autour de la nanoparticule ce qui peut avoir pour conséquence un moins bon impact du cœur superparamagnétique sur la relaxivité des protons de l'eau et donc un pouvoir contrastant atténué. De plus, cette large couche organique confère aux nanoparticules une taille moyenne élevée en suspension, ce qui limite leur biodistribution.

Avec le double objectif d'augmenter l'efficacité du greffage de la coque organique sur le cœur inorganique et d'avoir la possibilité de modifier à souhait les caractéristiques (fonctionnalités, propriétés physico-chimiques...) d'un enrobage organique d'épaisseur optimisée, nous proposons un sujet de recherche qui est basé sur la conception et la caractérisation de nanoparticules d'oxyde de fer élaborées par deux méthodes de synthèse, la co-précipitation et la décomposition thermique, et le greffage fort et covalent de molécules dendritiques à leur surface. L'intérêt du greffage de telles molécules dendritiques est multiple : la diversité de fonctionnalisation permise par la structure arborescente du dendron répond tout à la fois aux critères de biocompatibilité, de faible toxicité et de vectorisation auxquels nous aimerions répondre. De plus, outre la multifonctionnalisation sur une molécule de bas poids moléculaire, la chimie des dendrimères apporte une versatilité de taille (suivant la génération), de propriétés physico-chimiques (hydrophilie, lipophilie) dont les effets sur la

stabilisation, les qualités de contraste, la pharmacocinétique et la biodistribution des nano-objets hybrides pourront clairement être identifiés. Nous avons choisi de greffer ces molécules à la surface des nanoparticules en utilisant une fonction de type acide phosphonique. Ce choix est justifié par des études antérieures démontrant un taux de greffage plus élevé ainsi qu'un ancrage plus stable et plus fort obtenus par l'utilisation d'agents de couplage phosphonates comparativement aux carboxylates.

En ce qui concerne la synthèse des nanoparticules, la voie la plus utilisée est la co-précipitation qui conduit à des nanoparticules en suspension dans l'eau, mais qui ont tendance à s'agréger. Une autre voie de synthèse se développant actuellement est la décomposition thermique d'un complexe de fer dans un solvant à haut point d'ébullition en présence d'acide oléique comme surfactant. Cette voie de synthèse conduit à des nanoparticules recouvertes d'acide oléique et stables dans des solvants organiques. Si ces nanoparticules sont moins agrégées, il faut néanmoins mettre au point un protocole pour greffer les dendrons et obtenir des suspensions stables dans l'eau.

C'est dans ce contexte que nos travaux se sont donc centrés sur le greffage de molécules dendritiques (favorisant la stabilité des suspensions par interaction stérique et constituant une plateforme pour le greffage de molécules fonctionnelles) avec un agent de couplage phosphonate (permettant un ancrage direct et fort des molécules organiques) sur des nanoparticules d'oxyde de fer synthétisées par deux voies de synthèse (la co-précipitation et la décomposition thermique) pour concevoir des agents de contraste performants.

Ainsi, des nanoparticules de 10 à 12 nm de diamètre ont été synthétisées par co-précipitation et décomposition thermique et caractérisées structuralement et magnétiquement. Ces deux voies de synthèse étant très étudiées, il est intéressant de confronter leurs avantages et leurs inconvénients.

Par la suite, plusieurs dendrons ont été conçus sur la base d'un cœur aromatique possédant l'agent de couplage phosphonate et des chaînes biocompatibles de type olygoéthylène glycol. La taille des dendrons et leurs charges en périphérie ont été étudiées dans un souci d'optimiser la stabilité par répulsion stérique et/ou électrostatique, mais également d'améliorer la biocompatibilité.

Puis les conditions de greffage de ces molécules sur les nanoparticules issues de la co-précipitation (en suspension dans l'eau) et celles issues de la décomposition thermique (recouvertes d'acide oléique et en suspension dans un solvant organique) ont été mises au point. Ces nano-objets synthétisés ont été caractérisés structuralement et magnétiquement par différentes techniques spectroscopiques et microscopiques et leur stabilité en suspension dans l'eau a été comparée.

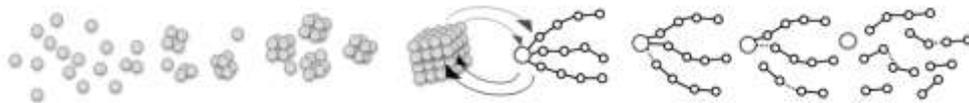
Enfin, le potentiel des suspensions de ces nano-objets a été analysé par des études IRM *in vitro* et *in vivo* en collaboration avec l'hôpital Edouard Herriot de Lyon.

Ce manuscrit se divise donc en quatre chapitres :

- le premier chapitre est consacré à la bibliographie sur le sujet. Nous y rappelons les données structurales et magnétiques de la magnétite et de la maghémite, mais également les principales méthodes de synthèse des nanoparticules d'oxyde de fer avec une description plus détaillée des méthodes de synthèse par co-précipitation et par décomposition thermique. Puis, nous décrivons les principales méthodes et stratégies de fonctionnalisation des nanoparticules et explicitons pourquoi nous avons retenu les dendrons pour notre étude. Nous expliquons le principe de l'IRM, l'utilité des agents de contraste pour cette technique d'imagerie et donnons un aperçu de l'avancée de la recherche à ce jour ;
- le second chapitre présente la synthèse et la caractérisation des nanoparticules et des molécules. Les premiers travaux ont consisté à synthétiser des nanoparticules d'oxyde de fer d'un diamètre

proche de 10 nm et trois dendrons qui diffèrent par leur charge en périphérie. L'objectif principal est de bien caractériser les nanoparticules avant le greffage, et ce d'un point de vue structural et morphologique. Les trois dendrons sont également caractérisés afin de mieux appréhender par la suite l'efficacité et le mode de greffage de l'agent de couplage phosphonate ;

- le troisième chapitre décrit les processus de greffage et les caractérisations des nano-objets greffés. Ce chapitre est donc consacré à la détermination de meilleures conditions de greffage des dendrons. Le greffage est direct sur les nanoparticules synthétisées par co-précipitation et s'effectue par échange de ligands et transfert de phase pour celles synthétisées par décomposition thermique. Les nano-objets ainsi conçus sont caractérisés afin de décrire les modifications structurales, de surface et magnétiques induite par l'étape de fonctionnalisation. La qualité et la stabilité des suspensions sont étudiées dans le temps et sous champ magnétique. L'analyse de toutes ces données a pour objectif de valider l'efficacité de l'approche « nanoparticules dendronisées » ;
- dans le dernier chapitre, le potentiel de suspensions aqueuses ou physiologiques de ces nanoparticules dendronisées est étudié dans le cadre de l'imagerie IRM. La stabilité des suspensions dans différents milieux physiologiques en fonction du dendron greffé a été analysée. Le pouvoir contrastant des nano-objets est testé et des essais préliminaires de toxicité *in vitro* et *in vivo* sont présentés. Les premières images IRM ont été réalisées sur le petit animal afin d'évaluer leur impact sur le contraste des organes.



# CHAPITRE I : BIBLIOGRAPHIE



# 1 LES NANOPARTICULES D'OXYDE DE FER MAGNETIQUES : PROPRIETES ET SYNTHESSES

Nous décrivons dans ce chapitre les propriétés magnétiques de la magnétite et de la maghémite et montrerons ensuite comment celles-ci sont modifiées lorsque les dimensions du matériau diminuent pour se situer dans le domaine nanométrique. Nous rappellerons ensuite les principales méthodes de synthèse utilisées pour la préparation de nanoparticules d'oxyde de fer et nous décrivons celles que nous avons retenues.

## 1.1 Propriétés générales des oxydes de fer magnétiques

### 1.1.1 Structures cristallines et caractérisations de la magnétite et de la maghémite

La magnétite et la maghémite, de formule chimique respective  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  et  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ , adoptent la structure spinelle. Celle-ci fut décrite pour la première fois par W.H. Bragg<sup>10</sup> et S. Nishikawa<sup>11</sup> en 1915 et doit son nom au minéral  $\text{MgAl}_2\text{O}_4$ . Les spinelles ont pour formule chimique générale  $\text{AB}_2\text{X}_4$  dans laquelle A et B représentent les cations et X les anions. Ils cristallisent dans le système cubique appartenant au groupe d'espace  $\text{Fd}\bar{3}\text{m}$ . Les 32 anions X (anions oxygènes  $\text{O}^{2-}$ ) composent le réseau cubique d'empilement compact (cubique à faces centrées) qui délimitent les sites tétraédriques et octaédriques dans lesquels différents cations peuvent venir se placer. La maille consiste en 32 atomes d'oxygènes qui génèrent 64 sites tétraédriques dont seulement le huitième est occupé (sites A) et 32 sites octaédriques dont la moitié peut être occupée (sites B).

La structure spinelle est construite à l'aide d'octaèdres  $\text{FeO}_6$  et de tétraèdres  $\text{FeO}_4$  (Figure 2). Chaque octaèdre est relié à six autres octaèdres par six côtés et à six différents tétraèdres par six sommets. Quand à l'environnement tétraédrique du fer, chaque tétraèdre est relié à douze octaèdres par ses quatre sommets (Figure 2). L'environnement de l'oxygène est constitué de quatre atomes de fer, trois en sites octaédriques et un en site tétraédrique. Les atomes d'oxygène définissent des couches à empilement compact de type cubique à face centrées (cfc : ABC)<sup>12</sup>. Les formes macroscopiques des cristaux de magnétite font apparaître les faces (111) et (110) (Figure 3).



Les sites tétraédriques sont représentés en bleu, les sites octaédriques en vert et les atomes d'oxygène en rouge.

Figure 2 : - à gauche, la structure spinelle, la maille élémentaire est représentée en trait plein noir ;  
- au centre, environnement du fer dans un site tétraédrique de la structure spinelle ;  
- à droite, environnement du fer dans un site octaédrique de la structure spinelle.

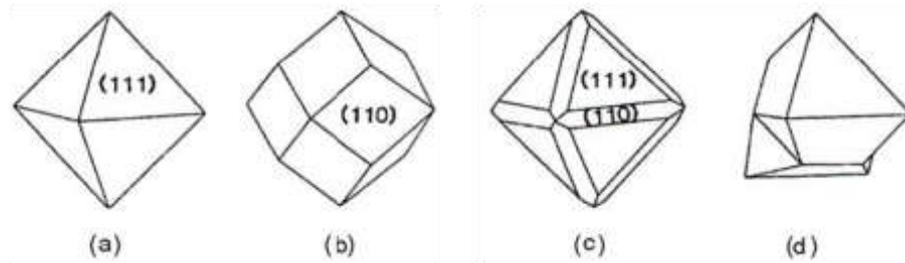


Figure 3 : formes les plus courantes de cristaux de magnétite avec (a) et (c) octaédrique, (b) rhombodecaédrique et (d) twinned (jumelé)<sup>13</sup>.

La magnétite est un oxyde mixte de  $\text{Fe}^{2+}$  et de  $\text{Fe}^{3+}$  de structure spinelle inverse  $(\text{Fe}^{3+})^{\text{tétra}}[\text{Fe}^{3+}\text{Fe}^{2+}]^{\text{octa}}\text{O}_4$  (Figure 4, groupe d'espace  $\text{Fd}\bar{3}\text{m}$ ). Les sites tétraédriques sont occupés par un cation trivalent et les sites octaédriques par les cations divalents et trivalents. Son paramètre de maille est égal à  $0,8396 \pm 0,0001$  nm à température ambiante<sup>14</sup>.

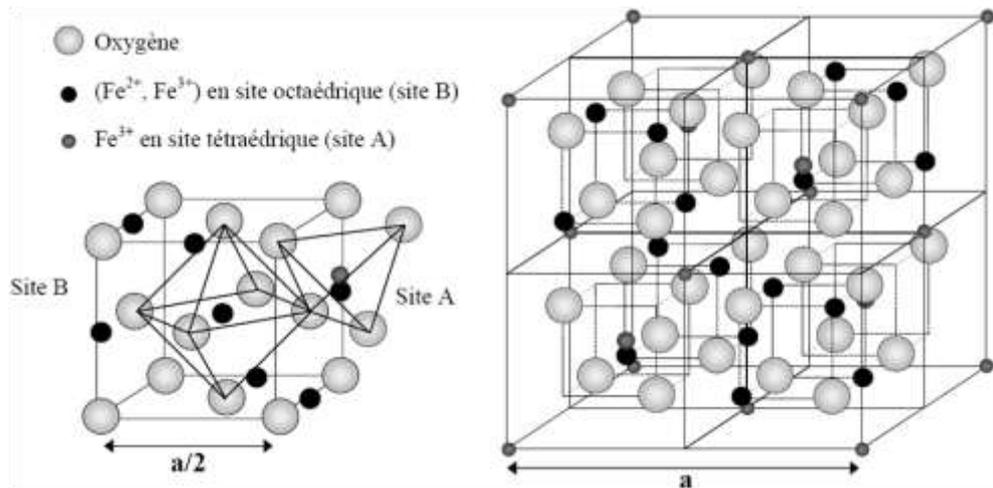


Figure 4: structure cristalline de la magnétite.

La maghémite  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  est obtenue par oxydation de la magnétite. Le fer se trouve entièrement dans l'état trivalent ce qui se traduit par l'apparition de lacunes cationiques, notées  $\square$ , dans les sites octaédriques. La structure de la maghémite varie suivant l'organisation des lacunes en sites octaédriques. En effet, les lacunes en sites octaédriques peuvent s'organiser de plusieurs façons suivant les conditions d'élaboration<sup>15 16 17 18 19</sup>. Trois distributions de lacunes ont été identifiées pour la maghémite :

- de manière aléatoire sans déformation de la maille ce qui permet la conservation du groupe d'espace  $\text{Fd}\bar{3}\text{m}$ . La structure se note :  $(\text{Fe}^{3+})^{\text{tétra}}[\text{Fe}^{3+}_{5/3}\square_{1/3}]^{\text{octa}}(\text{O})_4$ . Toutes les positions sont identiques avec un taux d'occupation de 5/6 ;
- de manière analogue au cation  $\text{Li}^+$  dans la structure  $\text{Fe}_8[\text{Li}_4\text{Fe}_{12}]\text{O}_{32}$ , toujours sans déformation de la maille, mais selon le groupe d'espace  $\text{P4}_132$ . La structure se note :  $(\text{Fe}^{3+}_8)^{\text{tétra}}[\text{Fe}^{3+}_{4/3}\square_{8/3}\text{Fe}^{3+}_{12}]^{\text{octa}}(\text{O}^{2-})_{32}$ . Il s'agit d'un ordre partiel sur les sites octaédriques ;
- de façon totalement ordonnée avec le passage d'une maille cubique à une maille tétragonale selon le groupe d'espace  $\text{P4}_32_12$ .

La combinaison de plusieurs techniques est nécessaire pour différencier la magnétite de la maghémite car leurs structures sont proches, et les diffractogrammes des rayons X sont donc similaires

(Figure 5). Les pics de diffraction sont très proches, mais légèrement décalés en raison de la différence entre les paramètres de maille, 0,8346 nm pour la maghémite (fiche JCPDS, 39-1346) et 0,8396 nm pour la magnétite ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) (fiche JCPDS, 19-629)<sup>14</sup>. Néanmoins, le diffractogramme RX de la maghémite peut contenir des pics supplémentaires, (210) et (211), lorsque les lacunes sont plus ou moins ordonnées.

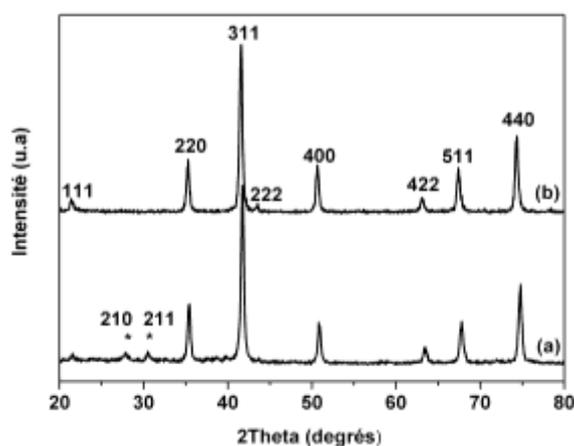


Figure 5 : diffractogrammes RX de la maghémite (a) et de la magnétite (b) obtenue pour des nanoparticules de 40 nm, synthétisées au laboratoire, avant (b) et après oxydation(a). Les positions des pics additionnels de la maghémite sont signalées avec une étoile\*.

Une technique complémentaire à la diffraction des rayons X pour différencier la magnétite de la maghémite est la spectroscopie infrarouge. Elle permet d'obtenir des informations sur la structure de la magnétite et de la maghémite aux faibles longueurs d'ondes ( $< 800 \text{ cm}^{-1}$ ) et est de plus sensible aux lacunes et à leur ordre éventuel dans la maghémite<sup>20 21</sup>.

En effet, une structure spinelle quasi-ordonnée développe un nombre de bandes infrarouges plus important et des bandes mieux résolues qu'un matériau désordonné<sup>20 21 22</sup>. Les bandes et les spectres caractéristiques de l'hématite, de la magnétite et de la maghémite sont donnés respectivement dans le Tableau 1 et la Figure 6<sup>23 24 25 26 27</sup>. Dans le cas de la maghémite, des bandes sont observées dans la gamme  $800 - 400 \text{ cm}^{-1}$ . La résolution et le nombre de ces bandes dépend du degré d'ordre des lacunes dans la structure de la maghémite. Une structure spinelle désordonnée présente souvent deux modes de vibration caractéristiques  $\nu_1$  et  $\nu_2$  à  $570$  et  $410 \text{ cm}^{-1}$ . D'après R.D. Waldron<sup>26</sup> et W.B. White<sup>27</sup>, la bande  $\nu_1$  localisée vers  $570 - 590 \text{ cm}^{-1}$  correspond aux déformations Fe–O dans les sites octaédriques et tétraédriques tandis que la bande  $\nu_2$  vers  $420 - 450 \text{ cm}^{-1}$  correspond uniquement aux déformations Fe–O dans les sites octaédriques.

D'après B. Gillot<sup>22</sup>, une diminution de la taille des particules de 64 à 10 nm se traduit par une perte de l'ordre de la distribution cationique au sein des nanoparticules et par la disparition progressive des bandes de surstructure. Cependant, T. Belin a synthétisé des nanoparticules de maghémite de  $10,7 \pm 1$  nm parfaitement cristallisées et stoechiométriques, qui présentent des raies de surstructure dues à un ordre des lacunes au sein des nanoparticules. Par conséquent, la présence de raies de surstructure ne dépend pas de la taille, mais bien de la cristallinité et de l'ordre des lacunes.

Tableau 1 : bandes infrarouges des trois principaux oxydes de fer. Les valeurs entre parenthèses sont issues de calculs théoriques et correspondent à des bandes de plus faible intensité<sup>28</sup>.

Oxyde de fer	Bandes IR (cm <sup>-1</sup> ) ± 5
Magnétite (Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> )	570 - 590, (400)
Maghémite (γ-Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> )	730, 695, 630, 590, 560, 480, 440, (400)
Hématite (α-Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> )	540, 470, (345)

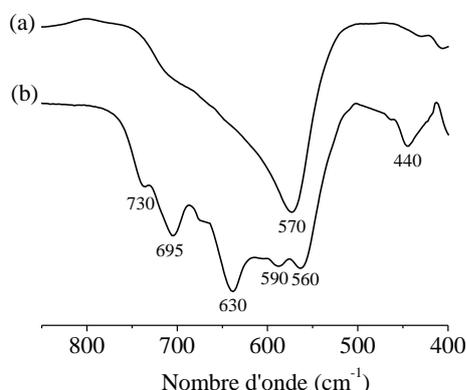


Figure 6 : spectres infrarouges de la magnétite (a) et de la maghémite (b) obtenue sur des nanoparticules de 40 nm avant (a) et après (b) leur oxydation<sup>29</sup>.

Ainsi, une poudre constituée uniquement de magnétite présente un spectre avec une seule bande localisée à 570 - 590 cm<sup>-1</sup> contrairement à la maghémite qui présente plusieurs bandes, sur une plus large plage de longueurs d'onde (800 - 400 cm<sup>-1</sup>) et dont la résolution va dépendre de l'ordre structural.

La diffraction des rayons X et la spectroscopie infrarouge permettent donc de donner une appréciation qualitative de la structure de l'oxyde de fer formé, mais ne permettent pas de donner la déviation de stœchiométrie  $\delta$  dans Fe<sub>3- $\delta$</sub> O<sub>4</sub>. Une technique adaptée pour déterminer avec précision la composition de l'oxyde de fer est la spectrométrie Mössbauer : en effet, cette technique est sensible non seulement au degré d'oxydation et à l'environnement des atomes de fer, mais également et au rapport Fe<sup>2+</sup>/Fe<sup>3+</sup>, ainsi qu'à leur environnement. Elle est la méthode la plus adaptée pour évaluer la déviation de stœchiométrie  $\delta$  dans Fe<sub>3- $\delta$</sub> O<sub>4</sub><sup>8</sup>. Dans le cadre de cette thèse, les caractérisations par spectrométrie Mössbauer ont été réalisées par Jean-Marc Grenèche de l'Université du Maine.

### 1.1.2 Structure magnétique de la maghémite et de la magnétite

Les ferrites de structure spinelle sont des matériaux ferrimagnétiques en dessous de leur température de Néel. L'intensité de l'aimantation dépend du nombre d'électrons célibataires présents par maille élémentaire (unité de formule). Le Tableau 2 donne le nombre d'électrons célibataires pour Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> et γ-Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, ainsi que les valeurs observées et calculées du moment magnétique.

Tableau 2 : nombre d'électrons célibataires, moments magnétiques observés et calculés par unité de formule, exprimés en magnéton de Bohr ( $\mu_B$ )<sup>30 31</sup>.

Ferrite	Nombre d'électrons célibataires	Moment observé $\mu_B$	Moment calculé (Néel) $\mu_B$
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	14	4,2	4
γ-Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	13,33	3,15 - 3,17	3,33

Si tous les électrons d'un matériau étaient alignés dans la même direction, le moment magnétique par unité de formule devrait être égal, en magnéton de Bohr, au nombre d'électrons célibataires. Or ce n'est pas le cas. L'explication a été donnée par Néel<sup>32</sup>. En effet, dans la structure spinelle, les sites des cations sont de deux types désignés par A et B. Néel a considéré trois interactions d'échange possible entre les électrons célibataires de deux ions placés séparément :

- dans des sites A (interaction AA) ;
- dans des sites B (interaction BB) ;
- ou dans un site A et un site B (interaction AB).

Lorsqu'il existe une interaction AB, c'est-à-dire quand des électrons célibataires sont présents dans les deux types de sites, elle prédomine sur les deux autres types d'interactions. Effectivement, la distance entre sites voisins de même nature est plus grande qu'entre un site A et le site B le plus proche. Les spins des sites A et B sont alors antiparallèles. Si il n'y a pas d'interaction AB, l'interaction BB entre en jeu, ce qui a pour effet d'aligner la moitié des électrons (spins) dans un sens, la moitié dans le sens opposé. Ainsi, ce qui fait que les plans alternés de sites B sont aimantés dans des sens opposés. L'interaction AA n'entre pas en jeu en l'absence d'interaction AB car la non-existence de cette dernière implique l'absence d'électrons célibataires dans les sites A.

La magnétite  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  est l'exemple typique d'un composé ferrimagnétique où l'interaction AB prédomine. Nous pouvons rappeler que sa structure est celle d'une maille cfc d'ions  $\text{O}^{2-}$ , les ions  $\text{Fe}^{2+}$  étant situés dans  $\frac{1}{4}$  des sites octaédriques, et les ions  $\text{Fe}^{3+}$  pour moitié dans  $\frac{1}{4}$  des sites octaédriques, et pour moitié dans  $\frac{1}{8}$  des sites tétraédriques. Les moments magnétiques sont alignés dans chaque type de site et de sens opposés entre les sites : (-) dans les sites tétraédriques (sites A) et (+) dans les sites octaédriques (sites B). Nous avons donc la disposition suivante pour les moments :

- Sites octaédriques :  $\text{Fe}^{3+}$  ( $5 \mu_B$ )  $\uparrow \uparrow \uparrow \uparrow \uparrow$ ,  $\text{Fe}^{2+}$  ( $4 \mu_B$ )  $\uparrow \uparrow \uparrow \uparrow$  ;
- Sites tétraédriques :  $\text{Fe}^{3+}$  ( $-5 \mu_B$ )  $\downarrow \downarrow \downarrow \downarrow$

On constate que les moments magnétiques des ions ferriques s'annulent. Il ne reste que les moments magnétiques des ions ferreux, qui confèrent à la magnétite une aimantation permanente proportionnelle au seul état de spin des ions  $\text{Fe}^{2+}$  (le moment magnétique résultant par maille est  $32\mu_B$  en théorie). L'aimantation à saturation de la magnétite massive est de  $92 \text{ uem/g}^{33}$ .

La maghémite  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  est un semi-conducteur dopé n, avec un gap de 2,03 eV. L'occupation des sites donnée par la formule  $(\text{Fe}^{3+})^{\text{tétra}}[\text{Fe}^{3+}_{5/3} \square_{1/3}]^{\text{octa}}\text{O}_4$  conduit à un moment de  $(5/3-1) \times 5\mu_B = 3,33 \mu_B$ . Les valeurs expérimentales déterminées sont 3,15 à 3,17  $\mu_B^{23 \ 30 \ 34}$ . L'aimantation à saturation de la maghémite massive est de  $74 \text{ uem/g}$ .

En dessous d'une température d'environ 120 K, la magnétite subit une transition de phase du premier ordre, qui se traduit par une modification de plusieurs propriétés. La symétrie cristalline appartient alors au groupe d'espace monoclinique  $C_c$ . La conductivité chute de deux ordres de grandeur et la valeur de l'aimantation rémanente diminue également. Cette transition est appelée transition de Verwey et la température de transition,  $T_V$ , la température de Verwey<sup>35</sup>. Elle est attribuée à une localisation de charge, c'est-à-dire à la disparition du « hopping » (saut d'électrons entre  $\text{Fe}^{2+}$  et  $\text{Fe}^{3+}$ ). Verwey a ainsi proposé une mise en ordre des ions  $\text{Fe}^{2+}$  et  $\text{Fe}^{3+}$  respectivement selon les directions  $[111]$  et  $[\bar{1}\bar{1}0]$  alternativement dans les plans  $(001)^{34 \ 36}$ , mais son origine est encore débattue.

### 1.1.3 Effet de la taille des nanoparticules sur les propriétés magnétiques de la magnétite et de la maghémite

Le passage du matériau massif à des particules de taille nanométrique modifie un certain nombre de propriétés magnétiques. Les propriétés magnétiques varient suivant le diamètre des nanoparticules et leur méthode de synthèse. La magnétite et la maghémite présentent une structure en domaines à l'état massif. Lorsque la taille est réduite en dessous d'une certaine taille critique  $D_c$ , la nanoparticule ne présente plus qu'un seul domaine magnétique : on parle alors de nanoparticule monodomaine bloquée à température ambiante. Le cycle d'aimantation est ouvert avec la présence d'un champ coercitif et d'une aimantation rémanente (voir détails dans l'annexe 1). Le diamètre critique peut être calculé par l'expression :

$$D_c(\text{en nm}) = \frac{4\gamma}{\mu_0 N_{MD} M_s^2}$$

ou  $N_{MD}$  est le facteur démagnétisant pour un monodomaine et  $\gamma$  représente l'énergie de la paroi.

Pour la magnétite et la maghémite, la taille critique est d'environ 30 nm<sup>37 38</sup>, mais semble varier d'une méthode de synthèse à l'autre et est dépendante de l'effet des interactions dipolaires entre nanoparticules.

Puis, lorsque la taille diminue encore en dessous d'une taille  $r_0$ , l'énergie d'anisotropie magnétocristalline  $KV$  (avec  $V$  le volume de la nanoparticule et  $K$  la constante d'anisotropie, qui dépend du matériau magnétique et de la forme de la particule) devient inférieure à l'énergie thermique ( $kT$  avec  $k$  la constante de Boltzmann et  $T$  la température) et la nanoparticule devient superparamagnétique à température ambiante (Annexe 1). La particule ne possède plus d'aimantation à température ambiante : le cycle d'hystérèse est fermé, sans champ coercitif ni aimantation rémanente.

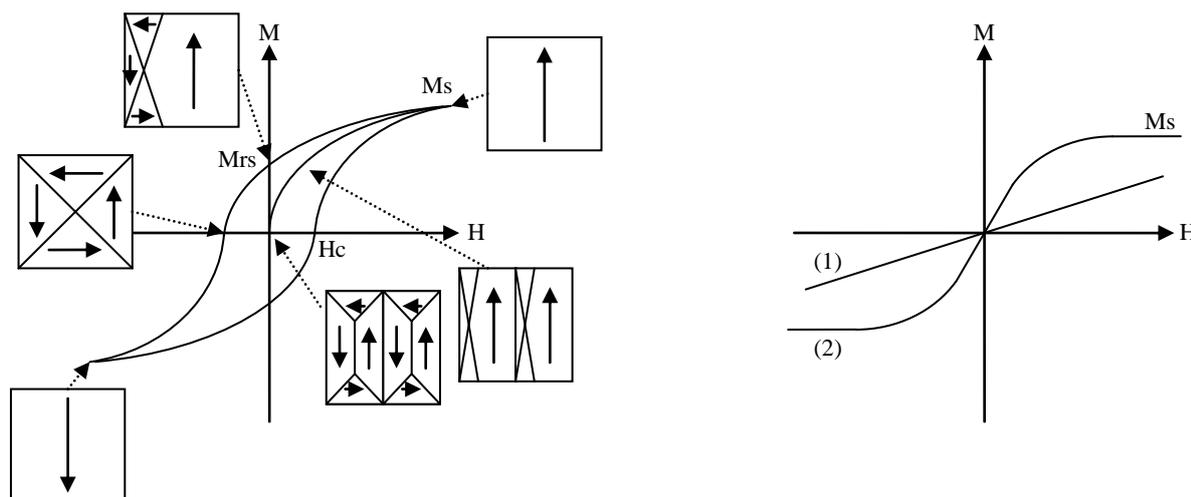


Figure 7 : représentation schématique de la courbe d'aimantation d'un matériau ferrimagnétique et état des domaines magnétiques en fonction du champ appliqué  $H$  (à gauche) d'un matériau paramagnétique (1) et superparamagnétique (2) (à droite).  $M_s$  : aimantation à saturation,  $H_c$  : champ coercitif et  $M_{rs}$  : aimantation rémanente.

De plus, lorsque la taille des nanoparticules diminue, le rapport surface/volume augmente, et les effets de surface deviennent importants pour les nanoparticules de petite taille. La surface des nanoparticules présente une structure magnétique désordonnée à cause de la rupture de symétrie et de la sous-coordination des atomes de surface. Ce phénomène est appelé « canting » de spin, et il tend à diminuer l'aimantation à saturation des nanoparticules<sup>33</sup> (Annexe 1). De plus, plus la taille des

nanoparticules diminue, plus elles sont sensibles à l'oxydation. L'aimantation à saturation de la maghémite étant plus faible que celle de la magnétite, le phénomène d'oxydation des nanoparticules de magnétite entraîne la formation d'une couche oxydée perturbée et conduit également à la baisse de l'aimantation à saturation. Bien que de nombreux chercheurs se soient intéressés à cette question, les interprétations des résultats expérimentaux sont encore très discutées<sup>39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 5253</sup>

<sup>54</sup>. L'aimantation à saturation de nanoparticules de  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  diminue avec la taille des nanoparticules.

Les valeurs d'aimantation à saturation des nanoparticules de magnétite ou de maghémite synthétiques, données dans la littérature sont dans la gamme 30-68 uem/g pour la magnétite (92 uem/g pour le matériau massif). Les valeurs trouvées pour la maghémite nanométrique sont de 20 % inférieures aux valeurs du matériau massif (74 uem/g pour la maghémite massive).

Cependant, bien que les propriétés magnétiques des nanoparticules soient fortement influencées par des effets de taille et de surface, des propriétés magnétiques très différentes ont été observées dans des matériaux avec des tailles de grain similaires, mais obtenus par des méthodes différentes. La réduction de l'aimantation à saturation est donc difficile à interpréter en considérant seulement des effets de taille et de surface. Pour expliquer ce phénomène, plusieurs hypothèses concernant un désordre structural dans l'ensemble du volume de la structure cristalline, ou dans une couche de surface, ont été proposées. Effectivement, la réduction de la taille entraîne une augmentation du désordre dans la structure cristalline des nanoparticules au voisinage de leur surface. L'épaisseur de la couche de surface dite « cantée » de spin augmente alors au détriment de l'épaisseur du cœur des nanoparticules, qui est à l'origine de l'aimantation et où les spins sont ordonnés. Néanmoins, il n'y a pas de moyens sans équivoque qui permettent de clairement différencier les contributions individuelles de l'effet de taille, des effets de surface et du désordre structural des nanoparticules et donc d'identifier leur effet sur des propriétés magnétiques spécifiques<sup>55</sup>.

La transition de Verwey est elle aussi, très sensible à la taille et à la déviation en stœchiométrie  $\delta$  de la magnétite<sup>56 57</sup>. Dans le cas de nanoparticules de magnétite sous-stœchiométriques, N. Millot et *al.*<sup>58</sup> mettent en évidence une transition de Verwey à 94K, alors que d'après le modèle de Honig établi pour des monocristaux, elle devrait être à 16 K<sup>59</sup>. Les auteurs en concluent que ce modèle ne s'applique pas à des poudres nanométriques. Une étude menée sur des ferrites de titane leur permet de conclure que la taille nanométrique décale la transition de Verwey vers les hautes températures et que l'amplitude, la température et l'ordre de la transition dépendent seulement du nombre de paires  $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$  en sites octaédriques.

## 1.2 Principales voies de synthèse des nanoparticules d'oxyde de fer magnétiques

---

Dans cette partie, nous présenterons un bref aperçu des principales méthodes de synthèse avec leurs avantages et leurs inconvénients. Nous décrirons ensuite les méthodes de synthèse par co-précipitation et décomposition thermique qui seront les méthodes utilisées dans ce travail pour obtenir des nanoparticules d'oxyde de fer magnétique.

### 1.2.1 Les principales méthodes de synthèses existantes

---

Plusieurs voies de synthèse ont été développées pour contrôler la taille et la morphologie des nanoparticules d'oxyde de fer magnétiques. La méthode qui a fait l'objet de nombreuses recherches est celle basée sur la précipitation en milieu aqueux d'ions ferriques et ferreux. D'autres méthodes sont

basées sur l'idée de compartimenter l'espace offert à la croissance des objets. La synthèse est alors le plus souvent conduite en milieu multiphasé. Il existe également des méthodes dans lesquelles les précurseurs métalliques sont décomposés à haute température dans un solvant organique.

On peut distinguer ainsi, les voies de synthèses les plus courantes qui sont la co-précipitation, la décomposition thermique, la voie sol-gel<sup>60 61 62 63 64 65 66</sup>, la méthode polyol<sup>67 68 69 70 71 72 73</sup>, la synthèse en microémulsion<sup>74 75 76 77 78 79 80 81 82</sup> et la voie hydrothermale<sup>83 84 85 86</sup>. D'autres méthodes de synthèse moins courantes existent comme la voie électrochimique<sup>87</sup>, la voie aérosol/vapeur<sup>88</sup>, la voie sonochimique<sup>89 90</sup> et la synthèse en capillaire<sup>91</sup> (Tableau 3).

Tableau 3 : récapitulatif des méthodes de synthèses des nanoparticules d'oxyde de fer<sup>76</sup>.

Méthode	Condition de synthèse	Taille (nm) et distribution de taille		Rdt	Avantages	Inconvénients
Co-précipitation	Très simples	5-20	Correcte	Très élevé	Simple, nanoparticules nues	Peu former des agrégats, pas de contrôle sur l'état d'oxydation
Décomposition thermique	Complicquées	2-20	Très bonne	Elevé	Contrôle et modulation de la forme	Pas de contrôle sur l'état d'oxydation, pas stable en milieux aqueux
Sol-gel	Complicquées	6-15	Bonne	Passable	Contrôle et modulation de la forme, synthèse de nanocomposites	Présence d'une matrice
Milieu polyol	Simple selon conditions	< 10	Très bonne	Moyen		
Microémulsion	Complicquées	≤ 50	Très bonne	Faible	Contrôle et modulation de la forme	Difficile d'extraire le surfactant
Hydrothermale	Simple	50-1000	Très bonne	Moyen	Simple	Haute température de synthèse
Electrochimique	Complicquées	3-8	Très bonne	Très faible		
Aérosol/vapeur	Complicquées	5-60	Bonne	Très élevé	Excellent rendement	Formation de larges agrégats
Sonochimique		< 100	Très bonne			
Capillaire	Complicquées	2-7	Très bonne	Très faible	Très bonne distribution de taille	Très faible rendement

Ces voies de synthèse permettent la conception de nanoparticules de toutes tailles et de toutes formes. Cependant, les synthèses par co-précipitation et par décomposition thermique sont les plus utilisées pour la conception d'agents de contraste, car ces deux méthodes présentent le plus d'avantages tels de bons rendements, des mises en œuvre simples et une très bonne qualité des nanoparticules obtenues. Mais, chacune présente également quelques inconvénients comme nous allons le voir dans le paragraphe suivant.

## 1.2.2 Les voies de synthèses retenues

### A. La co-précipitation

La co-précipitation est la voie la plus commode et la plus facile pour la synthèse de nanoparticules de magnétite et maghémite. Elle se fait par l'addition d'une base dans des solutions aqueuses acides de sels d'ions ferreux  $Fe^{2+}$  et ferriques  $Fe^{3+}$ . La réaction s'effectue sous atmosphère inerte à température ambiante ou élevée<sup>92 93 94</sup>. Les ions ferreux et ferriques, alors solubles en milieu acide, précipitent

lorsque la basicité du milieu augmente. La réaction se déroule en quatre étapes selon le modèle de Victor K. Lamer (Figure 8)<sup>95</sup> :

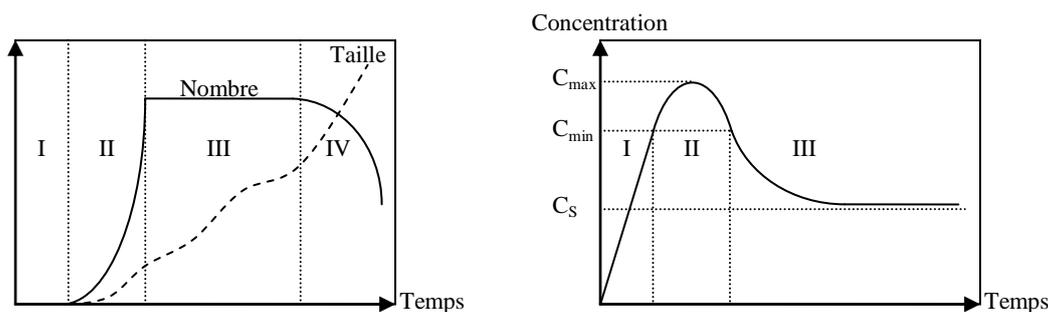


Figure 8 : - variation du nombre et de la taille des nanoparticules durant la co-précipitation (à gauche) ;  
- variation de la concentration en précurseur au cours de la co-précipitation ( $C_s$  est la solubilité du solide).

- la première étape est la formation, via une réaction de polycondensation inorganique, de deux précurseurs de charge nulle  $[\text{Fe}_2(\text{OH})_4(\text{H}_2\text{O})_8]^0$  pour l'ion ferreux et  $[\text{Fe}_2(\text{OH})_6(\text{H}_2\text{O})_6]^0$  pour l'ion ferrique (zone I). La concentration de ces deux précurseurs croît avec le temps en parallèle à l'augmentation de la basicité du milieu réactionnel ;
- la seconde étape est la nucléation. En effet, lorsque la concentration des deux précurseurs dépasse une certaine valeur  $C_{min}$ , les réactions de condensation entre précurseurs par olation et/oxolation s'accroissent. Il y a alors apparition de germes dans la solution (zone II). Les germes sont des espèces polynucléaires instables qui, à cause de leurs très petites tailles, se redissolvent rapidement. Leur formation est un processus très rapide et, en continuant d'augmenter la sursaturation par l'apport de base, un seuil critique est atteint au-delà duquel des germes stables sont créés. Il s'ensuit alors une diminution brusque de la concentration en précurseur et si cette diminution est suffisante (inférieure à  $C_{min}$ ), la formation ultérieure de germes est bloquée ;
- la troisième étape est la croissance de germes. Elle procède par incorporation de précurseurs via des réactions d'olations et/ou d'oxolation (zone III). La séparation dans le temps des phases de nucléation et de croissance permet d'obtenir des nanoparticules de taille homogène. La croissance se poursuit tant que la concentration en précurseur de charge nulle excède la solubilité du solide précipité ;
- la dernière étape est le vieillissement. Cette étape est importante puisqu'elle va donner les caractéristiques finales des nanoparticules. Les étapes précédentes de nucléation-croissance ont lieu sous contrôle cinétique (le chemin réactionnel de plus faible énergie d'activation est toujours celui choisi par le système). Les nanoparticules formées dans ces conditions doivent évoluer pour atteindre l'état thermodynamique le plus stable tant sur le plan dimensionnel que morphologique ou structural. Le vieillissement peut entraîner l'augmentation de la taille des nanoparticules par murissement d'Ostwald où les petites nanoparticules se dissolvent au profit des plus grosses. Effectivement, la solubilité est inversement proportionnelle au rayon des nano-objets et le moteur de cette transformation n'est autre que la diminution de l'énergie interfaciale.

Pour la même raison, le vieillissement peut conduire à un changement de la morphologie des nanoparticules car les faces cristallines qu'elles présentent au milieu réactionnel ont des tensions de surface différentes. Enfin, un phénomène très classique dans la phase de vieillissement est la cristallisation des phases amorphes ou un changement de structure cristalline (les phases métastables précipitent en premier). Ce dernier phénomène a de grandes conséquences sur la synthèse de

nanoparticules de taille homogène. En effet, la précipitation d'une phase transitoire permet de découpler les étapes de nucléation et de croissance de la phase stable en abaissant fortement la concentration en précurseur de charge nulle (la concentration reste cependant supérieure à la solubilité de la phase cristalline).

Ainsi, la taille, la forme et la composition des nanoparticules magnétiques dépendent de nombreux paramètres :

- le type de sels utilisés (chlorures, sulfates, nitrates, ... ) ;
- le rapport  $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$  ;
- la température de réaction ;
- la valeur du pH ;
- la concentration ionique des réactifs
- la nature de la base.

L'ajustement et la détermination précise des paramètres permettent d'obtenir des nanoparticules de magnétite aux caractéristiques structurales et morphologiques contrôlées avec une grande reproductibilité. (Figure 9). R. Massart et V. Cabuil ont été parmi les pionniers (1981) de la synthèse par co-précipitation de magnétite ou de maghémite, du contrôle du rendement et de la taille des nanoparticules<sup>96 97</sup>. Ils ont mis en évidence que l'obtention de nanoparticules magnétiques est concurrencée par celle de la goethite qui est non magnétique. Le rendement en composé magnétique dépend alors principalement de deux facteurs qui sont :

- la fraction molaire en ions  $\text{Fe}^{2+}$  dans le rapport mélange d'ions  $\text{Fe}^{2+}$  et  $\text{Fe}^{3+}$  ( $X = \frac{[\text{Fe}^{2+}]}{[\text{Fe}^{2+} + \text{Fe}^{3+}]}$ )
- la composition du milieu alcalin utilisé pour la co-précipitation qui dépend de la base.

Effectivement, ils ont montré, lors de synthèses de nanoparticules en présence de diverses bases, que la taille diminue selon la séquence :  $\text{NH}_4\text{OH} \rightarrow \text{CH}_3\text{NH}_2 \rightarrow \text{NaOH} \rightarrow \text{KOH}$ . Ils ont également montré que de meilleurs rendements en produit magnétique (maghémite ou magnétite) sont obtenus pour des valeurs de pH relativement basiques (8,6-9,6) et que la taille des particules a tendance à diminuer avec l'augmentation du pH.

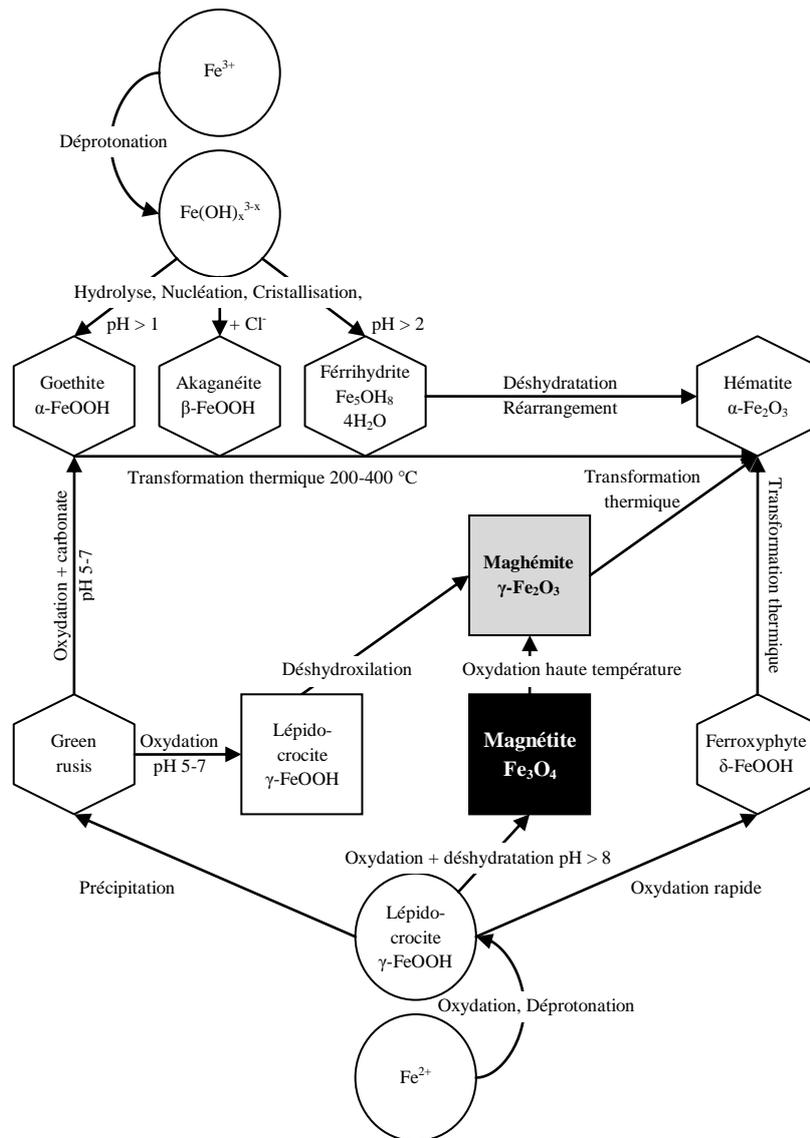


Figure 9 : phases obtenues à partir de cations  $Fe^{2+}$  et  $Fe^{3+}$  en solution en fonction des conditions opératoires<sup>98</sup>

D'autres travaux montrent que la cinétique de la réaction, qui dépend fortement de la vitesse d'oxydation des espèces de fer dans le milieu réactionnel, peut être contrôlée par l'utilisation d'un gaz inerte comme le diazote  $N_2$  par exemple<sup>99 100</sup>. Ainsi, la taille des nanoparticules synthétisées en présence de diazote est plus petite comparativement à celles synthétisées en présence d'oxygène.

J. P. Jolivet et son groupe ont quant à eux analysé toutes les étapes de la synthèse par co-précipitation en expliquant les étapes déterminantes pour la formation de nanoparticule de magnétite avec une taille contrôlée allant de 2 à 12 nm<sup>101 102 103</sup>. Ils ont montré par exemple que, en fixant  $X = 0,33$ , seul le pH et la force ionique imposés par le sel, influencent la taille et la distribution des nanoparticules. Ils ont ainsi défini les meilleures conditions pour obtenir des nanoparticules de taille homogène :  $8,5 \leq \text{pH} \leq 12$  et  $0,5 \leq \text{force ionique} \leq 3 \text{ mol/L}$ . Ils ont aussi montré que la taille des particules diminue linéairement quand le pH augmente (Figure 10)<sup>104 105</sup>.

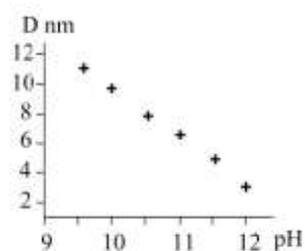


Figure 10 : influence du pH de la précipitation sur la taille moyenne des particules (force ionique de 3 mol/L imposée par  $\text{NaNO}_3$ ).

Lors de sa thèse, T.J. Daou<sup>106</sup> a montré que des nanoparticules d'oxyde de fer de tailles supérieures à 20 nm pouvaient être synthétisées par co-précipitation d'ions  $\text{Fe}^{2+}$  et  $\text{Fe}^{3+}$  par des bases organiques telles que  $(\text{N}(\text{CH}_3)_4\text{OH})$ ,  $(\text{N}(\text{C}_2\text{H}_5)_4\text{OH})$ ,  $(\text{N}(\text{C}_3\text{H}_7)_4\text{OH})$ , suivie d'un traitement hydrothermal dans un autoclave. La taille des nanoparticules peut être contrôlée par la nature de la base (longueur de la chaîne alkyl) et le rapport molaire base/fer<sup>107</sup>.

Les travaux actuels sur la composition des nanoparticules d'oxyde de fer en fonction de la taille des nanoparticules indiquent que lorsque la taille des nanoparticules est inférieure à 20 nm, la composition des nanoparticules est sous-stœchiométrique en magnétite dans le volume et tend vers celle de la maghémite quand la taille des nanoparticules diminue. Pour des tailles supérieures à 20 nm, les nanoparticules présentent une structure cœur-coquille avec un cœur de magnétite stœchiométrique et une couche oxydée en surface<sup>29 106 107</sup>. Les nanoparticules d'oxyde de fer présentent globalement une aimantation à saturation supérieure à 60 uem/g augmentant avec leur taille. Une combinaison des effets de taille et d'oxydation expliquent ces évolutions.

Pour obtenir des nanoparticules de taille homogène et une bonne stœchiométrie, une courte étape de nucléation et une étape de croissance lente sont indispensables. Le contrôle de ces processus est donc la clef de la production de nanoparticules d'oxyde de fer magnétique monodisperses.

Pour conclure, la synthèse par co-précipitation est une méthode très simple à mettre en œuvre, permettant d'obtenir une grande quantité de nanoparticules dans des temps très courts. Cette méthode est de plus très ajustable pour définir la composition et la taille des nanoparticules que l'on veut synthétiser. Cependant, cette méthode a des défauts : en effet, les nanoparticules obtenues ont souvent des formes très inhomogènes et leur taille n'est tout de même pas assez monodisperse pour certaines applications. De plus, il est difficile de contrôler leur degré d'oxydation durant la synthèse et à cela s'ajoute le fait que les nanoparticules sont nues à la fin de la synthèse. Elles ont donc tendance à s'agglomérer en suspension aqueuse.

## B. La décomposition thermique

La synthèse par décomposition thermique est inspirée de la méthode d'élaboration de nanoparticules semi-conductrices de haute qualité en milieu non aqueux<sup>108 109 110</sup>. Elle a été développée dans les années 1990 et, depuis les années 2000, elle a été appliquée à la synthèse de nanoparticules métalliques et de leurs oxydes. Elle permet aujourd'hui d'obtenir des nanoparticules d'oxyde de fer monodisperses avec des tailles contrôlées.

Son principe est basé sur la décomposition d'un précurseur organométallique dans des solvants organiques ayant une température d'ébullition élevée en présence d'agents tensio-actifs stabilisants<sup>111 112 113</sup>. Les précurseurs sont des complexes organométalliques qui peuvent être de type oléate de fer<sup>114</sup>

<sup>115</sup> <sup>116</sup>, acétylacétonate de fer<sup>117</sup> ou carbonyle de fer<sup>118</sup>. Les agents tensio-actifs, qui vont stabiliser les nanoparticules à la fin de la réaction, sont souvent des acides gras<sup>119</sup>, dont l'acide oléique<sup>120</sup> <sup>121</sup>, mais aussi l'hexadécylamine<sup>122</sup> ou des mélanges d'acide oléique et d'oléylamine<sup>123</sup>.

La réaction de décomposition thermique peut être aussi interprétée dans le cadre d'un mécanisme de germination-croissance suivant le model proposé par Victor K. Lamer (Figure 8, page 16). Elle se fait à haute température, car l'équilibre thermodynamique, qui favorise les ruptures des liaisons covalentes des complexes (décomplexation), permet alors l'apport en espèces ioniques nécessaire au déclenchement du processus de germination-croissance.

Dans cette méthode de synthèse, la taille des nanoparticules peut être contrôlée en ajustant un certain nombre de paramètres comme le temps de réaction, la température et la concentration des réactifs et des ligands. En général, la taille des particules augmente avec le temps de réaction. Elle croît aussi avec la température car la vitesse de réaction est plus importante.

Dans le cadre de la synthèse de nanoparticules d'oxyde de fer magnétiques, J. Park et *al.* ont montré qu'avec l'oléate de fer [Fe(oléate)<sub>3</sub>], la taille des nano-objets pouvait être contrôlée grâce à divers solvants possédant chacun une température d'ébullition ( $b_p$ ) différente. Ils ont notamment synthétisé des nanoparticules d'oxyde de fer monodisperses (écart type  $\sigma < 4,1$  %) avec des tailles de 4, 9, 12, 16 et 22 nm en utilisant respectivement de l'hexadécène ( $b_p = 274$  °C), de l'octyl éther ( $b_p = 287$  °C), de l'octadécène ( $b_p = 317$  °C), de l'eicosène ( $b_p = 330$  °C) et de la trioctylamine ( $b_p = 365$  °C). Ils ont remarqué que le diamètre des nanoparticules augmentait avec la température d'ébullition du solvant. Ceci a été attribué à la réactivité du complexe fer-oléate qui devient plus grande quand la température d'ébullition du solvant augmente. Par ailleurs, les phénomènes de croissance sont favorisés pour des températures élevées. D'autres travaux présentés par L. M. Bronstein et *al.* ont également montré que la température de décomposition du précurseur constitue un paramètre important pour le contrôle de la taille<sup>116</sup>.

Cependant, il est difficile d'obtenir des nanoparticules sphériques de taille supérieure à 15 nm par cette technique, et la croissance hétérogène (*seed-mediated growth*) est souvent utilisée afin d'obtenir des particules sphériques de tailles plus importantes. D'autres voies se développent actuellement en utilisant des solvants à points d'ébullition élevés, mais la purification est assez compliquée<sup>114</sup>.

M. V. Kovalenko et *al.* ont, eux, montré que le ligand influait sur la morphologie des nanoparticules d'oxyde de fer<sup>124</sup>. En effet, selon le ligand utilisé (oléate de sodium, acide oléique, oléate de potassium ou aucun) des nanoparticules respectivement cubiques, sphériques, bipyramidales ou de formes sphériques et inhomogènes en taille ont été obtenues, avec pour solvant de l'octadécène mélangé à du diphényle éther ( $b_p = 259$  °C) ou à du tétracosane ( $b_p = 391$  °C).

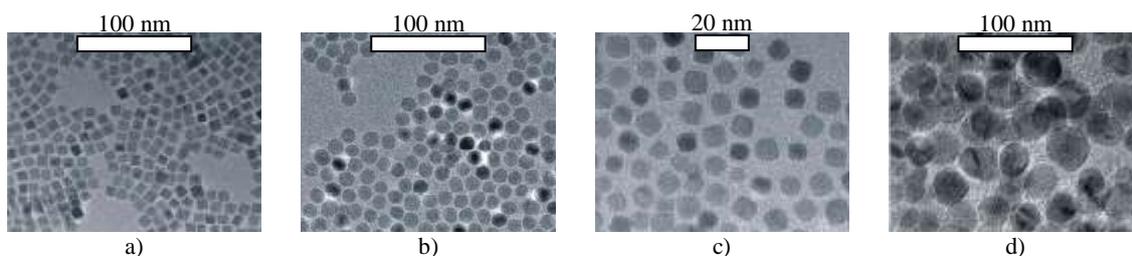


Figure 11 : micrographies MET de nanoparticules d'oxyde de fer synthétisées par décomposition thermique à partir d'oléate de fer avec pour ligands : (a) l'oléate de sodium, (b) l'acide oléique, (c) l'oléate de potassium et (d) aucun<sup>124</sup>.

Le contrôle du degré d'oxydation du fer pendant la synthèse par décomposition thermique est difficile et encore mal compris : il a été constaté par exemple que l'utilisation de complexes à base de  $\text{Fe}^{2+}$  ou de  $\text{Fe}^{3+}$  sous air ou sous atmosphère inerte conduit au même type de particule de composition intermédiaire entre magnétite et maghémite. Park et *al.*<sup>115</sup> ont quantifié la proportion de magnétite et maghémite dans des nanoparticules de taille variables (notées  $(\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3)_{1-x}(\text{Fe}_3\text{O}_4)_x$ ) par spectroscopie d'absorption des rayons X (X-Ray Absorption Spectroscopy, XAS) et dichroïsme magnétique circulaire des rayons X (X-ray Magnetic Circular Dichroism, XMCD). Ils observent une proportion croissante de magnétite en augmentant la taille. La magnétite quasi-stœchiométrique n'est obtenue que pour des tailles supérieures à 22 nm. Ces évolutions sont similaires à celles observées avec les nanoparticules d'oxyde de fer synthétisées par co-précipitation (paragraphe précédent).

Il faut noter qu'il est difficile de différencier la magnétite de la maghémite avec les techniques usuelles disponibles en laboratoire (DRX en particulier), et que beaucoup de travaux font référence à des particules de magnétite stœchiométrique alors qu'il s'agit certainement de magnétite partiellement oxydée, en particulier pour des tailles inférieures à 12 nm.

L'aimantation à saturation de ces nanoparticules issues de la décomposition thermique est du même ordre de grandeur que celle des nanoparticules synthétisées par co-précipitation. Certains rapportent que la synthèse s'effectuant à haute température, elle conduit à des nanoparticules mieux cristallisées et donc avec de meilleures propriétés magnétiques<sup>125</sup>. Cependant, il y a très peu d'études qui comparent les propriétés magnétiques des deux types de nanoparticules.

La décomposition thermique est donc une voie de synthèse très efficace pour la conception de nanoparticules d'oxyde de fer magnétiques stables, non agrégées et non agglomérées, avec une distribution de taille étroite et des formes variées<sup>126 127</sup>. Cependant, cette voie de synthèse est difficile à mettre en œuvre et est onéreuse.

De plus, les nanoparticules obtenues ne sont pas directement applicables dans le domaine biomédical, car étant stabilisées dans des solvants non polaires par des tensio-actifs en fin de réaction, elles ne se dispersent pas dans les milieux aqueux ou physiologiques. La fonctionnalisation de ces nanoparticules pour les rendre biocompatibles est donc plus délicate. Des travaux en cours tentent de surmonter ce problème et une méthode de synthèse par décomposition thermique (en milieu acide ou basique) de nanoparticules pouvant se disperser dans l'eau a déjà été décrite par Z. Li et *al.*<sup>128 129</sup>.

## 1.3 Conclusion

---

Nous avons vu dans ce chapitre que la magnétite est une structure spinelle qui présente des propriétés magnétiques très intéressantes, notamment une forte aimantation à saturation. Cependant elle est très sensible à l'oxydation et les nanoparticules de magnétite superparamagnétiques présentent une aimantation à saturation plus faible que celle de la magnétite massive. Cette phase est très sensible à l'oxydation et plus la taille des nanoparticules est petite, plus la composition tend vers celle de la maghémite. L'aimantation à saturation des nanoparticules d'oxyde de fer varie et tend à augmenter avec la taille des nanoparticules. Cependant, des couches désordonnées en surface peuvent contribuer à la diminution de l'aimantation à saturation.

L'un des objectifs de nos travaux est la synthèse de nanoparticules de magnétite d'un diamètre proche de 10 nm avec une distribution de taille monodisperse et des propriétés magnétiques optimales (aimantation à saturation élevée). Parmi les méthodes de synthèse possibles, nous avons donc choisi celles par co-précipitation et par décomposition thermique. La synthèse par co-précipitation a

l'avantage de se réaliser dans l'eau et permet donc de greffer directement les molécules biocompatibles. Elle a cependant l'inconvénient de conduire à des nanoparticules agglomérées en suspension aqueuse. La décomposition thermique, qui consiste en la décomposition d'un complexe métallique dans un solvant organique en présence de ligands, conduit quant à elle, en général, à des nanoparticules bien cristallisées, avec une monodispersité de l'ordre de 10 %. Ces nanoparticules présentent l'avantage d'être fonctionnalisées *in situ* par une couche organique, ce qui assure leur stabilité en suspension dans les solvants organiques. Cependant il est nécessaire par la suite d'échanger les molécules d'acide gras en surface par des molécules hydrophiles pour rendre les nanoparticules stables en milieu aqueux ou physiologique.

Dans le chapitre suivant nous présenterons les différents modes de stabilisation et de fonctionnalisation des nanoparticules.

## 2 LA FONCTIONNALISATION DES NANOPARTICULES D'OXYDE DE FER

La fonctionnalisation des nanoparticules a souvent pour objectif de contrôler leur taille (synthèse en présence de surfactants comme dans le cas de la synthèse par décomposition thermique), d'assurer leur stabilité en suspension. Elle est également considérée comme un moyen d'apporter de nouvelles fonctions ou propriétés pouvant se combiner à celles de la nanoparticule. Nous allons décrire les paramètres influençant la stabilité des suspensions de nanoparticules, puis nous discuterons de la fonctionnalisation des nanoparticules d'oxyde de fer pour des applications biomédicales.

### 2.1 Stabilité des nanoparticules en suspensions

Dans le domaine biomédical, la fonctionnalisation des nanoparticules d'oxyde de fer est indispensable pour obtenir des suspensions stables dans les milieux physiologiques. La stabilité des nanoparticules est le résultat d'un équilibre entre force attractives et force répulsives. Théoriquement quatre forces interviennent dans le potentiel d'interactions des nanoparticules magnétiques (Figure 12) :

- les forces de van der Waals (attractives) ;
- les forces électrostatiques (répulsives) ;
- les forces magnétiques dipolaires (attractives) ;
- et les répulsions stériques (répulsives) dans le cas des nanoparticules non nues en fin de synthèse.

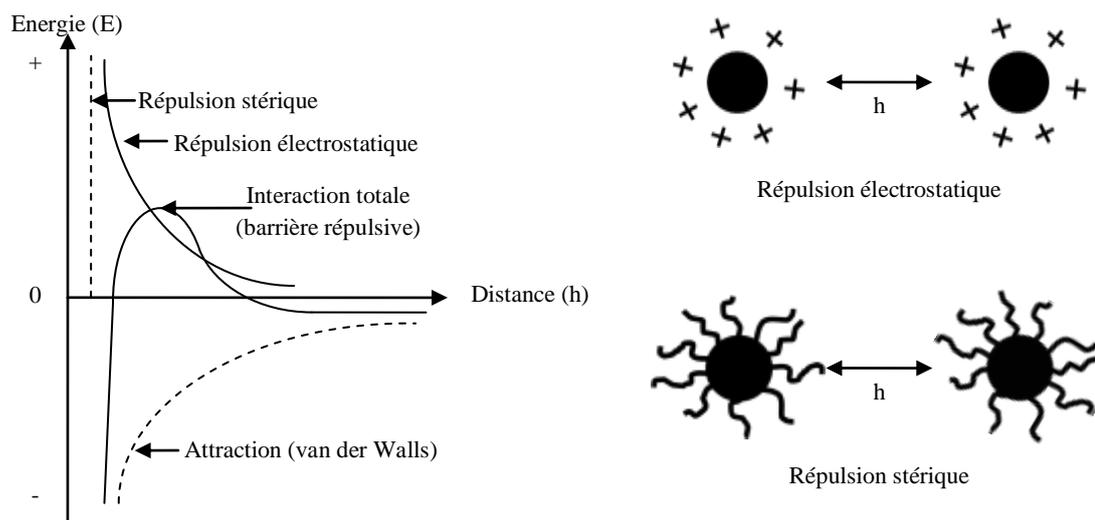


Figure 12 : représentations schématiques (à gauche) des courbes d'énergies d'interaction pour des particules et (à droite) de la stabilité en suspension par répulsions électrostatiques et stériques.

La stabilisation des nanoparticules peut donc être obtenue en jouant soit sur l'une soit sur les deux forces répulsives. Evaluer l'intensité de ces forces est un paramètre clé pour élaborer des suspensions de nanoparticules présentant une bonne stabilité.

Pour augmenter les répulsions stériques, le greffage de molécules organiques très volumineuses à la surface de nanoparticules d'oxyde de fer a été étudié afin d'obtenir des suspensions colloïdales très stables dans le temps. Aujourd'hui, la littérature regorge de publications sur le sujet et presque tous les types de molécules ont été étudiés. Ainsi, de nombreux acides gras ont été testés et en particulier l'acide oléique<sup>130 131 132 133 134 135 136 137 138</sup>. Des polymères tels que l'acide polyméthacrylique<sup>139</sup>, l'acide polyoxyde d'éthylène-b-polyméthacrylique (PEO-PMAA)<sup>140</sup>, ... ont été également étudiés. Nous décrirons les molécules utilisées plus particulièrement dans le domaine biomédical dans le paragraphe suivant.

Les forces stériques sont difficiles à prédire et à quantifier. Elles sont très bien décrites théoriquement pour les polymères. Elles dépendent essentiellement de la masse molaire du polymère et de sa densité. Les mesures de diffusion dynamique de la lumière, qui donnent la distribution de taille des nanoparticules en suspension, peuvent être un bon moyen d'évaluer la stabilité des nanoparticules par répulsion stérique. En mesurant le rayon hydrodynamique des nanoparticules, ces mesures donnent une indication sur l'épaisseur de couche. L'efficacité de la couche se juge alors sur l'évolution de la distribution de taille en fonction du temps.

La répulsion électrostatique peut être suivie grâce à la connaissance du potentiel de diffusion qui est très proche du potentiel zêta<sup>141 142</sup> et qui dépend principalement de la force ionique et du pH de la solution. La stabilisation des nanoparticules passe donc par la modification des propriétés de surfaces.

Les nanoparticules d'oxyde de fer peuvent être naturellement stables en milieu aqueux. En effet, les ions ferreux et ferriques de surface agissent comme des acides de Lewis qui peuvent se coordonner avec des molécules qui leur donnent des paires d'électrons célibataires. Par conséquent, dans les milieux aqueux, les atomes de fer se coordonnent avec les molécules d'eau qui se dissocient facilement pour former à la surface de l'oxyde de fer des fonctions hydroxyles. Les groupes hydroxyles sont amphotères et peuvent réagir avec les acides et les bases<sup>143</sup>. Ainsi, en fonction du pH de la solution, la surface des nanoparticules d'oxyde de fer peut être chargée positivement ou négativement. Le point isoélectrique (PIE) est le pH pour lequel la surface présente autant de groupements chargés positivement que de groupements chargés négativement : le PIE des nanoparticules d'oxyde de fer est à pH = 6,8<sup>144</sup>. Autour de ce pH, les nanoparticules flocculent et sédimentent en suspension. Aux pH éloignés de ce PIE, les nanoparticules sont en répulsion électrostatique : aux pH acides, elles sont chargées positivement, aux pH basiques, elles sont chargées négativement (*Figure 13*, annexe 198).

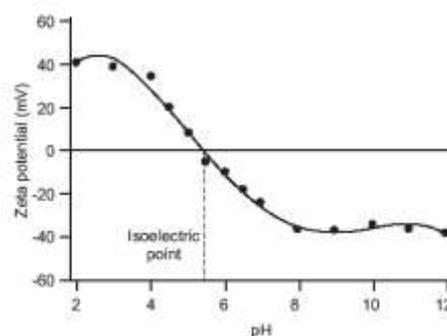


Figure 13 : courbe caractéristique du potentiel zêta en fonction du pH.

Le pH des milieux physiologiques qui est de l'ordre de 7,4 est proche du PIE des nanoparticules. Il ne permet donc pas la stabilité des nanoparticules d'oxyde de fer nues par interactions électrostatiques. Pour augmenter les interactions électrostatiques au pH des milieux physiologiques, l'adsorption de contre-ions tels que des citrates et l'enrobage dans des coques de silice<sup>145 146</sup>, d'or<sup>147 148</sup> et de gadolinium<sup>149</sup> ont été étudiés. Ainsi, le point isoélectrique des nanoparticules peut être décalé à un pH

= 2 en utilisant des citrates ou à un pH = 4 en enrobant les nanoparticules d'oxyde de fer avec de la silice <sup>146</sup>.

Nous noterons que ces modifications de surface n'interviennent pas uniquement pour stabiliser les nanoparticules par répulsion électrostatique, mais aident également au greffage de nombreux ligands organiques. En effet, la silice par exemple est connue pour présenter un grand nombre de groupements hydroxyle en surface ce qui facilite les interactions ultérieures avec d'autres molécules organiques. Ces modifications servent alors d'intermédiaires entre la surface des nanoparticules et le point d'ancrage des nouveaux ligands.

La tendance actuelle est de greffer à la surface des nanoparticules des molécules qui vont pouvoir assurer une stabilisation électrostatique : ces molécules seront assez volumineuses pour induire une répulsion stérique et portent en périphérie des groupements chargés (carboxylate, ammonium, sulfate...) qui vont induire une répulsion électrostatique.

## **2.2 Fonctionnalisation des nanoparticules dans le domaine biomédical**

---

Dans le domaine biomédical, l'objectif est de fonctionnaliser les nanoparticules par des molécules qui vont permettre d'assurer : - une bonne stabilité des nanoparticules en suspension dans des milieux physiologiques ; - de les rendre biocompatibles et - d'apporter des fonctions permettant une vectorisation ou la délivrance de médicaments. De plus, la force de liaison entre la molécule et la surface des nanoparticules doit être suffisamment forte pour éviter la désorption des molécules dès leur introduction en milieu physiologique. En effet, les milieux physiologiques (tampons, sang) contiennent bon nombre de protéines qui peuvent s'échanger avec les molécules organiques présentes à la surface des nanoparticules si ces dernières ne sont pas liées de manière forte. Ce phénomène favoriserait ainsi l'agrégation et empêcherait les nanoparticules d'atteindre leur cible (biodistribution faible des nanoparticules). Pour éviter ce problème, une liaison covalente entre les molécules et les nanoparticules est une condition primordiale afin de limiter les « décrochages » ultérieurs dans les milieux biologiques. La couverture organique doit aussi permettre d'éviter que les protéines présentes dans les milieux biologiques n'interagissent avec la surface des nanoparticules afin de limiter leur agrégation.

La fonctionnalisation des nanoparticules pour des applications dans le domaine biomédical peut adopter plusieurs formes qui vont de la simple couche de molécule greffées à l'encapsulation dans un liposome ou une coque. Une ou plusieurs couches de molécules peuvent être greffées pour former des nanoparticules multifonctionnelles<sup>150 151</sup> (Figure 14). Dans ce mémoire, nous ne traiterons que de la fonctionnalisation des nanoparticules et n'aborderons pas les méthodes d'encapsulation de plusieurs nanoparticules dans des coques organiques ou inorganiques.

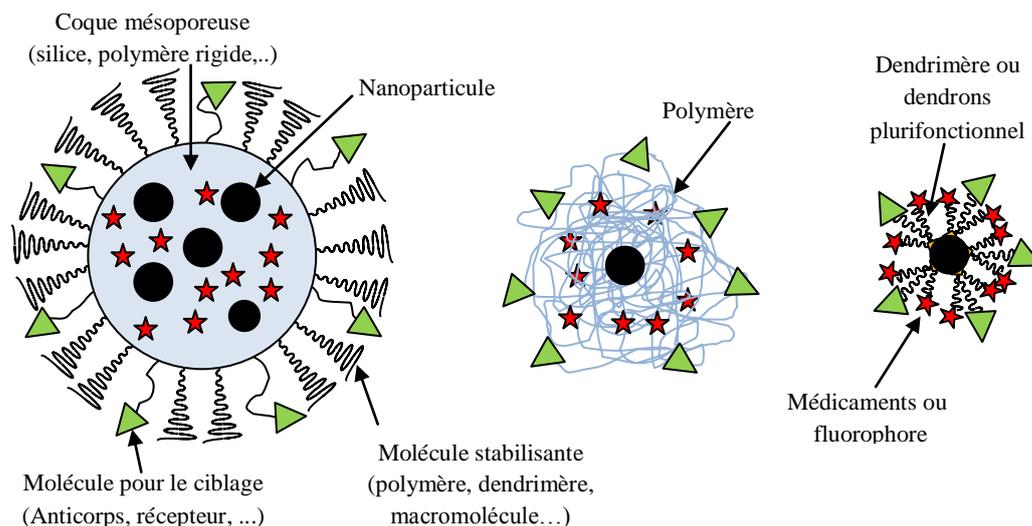


Figure 14 : schéma représentatif de voies d'élaboration de nanoparticules multifonctionnelles

### 2.2.1 Fonctionnalisation suivant la méthode de synthèse des nanoparticules

On peut distinguer deux grandes méthodes de fonctionnalisation suivant la méthode de synthèse des nanoparticules. Si la synthèse des nanoparticules conduit à des nanoparticules « nues », les molécules peuvent être greffées directement à la surface des nanoparticules. Dans cette voie, les nanoparticules et les molécules sont synthétisées séparément puis les molécules sont introduites dans la suspension de nanoparticules dans des conditions de pH qui dépendent de l'architecture de la molécule et des groupements fonctionnels qu'elle porte. Cette méthode est la plus utilisée car la plus simple à mettre en œuvre. Elle est très adaptée pour le greffage d'une ou de plusieurs couches de molécules à la surface des nanoparticules.

Des voies de synthèse impliquent la présence des molécules qui, *in situ* au cours de la synthèse vont venir couvrir la surface des nanoparticules. La voie de synthèse par décomposition thermique en est un exemple et nécessite des étapes supplémentaires de fonctionnalisation comme des échanges de ligands<sup>152</sup>, pour rendre les nanoparticules stables dans les milieux aqueux et physiologiques. Plusieurs méthodes d'échange de ligands existent. Les échanges de ligands peuvent se faire directement dans un milieu monophasé<sup>167 168 153</sup> ou dans un milieu biphasé avec échange de ligands et transfert de phase<sup>154 155 156</sup>. Dans les milieux biphasés, les nanoparticules passent directement de la phase organique à la phase aqueuse par transfert de phase.

Les conditions de greffage dépendent non seulement de la méthode de synthèse des nanoparticules, mais aussi du mode de couplage entre la molécule et la nanoparticule. Les principaux modes d'interactions des molécules avec la surface des nanoparticules sont l'interaction électrostatique ou le greffage covalent. Ces différents modes de greffage sont détaillés dans le paragraphe suivant.

### 2.2.2 Modes d'interaction des molécules avec la surface des nanoparticules

Les molécules peuvent interagir électro statiquement avec la surface des nanoparticules, mais ce mode de couplage n'est pas suffisamment fort pour des applications biomédicales. C'est pourquoi des modes de greffage favorisant une liaison forte avec la surface des nanoparticules ont été développés.

Dans la plupart des études, les molécules sont greffées via un agent de couplage qui peut être une fonction silane, ou des groupements comme des carboxylates, des sulfates, des phosphonates<sup>13 157</sup>. Le principal groupement utilisé jusqu'à maintenant était le carboxylate, mais la fonctionnalisation de nanoparticules d'oxyde par des molécules portant des groupements phosphonates se développe de plus en plus<sup>158 159 160</sup>. Ces groupements possèdent en effet de fortes affinités avec le fer. Ils forment des liaisons covalentes qui permettent le développement de voies de greffage directes pour lesquelles les taux de greffage sont beaucoup plus élevés qu'avec les autres groupements.

De plus, la phosphatation des surfaces métalliques est très connue pour assurer la protection des matériaux métalliques ferreux ou non ferreux contre la corrosion oxydante. L'utilisation du groupement phosphonate comme agent de couplage préserve les nanoparticules de l'oxydation. En effet, les ions  $Fe^{2+}$  dans la magnétite sont très sensibles à l'oxydation et il a été observé que l'oxydation des ions  $Fe^{2+}$  augmente en présence de ligands organiques dans l'ordre suivant : perchlorate > fluorure > nitrate > chlorure > carbonate > sulfate > silicate > phosphate<sup>161</sup>. Le groupement phosphonate permet donc de conserver les propriétés magnétiques des nanoparticules contrairement au groupement carboxylate qui induit un « canting » de spin dans la couche oxydée de surface avec une diminution du moment magnétique des nanoparticules<sup>162</sup>.

Des enrobages des nanoparticules par de la silice ont été également réalisés avant de procéder au greffage des molécules<sup>163 164 165 166</sup>. Cette méthode de greffage indirect permet de greffer de manière covalente des molécules sur la surface des nanoparticules. D'autres exemples du même type existent avec le copolymère triblocs Pluronic F127<sup>167 168</sup>.

Les méthodes de greffage direct via des agents de couplage permettent d'obtenir des monocouches de molécules. Les conditions de greffage optimales doivent être mise au point : influence du pH, de la concentration... Par exemple, dans le cas de molécules possédant des groupements phosphonates, il a été montré que lors du greffage dans l'eau, il était nécessaire d'avoir des interactions électrostatiques entre la surface des nanoparticules et le groupement phosphonate.

Les étapes de fonctionnalisation peuvent être plus complexes également. Par exemple le greffage de molécules de dextran à la surface de nanoparticules consiste dans un premier temps, à élaborer une solution colloïdale de nanoparticules de maghémite, puis à induire une modification de la surface par le greffage de groupements aminopropylsilane  $(-O)_3Si-CH_2-CH_2-CH_2-NH_2$ . Par la suite, ces groupements sont fonctionnalisés par du dextran partiellement oxydé pour conduire à la formation d'une imine appelée aussi base de Schiff. Cette imine est ensuite réduite. Ce type de synthèse « étape par étape » (Figure 15) permet de contrôler, la taille du noyau magnétique de 2 à 10 nm, la distribution de taille et le diamètre hydrodynamique global.

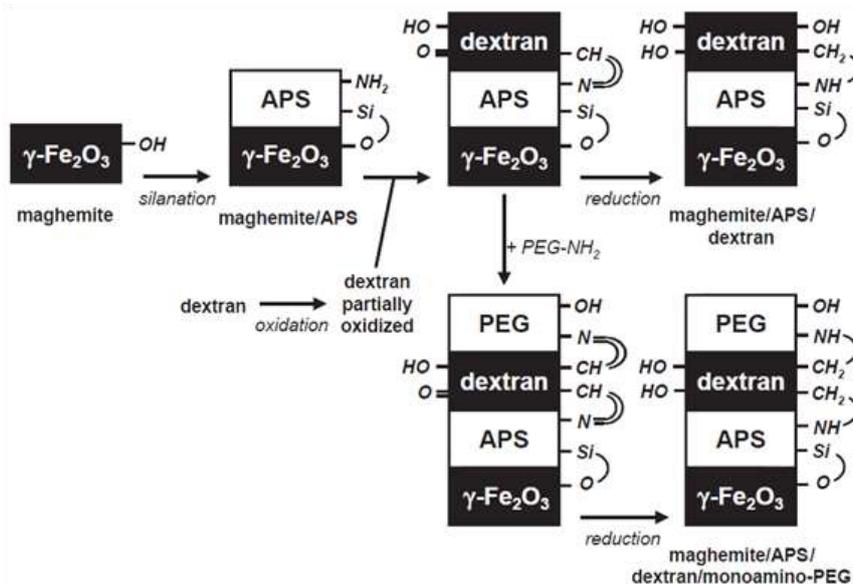


Figure 15 : les différentes étapes de synthèse d'agents de très petites tailles<sup>193</sup>.

### 2.2.3 Les principales molécules greffées

Différents types de molécules ont été greffés à la surface des nanoparticules pour des applications dans le domaine biomédical<sup>169</sup>. Les nanoparticules ont surtout été fonctionnalisées par des polymères volumineux tels que le dextran<sup>170 171 172 173</sup>, le Chitosan<sup>174 175</sup>, l'alcool polyvinylique (PVA)<sup>176 177 178</sup>, le polyéthylène glycol (PEG)<sup>99 179 180 181 182</sup> car ils sont biocompatibles et hydrophiles<sup>76 169</sup>. Des molécules de type dendritique<sup>183 184 185</sup> sont également utilisées car elles possèdent de nombreux atouts dont nous discuterons dans la partie suivante.

Le Tableau 4 donne les avantages de certains polymères utilisés pour leurs applications dans le domaine biomédical.

Tableau 4 : exemple de polymères utilisés dans le domaine biomédical.

Polymère/molécule	Avantages
PEG	Améliore la biocompatibilité, le temps de circulation dans le sang et l'efficacité de l'internalisation des nanoparticules
Dextran	Améliore le temps de circulation dans le sang, stabilise la solution colloïdale
Polyvinylpyrrolidone (PVP)	Améliore le temps de circulation dans le sang, stabilise la solution colloïdale
Polyvinyl Alcohol (PVA)	Empêche la coagulation des particules
Polyacrylic Acid	Augmente la stabilité et la biocompatibilité des particules, aide à la bioadhésion
Polypeptides	Marquage cellulaire
Phosphorylcholine	Biocompatible, utilisé dans les maladies cardio-vasculaires, stabilise la solution colloïdale
Poly (D, L- lactide)	Biocompatible et faible cytotoxicité
Poly(N-isopropylacrylamide) (PolyNIPAAm)	Administration de médicaments thermosensibles, aide au tri des cellules
Chitosan	Polymère naturel biocompatible et hydrophile, régénération des tissus, vectorisation de médicaments

Ainsi, la fonctionnalisation des nanoparticules d'oxyde de fer magnétiques avec ces molécules a donné de nombreux résultats dont voici quelques exemples :

- Les nanoparticules enrobées de PEG ont révélé une excellente solubilité et stabilité en solution aqueuse ainsi qu'en milieu physiologique<sup>186</sup>. Le Feruglose (Clariscan) est constitué de nano-objets qui peuvent être considérés comme de véritables « nanoparticules d'infiltration ». Ceci résulte de la pégylation de l'amidon qui constitue leur couche fonctionnelle. Elles sont ainsi très facilement reconnues par les macrophages et sont donc appropriées pour les imager<sup>187 188</sup> ;
- E. H. Kim et al.<sup>189</sup> ont synthétisé par une méthode sonochimique des nanoparticules d'oxyde de fer destinées à être utilisées comme agents de contraste IRM. En les recouvrant d'acide oléique comme surfactant puis en les dispersant dans le chitosan, ces nano-objets sphériques d'environ 15 nm de diamètre ont montré un comportement superparamagnétique exploitable pour détecter des embolies en IRM ;
- M. Chastellain et al.<sup>190</sup> ont conçu des nanoparticules d'oxyde de fer enrobées de PVA. La stabilité colloïdale du produit final recouvert de polymère ainsi que la distribution de taille des nano-objets ont été déterminées pour différents rapports de masse de fer/ masse de polymère. Un modèle théorique pour les mécanismes de stabilisation a été proposé à partir de résultats obtenus. Les auteurs ont ainsi montré qu'un rapport égal à 2 joue un rôle majeur dans les tests de cytotoxicité sur des cellules de mélanome humain en culture<sup>191</sup> ;
- Enfin, une nouvelle génération d'agents T<sub>2</sub> (30 nm), basée sur un noyau de maghémite lié par des liaisons covalentes à des macromolécules de dextran, a été mise au point par l'équipe de E. Duguet à Bordeaux et sont appelés VUSPIO (Versatil Ultrasmall SuperParamagnetic Iron Oxide)<sup>192 193 194</sup>.

En conclusion, les polymères ont été les premiers à être utilisés pour la fonctionnalisation de nanoparticules. De nombreux nano-objets conçus avec de tels enrobages sont déjà utilisés dans les hôpitaux. Toutefois, l'épaisseur des enrobages polymériques entraîne une augmentation significative du diamètre hydrodynamique des nano-objets, ce qui limite leur utilisation à des applications biomédicales comme l'IRM cardiovasculaire. Les stratégies actuelles s'orientent vers le greffage de molécules plus petites comme le DMSA (l'acide dimercaptosuccinique)<sup>195</sup> ou les dendrimères<sup>196 197</sup>.

#### 2.2.4 Les dendrons étudiés

---

Un dendrimère est une macromolécule constituée d'unités de base, les dendrons, qui s'associent selon un processus arborescent autour d'un cœur plurifonctionnel. Ces structures sont synthétisées par une synthèse en « cascade » en utilisant une séquence itérative d'étapes réactionnelles.

Le concept de dendrimère, évoqué par P. J. Flory dans les années 1940<sup>198 199 200</sup> ne s'est concrétisé qu'à la fin des années 1970 et au début des années 80 grâce aux groupes de F. Vögtle<sup>201</sup>, R. G. Denkewalter<sup>202</sup>, D. A. Tomalia<sup>203</sup> et G. R. Newkome<sup>204</sup>. Les années 1980 furent donc consacrées à la mise au point de méthodes de synthèse de dendrimères et ce n'est qu'à partir du début des années 1990 que leurs propriétés commencèrent à être explorées<sup>205</sup>.

Les dendrimères et dendrons ont de nombreux atouts pour des applications biomédicales<sup>206</sup> telles que :

- les propriétés pharmacocinétiques et la biodistribution peuvent être contrôlées en changeant la taille du dendrimère et sa conformation. Cela peut être effectué avec précision en faisant varier la génération du dendrimère ou du dendron ou la longueur et le nombre de chaînes périphériques ;

- leurs propriétés biologiques peuvent être attribuées à une seule entité moléculaire et non à une distribution statistique de matériaux polymères ou « auto-assemblés ». Ceci facilite la reproductibilité des données pharmacocinétiques ;
- la possibilité de fonctionnaliser avec différents médicaments, chromophores ou ligands, que ce soit en périphérie ou au cœur ;
- la biodégradabilité qui peut prévenir l'accumulation et les possibles effets biologiques toxiques de ces molécules de synthèse ;
- la dégradation contrôlée, qui peut être atteinte grâce à un choix judicieux de la chimie des dendrimères.

La précision structurale des dendrimères motive donc de nombreuses études biomédicales. Les structures chimiques des dendrimères communément utilisés pour des applications biologiques sont basées sur des polyamidoamines<sup>207</sup>, polyamines<sup>208 209</sup>, polyamides (polypeptides),<sup>210</sup> poly(aryl éthers)<sup>211 212</sup>, polyesters<sup>213 214</sup>, carbohydrates<sup>215</sup> et l'ADN<sup>216 217</sup>. Les dendrimères phosphorés sont également étudiés pour leur potentiel d'applications dans le domaine biomédical<sup>218 219</sup> car le phosphore est un élément qui joue des rôles multiples en biologie<sup>218 220</sup> (structure de l'ADN, de l'ATP (Adénosine TriPhosphate), membrane cellulaire...).

Les dendrimères sont surtout utilisés aujourd'hui pour la vectorisation de médicaments et/ou la conception d'agents de contraste positifs en IRM où les chélates dendritiques de gadolinium sont largement étudiés. Peu d'études sur la fonctionnalisation de nanoparticules par des dendrimères ont été réalisées dans le but de concevoir des agents de contraste négatifs<sup>184 221 222</sup>. Pourtant, par opposition aux polymères, les dendrimères présentent de nombreux avantages tels que leur petite taille, leur monodispersité et leur plurifonctionnalité contrôlable. Ils peuvent donc permettre l'enrobage des nanoparticules en formant une monocouche de faible épaisseur et plurifonctionnelle sans altérer significativement le diamètre hydrodynamique (voir l'exemple de droite de la Figure 14).

## 2.3 Conclusion

---

La fonctionnalisation des nanoparticules d'oxyde de fer est nécessaire pour assurer leur stabilité en suspension à des pH physiologiques car les nanoparticules nues ne sont pas stables en suspension à ces pH (point isoélectrique à 6,8). La méthode de fonctionnalisation dépend de la méthode de synthèse des nanoparticules ; ainsi, un greffage direct peut être réalisé si les nanoparticules sont « nues » alors qu'une méthode d'échange de ligands est nécessaire si la synthèse conduit à des nanoparticules recouvertes d'un surfactant. Les conditions de greffage sont optimisées pour conduire à une liaison forte entre la molécule et la surface des nanoparticules et des agents de couplage sont généralement utilisés comme des silanes, des groupements phosphonates...

Nous avons vu que les polymères sont déjà largement utilisés pour la fonctionnalisation des nanoparticules. Cependant, leur grande taille provoque souvent une forte augmentation du rayon hydrodynamique des nano-objets ce qui limite leurs applications. Les approches de greffage avec des dendrons peuvent apporter une solution efficace à ces problèmes.

## 3 L'IRM ET LES AGENTS DE CONTRASTE

---

Dans ce chapitre, après un bref historique sur l'IRM nous expliquerons ce que sont les agents de contraste, comment ils fonctionnent et interagissent dans le corps pour améliorer le contraste des images en IRM. Nous donnerons ensuite les paramètres importants et décrirons les agents de contraste actuellement développés avec leurs points forts et leurs points faibles.

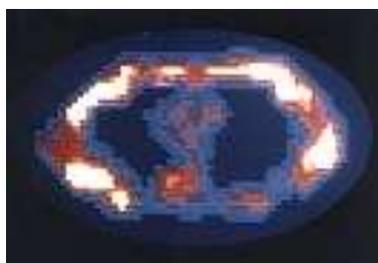
### 3.1 Historique sur L'IRM

---

L'Imagerie par Résonance Magnétique est une technique d'imagerie médicale apparue au début des années 80. Elle permet d'avoir une vue 2D ou 3D d'une partie du corps et est devenue l'une des techniques de diagnostic les plus performantes. Le nom complet de l'IRM est en fait Imagerie à Résonance Magnétique Nucléaire (ou IRMN). Le terme nucléaire est souvent omis pour ne pas effrayer les patients qui associent souvent, et à tort, le mot nucléaire avec les rayonnements ionisants (radioactivité).

L'IRM repose sur le principe de la Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) qui a été décrit par F. Bloch et E. M. Purcell en 1946. La RMN a été développée initialement pour les besoins de l'analyse chimique. A partir des années 60, les nombreux développements que connaît la RMN laissent entrevoir de nouvelles applications pour cette technique. Ainsi, R. V. Damadian propose dès 1969 d'utiliser la RMN dans un but médical et appuie sa proposition avec la démonstration que la spectroscopie RMN permet la détection de tumeurs<sup>223</sup>.

Dans les années qui suivent, des progrès très importants sont accomplis par P. Lauterbur (première image basée sur la RMN en 1973<sup>224</sup>) et P. Mansfield (technique de l'imagerie écho planétaire en 1977<sup>225</sup>). Aussi, grâce aux progrès de l'informatique et de l'électronique qui permettent de mettre en œuvre des méthodes numériques coûteuses en temps de calcul, une première image d'une partie d'un corps humain vivant (Figure 16) est obtenue en 1977<sup>226 227</sup>. Elle a été réalisée par R. V. Damadian qui dirigera ensuite la fabrication des premiers appareils commerciaux.



*Figure 16 : section de la cage thoracique, première image IRM du corps humain réalisée le 3 juillet 1977.*

L'IRM est aujourd'hui devenue une technique puissante dans le domaine de l'imagerie médicale et est sans cesse en développement. Elle est largement utilisée dans les hôpitaux et les cliniques pour les nombreux avantages qu'elle apporte malgré un coût relativement élevé de l'équipement (entre 760000 et 3000000 €) et de la maintenance. En effet, l'IRM est non invasive, ce qui permet d'éviter les opérations chirurgicales pour établir des diagnostics. Elle fournit essentiellement des images anatomiques, mais peut aussi informer de l'état physicochimique des tissus, des flux métaboliques ou de l'effet de certaines thérapies<sup>228 229 230 231</sup>. Dans de nombreux cas, l'IRM est le seul moyen d'obtenir un diagnostic non ambigu, spécialement dans la détection d'anomalies cérébrales, de la sclérose en

plaques et des lésions situées dans des régions sujettes à des artefacts. En revanche, l'IRM ne permet pas l'étude des tissus osseux et donc la recherche de fractures.

Faire une image en IRM consiste à collecter les signaux RMN émis par les protons des molécules d'eau, qui sont présentes à 60% dans le corps. Ces signaux RMN ont pour origine les temps de relaxation des protons lorsqu'ils sont soumis à un champ magnétique intense et un champ radiofréquence. Ils diffèrent selon les tissus, la densité de protons dans ces tissus et les mouvements moléculaires (rapides ou lents). Ceci permet de définir des contrastes et d'obtenir une image. Malheureusement les temps de relaxation, longitudinale ( $T_1$ ) et transversale ( $T_2$ ), sont relativement longs et, malgré une résolution des images excellente, la sensibilité de l'IRM en est fortement affectée. L'IRM devient alors insuffisante pour la plupart des examens.

En conséquence, pour améliorer la qualité des images obtenues, l'utilisation d'agents de contraste magnétiques a été abordée à partir des années 1980. Ces centres magnétiques sont introduits dans la région fonctionnelle ou anatomique qui doit être imagée afin d'augmenter, en réduisant les temps de relaxation des protons, les différences de contraste entre les tissus sains et malades. En effet, ils créent dans leur voisinage un champ magnétique approximativement un millier de fois plus fort que celui correspondant aux seuls protons de l'eau. En interagissant ainsi avec ces derniers, ils permettent de multiplier le nombre de mesures tout en diminuant les temps d'acquisition. Le rapport signal sur bruit des mesures est ainsi amélioré et donc le contraste des images réalisées l'est également (Figure 17).

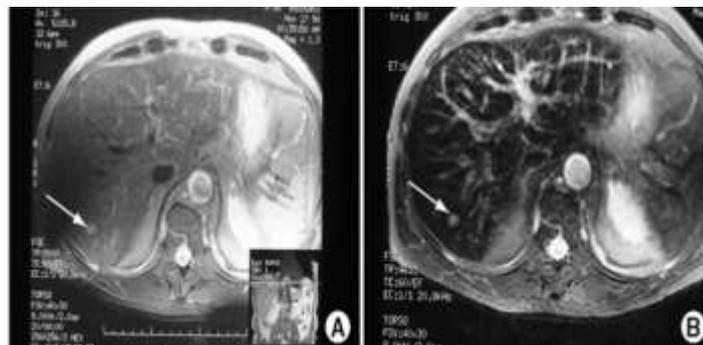


Figure 17 : cliché d'une métastase (flèche) dans un foie avant (A) et après injection (B) intraveineuse d'Endorem (Laboratoire GUERBET, particules de 80 à 120 nm)<sup>232</sup>. L'Endorem, après avoir été capté par les macrophages du foie (70% de la dose injectée), permet de faire ressortir sur l'image les modules métastatiques par rapport aux tissus environnants.

Les potentialités de l'IRM sont grandement liées aux développements des agents de contraste et de nos jours, près de 30 % des examens IRM nécessitent l'emploi d'un tel agent. Ce nombre continuera de croître car la recherche scientifique, avec le développement des nanotechnologies et la chimie des surfaces ne cessent de multiplier leurs variétés et leurs applications.

## 3.2 Les agents de contraste en IRM

---

Nous avons expliqué précédemment l'importance d'utiliser des agents de contraste en IRM. Ceux-ci permettent dans leur voisinage, par leurs propriétés magnétiques, de diminuer les temps de relaxation des molécules d'eau dans le corps. Nous allons décrire maintenant ce que sont les temps de relaxation et la relaxivité pour comprendre le fonctionnement d'un agent de contraste.

### 3.2.1 Les temps de relaxation et l'imagerie IRM

Les temps de relaxation ont pour origine des phénomènes qui font intervenir des mécanismes bien distincts (annexe 2).

Lorsqu'une population de protons est soumise à un champ magnétique permanent  $\vec{B}_0$ , les spins des protons s'alignent sur le champ et se répartissent inégalement sur des niveaux de basse énergie (dans le sens du champ) et de haute énergie (dans le sens opposé). Ainsi, un état d'équilibre se forme où la surpopulation du niveau de basse énergie fait apparaître une aimantation globale dite « longitudinale » dans le même sens que le champ  $\vec{B}_0$ .

L'excitation du système par l'impulsion d'une onde électromagnétique (impulsion radiofréquence) dont la fréquence est égale à la fréquence de Larmor des protons (conditions de résonance) provoque, par une répartition équitable des protons sur les deux niveaux d'énergie, la disparition de l'aimantation longitudinale. Cependant, les spins des protons entrent en phase et font apparaître une aimantation dite « transversale » qui est perpendiculaire au champ  $\vec{B}_0$ .

Cet état est instable et dès la fin de l'excitation le système retourne à l'équilibre par les phénomènes inverses. Il y aura alors une repousse progressive de l'aimantation longitudinale (relaxation  $T_1$ ) lorsque le niveau de basse énergie se repeuple en surnombre et une décroissance de l'aimantation transversale lorsque les spins des protons se déphasent (relaxation  $T_2$ ).

### 3.2.2 La relaxation longitudinale

La repousse de l'aimantation longitudinale se fait selon une exponentielle croissante dont la constante de temps est  $T_1$ .  $T_1$  correspond à 63 % de la repousse de cette aimantation (Figure 18). Ce type de relaxation est aussi appelé relaxation spin-réseau car les protons, lors de leur retour sur le niveau de basse énergie, restituent l'énergie qu'ils ont absorbée par interaction avec le milieu environnant ou réseau. Cette restitution se fait sous forme d'échange thermique et est d'autant plus efficace que la fréquence de collision moléculaire du milieu environnant est proche de la fréquence de Larmor. Ainsi, plus la fréquence de collision moléculaire est proche de la fréquence de Larmor, plus les temps de relaxation  $T_1$  sont raccourcis. Dans les tissus gras par exemple, qui sont composés de grosses molécules dont les mouvements moléculaires sont lents, les conditions sont respectées et le  $T_1$  est court. A l'inverse, les molécules d'eau liquide ont un mouvement trop rapide et les conditions ne sont plus remplies. Le  $T_1$  de l'eau liquide est donc très élevé (Tableau 5 page 34).

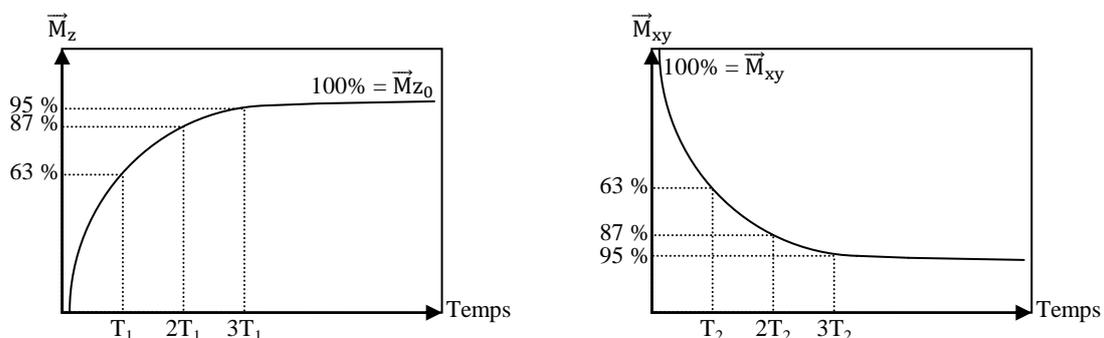


Figure 18 : schéma représentatif de la repousse de l'aimantation longitudinale (à gauche) et la dissipation de l'aimantation transversale (à droite).

### 3.2.3 La relaxation transversale

La relaxation  $T_2$  se fait selon une exponentielle décroissante car elle correspond à la disparition de l'aimantation transversale.  $T_2$ , qui est ici la constante de temps de l'exponentielle, correspond à 63 % de la décroissance de l'aimantation (Figure 18). Ce type de relaxation n'est pas la conséquence de phénomènes d'échanges d'énergie, mais le résultat d'interactions entre les spins des protons et est aussi appelé relaxation spin-spin. Les temps de relaxation  $T_2$  sont jusqu'à 10 fois inférieurs aux temps de relaxation  $T_1$  car la perte de cohérence de phase des protons (la dissipation de l'aimantation transversale) est très brève. Ils sont aussi fortement influencés par la fréquence des collisions moléculaires. En effet, dans l'eau liquide pure par exemple, à cause des mouvements trop rapides des molécules, les champs magnétiques locaux qui sont supposés déphaser les protons (annexe 2) en fréquence de Larmor s'annulent. Le  $T_2$  de l'eau liquide est alors plus long que celui de grosses molécules (Tableau 5).

Tableau 5 : quelques exemples de temps de relaxation, en millisecondes, mesurés sur des tissus humain, sous un champ principal de 1,5 Tesla et à 37°C<sup>233234</sup>.

Nature	$T_1$		$T_2$		Teneur en eau
Eau	3000	100	1500		100 %
Liquide céphalo-rachidien	2500		1000		99 %
Sang	≈ 1200		327	± 40	83 %
Cœur			44	± 6	80 %
Substance grise	1086	± 84	≈ 95		76 %
Muscle	1060	± 155	35	± 4	75 %
Substance blanche	778	± 228	79	± 8	76 %
Rein	709	± 60	61	± 11	81 %
Foie	≈ 600		54	± 8	70 %
Graisse	200		75		10 %

### 3.2.4 La conception de l'image

La mesure des temps de relaxation  $T_1$  et  $T_2$  des protons permet de reconstruire l'image d'un objet. Le principe est de collecter ces signaux dans chaque volume élémentaire de l'objet, appelés voxels. Ces voxels sont individualisés au moyen de séquences combinant des gradients de champ magnétiques et des impulsions radiofréquences (de 5 à 100 MHz) de façon à ce que, à chacun d'entre eux, corresponde une fréquence de résonance qui lui est propre. Les séquences impulsionnelles utilisées en IRM sont les mêmes qu'en RMN (écho de spin, inversion/récupération, ...). L'ensemble des mesures réalisées est rassemblé par un ordinateur qui est capable de décoder en phase et en fréquence les différents voxels du plan observé et d'en restituer leurs intensités. Une image en échelle de gris correspondant à une coupe de l'objet est ainsi restituée en fonction de l'intensité du signal de chaque point.

De nos jours, la méthode la plus utilisée en IRM pour mesurer les  $T_1$  et les  $T_2$  est l'écho de spin. Cette méthode permet d'obtenir, par des séquences impulsionnelles dites « pondérées en  $T_1$  ou  $T_2$  », des images d'une très bonne qualité. Les images pondérées en  $T_2$  sont généralement plus sensibles que celles pondérées en  $T_1$  pour distinguer les variations de contraste liées à la présence de pathologies. La mesure avec une séquence d'écho spin reste encore très longue. D'autres méthodes existent pour faire de l'imagerie rapide (« Turbo Spin Echo ») ou ont été développées pour mieux imagier certains tissus en éliminant les signaux de l'eau libre ou des graisses. Ces méthodes diminuent les temps

d'acquisitions, mais elles deviennent sensibles aux artefacts et la durée moyenne d'un examen IRM est encore d'une heure. Le développement d'agents de contraste a été donc une nécessité pour réduire les coûts d'utilisation de l'IRM tout en améliorant le diagnostic.

### 3.2.5 La relaxivité ou taux de relaxation

Pour comprendre comment agit un agent de contraste il faut introduire la notion de relaxivité R. La relaxivité d'un proton, ou vitesse de relaxation, est directement liée au temps de relaxation par la formule<sup>241 243</sup> :

$$R_{i,p}(\text{en } \frac{1}{\text{mMs}}) = \frac{1}{T_{i,p}}$$

où  $T_i$  peut être  $T_1$  ou  $T_2$ .

En présence d'un agent de contraste la relaxivité de protons augmente car elle résulte de l'addition de la relaxivité intrinsèque des protons et de la contribution de la relaxivité de l'agent. Elle peut être décrite par la formule suivante :

$$R_{i,p,\text{obs}} = R_{i,p} + R_{i,\text{ac}}[C] = \frac{1}{T_{i,p}} + R_{i,\text{ac}}[C]$$

- $R_{i,p,\text{obs}}$  est la relaxivité observée ;
- $R_{i,p}$  est la relaxivité intrinsèque des protons ;
- $R_{i,\text{ac}}$  est la relaxivité des agents de contraste, définie comme la contribution qu'un agent apporte à la concentration de 1 mM aux vitesses de relaxation des protons de l'eau ;
- $[C]$  est la concentration des agents en mM/L.

Le pouvoir contrastant des agents est directement lié à la valeur de  $R_{i,\text{ac}}$  et est donc un bon moyen d'évaluer son potentiel. L'efficacité des agents sur les temps de relaxation est d'autant plus forte que sa concentration est élevée. Cette relation peut permettre de déterminer la relaxivité d'un agent en fonction de sa concentration (Figure 19), mais sa linéarité n'est pas vérifiable. En effet, des paramètres extrinsèques à l'expérience tels que les paramètres d'acquisition des séquences peuvent faire chuter la relaxivité. En conséquence, une simple extrapolation de la relation n'est pas valide pour déterminer la dose optimale à administrer.

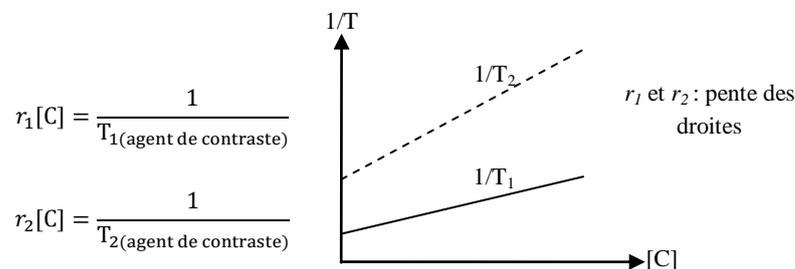


Figure 19 : principe de la détermination graphique des relaxivité  $r_1$  et  $r_2$ .

## 3.3 Les deux types d'agents de contraste

Il existe deux types d'agent de contraste qui sont directement liés aux deux temps de relaxation mesurés lors d'une mesure de résonance magnétique nucléaire :

- les agents de contrastes  $T_1$ , dits « positifs », qui réhaussent le contraste blanc des images ;

- les agents de contrastes  $T_2$ , dits « négatifs », qui réhaussent le contraste noir des images.

Dans ce cadre, plusieurs types d'agents ont été conçus tels les complexes d'ions paramagnétiques<sup>235</sup>, les combinaisons entre ions diamagnétiques et superparamagnétiques<sup>236</sup> et les nanoparticules superparamagnétiques fonctionnalisées. Récemment, des agents de transfert chimique à saturation (Chemical Exchange Saturation Transfer Agents ou CEST<sup>238 239 240 241</sup>) ont été introduits et agissent comme des agents de contraste négatifs.

Aujourd'hui, les agents de contraste les plus utilisés sont les complexes moléculaires pour les agents de contraste positifs ( $T_1$ ) et les nanoparticules superparamagnétiques pour les agents de contrastes négatifs ( $T_2$ ).

### 3.3.1 Les agents de contraste positifs (paramagnétiques)

Les agents de contraste positifs augmentent le signal mesuré (hypersignal) en diminuant  $T_1$ . Ce sont les agents les plus utilisés et ils sont habituellement composés d'ions métalliques paramagnétiques (Figure 20). Ces ions métalliques doivent réduire le  $T_1$  sans l'éteindre et celui qui remplit le mieux ce critère est l'ion lanthanide  $Gd^{3+}$  qui a un moment paramagnétique très haut (7 électrons non appariés, spin de  $S = 7/2$ )<sup>241</sup>. Des ions des métaux de transitions comme l'ion  $Mn^{2+}$  et  $Fe^{3+}$  peuvent être aussi utilisés.

Cependant, ces ions métalliques sont très toxiques pour l'homme lorsqu'ils sont libres : l'ion  $Gd^{3+}$  par exemple est très toxique, car *in vivo*, il entre en compétition avec les ions  $Ca^{2+}$ . Il est donc nécessaire de complexer ou piéger ces ions métalliques dans des matériaux organiques ou inorganiques<sup>242</sup> dans le but de les rendre biocompatibles, mais tout en évitant de réduire leur influence sur la relaxivité. Plusieurs méthodes ont été employées telle l'incorporation dans des liposomes, des micelles<sup>236</sup>, des complexes macrocycliques, polymériques ou dendritiques ayant des groupements fonctionnels de type carboxylates, amines, phosphates<sup>243</sup>.



Figure 20 : exemples d'agents de contraste positifs commerciaux, « Magnevist » (à gauche) et « Omniscan » (à droite)<sup>243</sup>.

Les mécanismes physiques qui permettent aux agents de contraste positifs de diminuer  $T_1$  sont complexes. Ils nécessitent des interactions proches entre l'ion paramagnétique de l'agent et les molécules d'eau environnantes (Figure 20) et sont fortement influencés par la capacité de l'agent à échanger rapidement des molécules d'eau (temps de rétention)<sup>244 245</sup>. Ces mécanismes ont déjà été décrits dans de nombreuses publications sous le nom de mécanisme de relaxation paramagnétique dans les sphères internes et externes de coordination des ions métalliques<sup>241 243 246</sup>.

### 3.3.2 Les agents de contraste négatifs (superparamagnétiques)

Les agents de contraste négatifs conduisent à l'effondrement du signal mesuré (hyposignal) en diminuant  $T_2$ . La stratégie pour concevoir des agents de contraste  $T_2$  est différente de celle adoptée pour les agents de contraste  $T_1$ , car les aimantations nécessaires doivent être nettement plus importantes que celles des ions paramagnétiques. Effectivement, les mécanismes qui permettent aux agents de contraste négatifs de diminuer les temps de relaxation  $T_2$  se font sur une plus grande échelle.

Ces agents de contrastes sont alors des matériaux hybrides mis en suspension aqueuse et/ou physiologique. Ils sont généralement composés d'un cœur de nanoparticules d'oxyde de fer superparamagnétiques car théoriquement, les nanoparticules superparamagnétiques ont une relaxivité<sup>247</sup> très importante et largement supérieure à celle des complexes de gadolinium. Le cœur est ensuite fonctionnalisé.

### A. Le mécanisme

---

La diminution des temps de relaxation  $T_2$  est liée à l'hétérogénéité du champ magnétique autour des nanoparticules qui en constituent le cœur. Il s'agit d'un mécanisme de sphère externe ou les interactions se font à plus grande distance. Ce mécanisme et les calculs qui en découlent ont déjà été largement discutés dans la littérature sous le nom de relaxation superparamagnétique<sup>169 246 248 259</sup>.

Pour décrire ce mécanisme simplement, il faut se rappeler que le champ magnétique qui entoure les nanoparticules diminue graduellement avec la distance (gradient de champ). Les molécules d'eau qui se retrouvent alors au voisinage de l'agent circulent dans un champ magnétique dont l'intensité varie. Cette variation d'intensité du champ que subissent les molécules d'eau accentue le déphasage des moments magnétiques des protons. Nous rappelons que c'est le déphasage des moments magnétiques des protons qui est à l'origine du temps  $T_2$ . En accentuant le déphasage de ces derniers, les agents de contrastes négatifs augmentent la dissipation de l'aimantation transversale ce qui diminue les temps  $T_2$  (Figure 21).

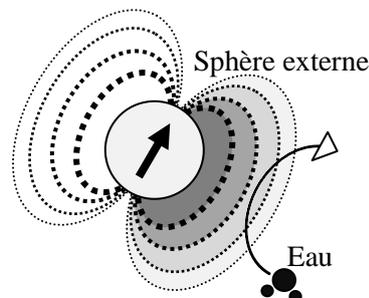


Figure 21 : schéma représentatif d'une molécule d'eau circulant dans le champ magnétique hétérogène d'une nanoparticule.

### B. La relaxation superparamagnétique

---

La relaxation superparamagnétique peut être décrite par plusieurs modèles qui diffèrent selon l'anisotropie cristalline des nanoparticules, leur taille ou leur état d'agrégation.

Dans leurs premières études de relaxométrie des nanoparticules superparamagnétiques d'oxyde de fer, en 1987, P. Gillis et S. H. Koenig ont tenté d'expliquer les phénomènes de relaxation de ces nanoparticules au moyen des équations utilisées normalement pour décrire les phénomènes de relaxation des ions paramagnétiques<sup>249</sup>. En 1992, A. Roch propose d'ajouter une contribution qui prend en compte l'alignement des moments superparamagnétiques le long du champ appliqué  $\vec{B}_0$ <sup>250</sup><sup>251</sup>. La théorie qui résulte de ces travaux donne des résultats cohérents avec les nanoparticules AMI-25 (Tableau 6 page 42). Cependant, H. Koenig et Kellar ont constaté que la prise en compte de l'aspect composite de ces nanoparticules, organisées sous la forme de clusters de cristaux de magnétite recouverts de dextran, devrait aboutir à un meilleur accord avec l'expérience en considérant que les molécules d'eau ne peuvent pénétrer à l'intérieur de ces agrégats<sup>252</sup>.

En 1997, J. W. M. Bulte et R. A. Brooks ont suggéré d'ajouter une troisième composante qui prend en compte les effets de surface des nanoparticules<sup>253</sup>. Au final, la relaxivité d'une nanoparticule superparamagnétique monocristalline peut s'exprimer de la façon suivante :

$$(1) : \frac{1}{T_1(\text{Fe})} = c p_s N_0 \gamma^2 \mu_s^2 \tau r^{-3} \{ [7J(\omega_s) + 3J(\omega)] [1 - L(\omega)^2] + 9J_\infty(\omega) L(\omega)^2 \}$$

$$(2) : \frac{1}{T_2(\text{Fe})} = c p_s N_0 \gamma^2 \mu_s^2 \tau r^{-3} \{ [6,5J(\omega_s) + 1,5J(\omega) + 2J(0)] [1 - L(\omega)^2] + [4,5J_\infty(\omega) + 6] L(\omega)^2 \} + c \tau \chi^2 (N_0 r^3)^{-1} [4,5J_\infty(\omega) + 6] \omega^2$$

- J est la fonction de densité spectrale de la sphère interne qui rend compte de la probabilité par unité de temps pour qu'un mouvement aléatoire  $\tau_s$  présente une pulsation  $\omega$  :

$$J(\omega) = \frac{\tau_s}{[1 + (\omega \tau_s)^2]}$$

où  $\tau_s$  est le temps de relaxation électronique ;

- $J_\infty$  correspond à la limite, lorsque  $\tau_s$  tend vers l'infini ;
- $L(\omega)$  est la fonction de Langevin :

$$L(\omega) = \coth\left(\frac{\mu_s B_0}{k T}\right) - \frac{k T}{\mu_s B_0}$$

où  $B_0$  est l'intensité du champ magnétique appliqué,  $k$  est la constante de Boltzman et  $T$  est la température absolue. La fonction de Langevin représente l'évolution de l'aimantation des nanoparticules monodomaines à la pulsation  $\omega$  ;

- $C = 32 \pi 10^{-6} / 405$  ;
- $N_0$  est le nombre d'Avogadro ;
- $\gamma$  est le rapport gyromagnétique du proton ;
- $\mu_s$  est le moment superparamagnétique d'une nanoparticule ;
- $p_s$  est le nombre de nanoparticules rapporté au nombre d'atome de Fer ;
- $r$  est la distance minimale entre deux protons ;
- $\omega$  est la fréquence de Larmor ;
- $\omega_s$  est la fréquence de Larmor des électrons ;
- $\tau$  est le temps de diffusion ;
- $\chi$  est la susceptibilité magnétique (loi de Currie).

Les deux premières parties dans les équations (1) et (2) représentent les expressions conventionnelles (diminuées du facteur  $[1-L(\omega)^2]$ ) de la relaxation dipôle-dipôle due à la diffusion par la sphère externe. L'autre terme proportionnel à  $L^2$  représente la contribution des moments superparamagnétiques alignés. Le dernier terme de l'équation (2) représente la composante de susceptibilité magnétique.

Ainsi, nous pouvons voir que la relaxivité superparamagnétique  $r_2$  dépend de nombreux paramètres et qu'elle est proportionnelle aux propriétés magnétiques des nanoparticules comme la susceptibilité et le moment magnétique. Ces deux paramètres, qui dépendent de la taille, la cristallinité et la nature des nanoparticules ont un impact direct sur la relaxivité  $r_2$  et sur les recherches qui en découlent. D'autres paramètres interviennent également comme la température, la concentration des agents et l'intensité du champ magnétique appliqué.

### C. Problématique sur la conception du cœur

Nous avons vu que pour accélérer le déphasage des protons, le cœur des agents de contraste  $T_2$  doit posséder de très bonnes propriétés magnétiques et être de préférence non toxique.

Dans ce contexte, la recherche s'est beaucoup orientée vers une optimisation des propriétés magnétiques des nanoparticules, comme leur moment magnétique, leur anisotropie cristalline et leur aimantation à saturation, car nous avons montré que ces paramètres ont un grand impact sur la relaxivité. Ainsi, des études ciblent la taille moyenne des nanoparticules qui a un rôle important sur leur susceptibilité magnétique, leur aimantation à saturation et leur biodistribution. D'autres ciblent leur cristallinité qui influe sur leur énergie d'anisotropie cristalline et a un rôle important sur le phénomène de superparamagnétisme. Enfin, des études sont menées sur la nature du matériau qui les compose.

Ainsi, une grande variété de nanoparticules magnétiques a été conçue en tant qu'agents de contraste négatifs, mais les matériaux les plus utilisés et les plus étudiés sont les nanoparticules d'oxyde de fer magnétiques ou ferrites. Celles-ci ont en effet l'avantage de permettre un bon compromis entre facilité de conception, bonnes propriétés magnétiques et biocompatibilité.

D'autres matériaux comme les nanoparticules bimétalliques de fer platine  $FePt^{254}$  ou de fer cobalt  $FeCo^{255}$ , des nanoparticules d'oxyde de fer dopées avec du manganèse ou du cobalt ( $MnFe_2O_4^{256}$   $^{257}$   $^{258}$   $^{259}$ ) ont été développées dans le but d'obtenir de meilleures propriétés magnétiques que celles de la magnétite et de la maghémite. Tous ces matériaux donnent lieu à de très bonnes relaxivités (Tableau 6 page 42) qui sont pour certaines nettement supérieures à celles que l'on peut obtenir avec des nanoparticules d'oxyde de fer. Cependant, les synthèses de ces matériaux sont moins faciles à mettre en œuvre et ces derniers sont plus toxiques. La FDA (US Food and Drug Administration) a approuvé en 1996 l'utilisation de nanoparticules d'oxyde de fer pour des injections intraveineuses après que de nombreuses études aient démontré que l'oxyde de fer est un matériau inoffensif quand son dosage est contrôlé ([www.fda.gov](http://www.fda.gov)). En fait, l'oxyde de fer est actuellement le seul matériau magnétique commercialisé pour des applications biomédicales.

En conclusion, les paramètres influençant la qualité d'un agent de contraste négatif sont nombreux (Figure 22). Il faut alors chercher le bon compromis en fonction des applications ciblées, de la toxicité et de la relaxivité désirée.

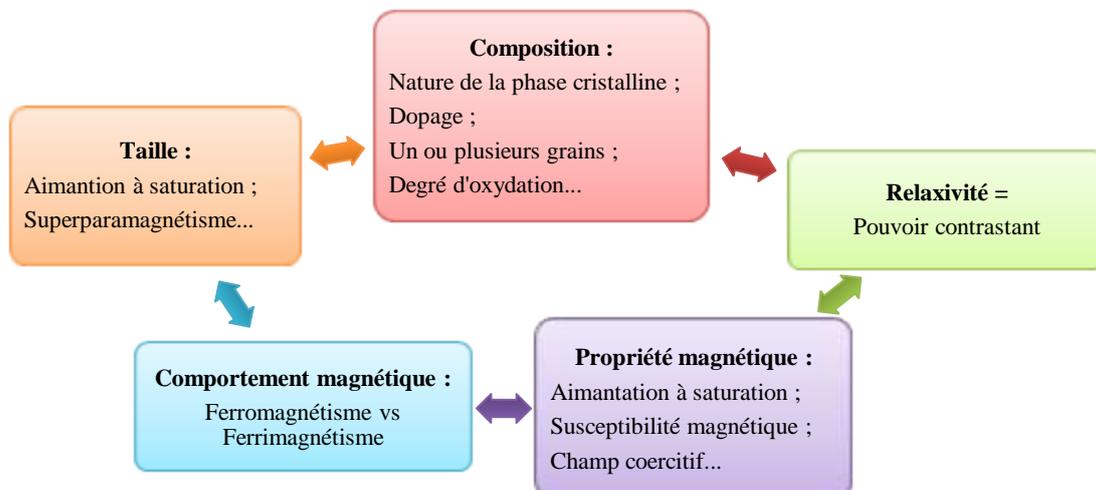


Figure 22 : récapitulatif des paramètres en compétition pour la synthèse de cœurs magnétiques.

## D. Problématique sur la fonctionnalisation des nanoparticules

Comme nous l'avons déjà évoqué, les nanoparticules doivent être fonctionnalisées pour respecter le cahier des charges imposé dans le domaine biomédical. Or, la recherche se heurte à de nombreuses difficultés car les propriétés des nanoparticules évoluent également avec la couche fonctionnelle.

L'épaisseur de la couche par exemple a un impact important sur la relaxivité. Plus elle sera grande, plus le cœur magnétique peut être isolé des molécules d'eau. Il interagira donc moins fortement avec celles-ci et la relaxivité, qui dépend de ces interactions, diminuera. La densité de la couche joue aussi un rôle important pour les mêmes raisons. Il faut donc trouver le bon compromis entre épaisseur et densité qui permet la meilleure circulation possible des molécules d'eau au voisinage du cœur magnétique.

Une autre difficulté survient lors du greffage des molécules sur les nanoparticules. Nous avons évoqué le choix de l'agent de couplage qui peut préserver les propriétés magnétiques où les réduire (voir les modes de fonctionnalisation). Le processus de greffage peut aussi altérer les propriétés magnétiques des nanoparticules et leurs morphologies. En effet, les nanoparticules de magnétite par exemple sont très sensibles à l'oxydation qui altère leurs propriétés magnétiques. Le greffage par échange de ligands peut conduire à des nano-objets en suspensions plus agglomérés et moins stables.

Finalement, la conception de la couche fonctionnelle est aussi une étape délicate où, comme pour la synthèse du cœur magnétique, beaucoup des paramètres entrent en compétition (Figure 23).

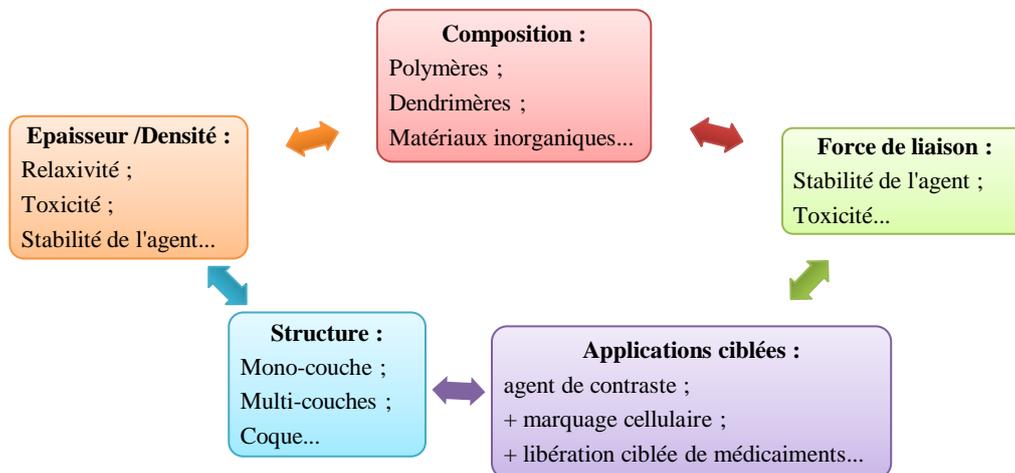


Figure 23 : récapitulatif des paramètres en compétition pour la conception de la couche fonctionnelle.

## E. Les agents de contraste négatifs actuellement développés

Toutes les voies de synthèse des nanoparticules associées aux différentes possibilités de fonctionnalisation ont conduit à différentes gammes d'agents de contraste négatifs que l'on peut trier suivant leurs tailles<sup>76 152 192 241 169</sup>. On retrouve ainsi :

- les agents VSOP (Very Small superParamagnetic iron Oxide Particle) dont les tailles moyennes de particules sont inférieures à 10 nm<sup>260 261</sup>. Ils sont efficaces pour l'angiographie par résonance magnétique et la visualisation des artères coronaires ;

- les agents USPIO (Ultrasmall SuperParamagnetic Iron Oxide) dont la taille moyenne est comprise entre 40 et 10 nm. Ils ne s'accumulent pas dans le système réticuloendothélial (RES), ce qui résulte en un temps de demi-vie dans le plasma plus long de l'ordre de deux heures<sup>262</sup>. Ils restent donc assez longtemps dans le sang pour être utilisés comme marqueurs du compartiment sanguin pour l'angiographie par résonance magnétique ou pour la lymphographie par résonance magnétique. En comparaison avec les SPIO, les USPIO sont moins relaxants ;
- les agents MION (Monocrystalline Iron Oxide Nanoparticle)<sup>263 264</sup> ou agents CLIO (Cross-Linked Iron Oxide)<sup>265 266</sup>, sont une sous-catégorie des USPIO et sont développés pour visualiser des cellules. Ils ont une taille comprise entre 10 et 30 nm ;
- les agents SPIO (SuperParamagnetic Iron Oxide) dont la taille moyenne est comprise entre 60 et 150 nm. Après leur injection, ils s'accumulent dans le système réticuloendothélial (RES) ou le foie<sup>267 268</sup>. Comme les tumeurs hépatiques ne contiennent plus de cellules RES ou ont une activité réduite, le contraste entre le foie et la lésion est accru. Ils servent donc à imager les lésions du foie<sup>269</sup> ;
- les agents MPIO (Micro-sized Particles of Iron Oxide) qui ont une taille comprise entre 1 et 10 µm. Ils ont été introduits récemment dans le but de visualiser individuellement des cellules<sup>270 271</sup>.

Aujourd'hui, les agents de contraste les plus développés sont les USPIO et les SPIO et nombre d'entre eux sont déjà utilisés dans les hôpitaux.

### Quelques performances d'agents cités dans la littérature

Le Tableau 6 donne un aperçu de la relaxivité  $r_2$  d'agents de contraste négatifs qui sont décrits dans la littérature.

Tableau 6 : relaxivité d'agents de contraste  $T_2$  acquise en fonction de l'intensité du champ, à une température de 37 °C<sup>192 169 259</sup>.  $D_H$  = diamètre hydrodynamique.

Nom	Type/nature du cœur	Enrobage	Application/cible	$D_H$ (nm)	Champ (T)	$r_2$ (mM <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )
<b>Cœur magnétique en oxyde fer</b>						
	MION	Liposome	Organes (foie)	170-300	0,47	130
<b>AMI-25 (Feridex ; Endorem)</b>	SPIO	Dextran T10	Foie et marquage cellulaire	120-180	1,5	120
					0,47	100
<b>SHU 555A (Resovist)</b>	SPIO	Carboxidextran	Foie et marquage cellulaire	60	1,5	188
					0,47	151
<b>Magnetoliposome</b>	USPIO	PEG-liposomes	Moelle osseuse	40	1,5	240
<b>Ferumoxytol</b>	USPIO	Carboxymethyl-dextran T10	Macrophages, marquage cellulaire, système sanguin et lymphatique	30	1,5	89
<b>AMI 227 (Sinerem/Combix)</b>	USPIO	Dextran T10, T1	Système lymphatique	15-30	1,5	65
					0,47	53
<b>MION-46L</b>	MION	Dextran	Organes	18-24	0,47	35
<b>Supravist</b>	USPIO	Carboxydextran	Marquage cellulaire, système sanguin	21	1,5	38
<b>Magnetoferritin</b>	USPIO	Ferritine	Système sanguin	12	1,5/25°C	218
<b>Abdoscan</b>	VSOP	Citrate	Marquage cellulaire, système sanguin	7	1,5	33,4
<b>Autre nature de cœur</b>						
<b>NiMEIO</b>	NiFe <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	DMSA	Molécules	15	1,5	152
<b>CoMEIO</b>	CoFe <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	DMSA	Molécules	15	1,5	172
<b>MnMEIO</b>	MnFe <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	DMSA	Molécules	15	1,5	358
				9		210
	FeCo	Carbone, PEG	Système sanguin	30	1,5	644
	FePt	TMAOH		18-50	4,7/20°C	239

Dans ce tableau nous retrouvons les grands paramètres qui influencent la relaxivité d'un agent. Nous remarquons ainsi, comme cité précédemment, que la relaxivité des agents augmente avec l'intensité du champ (exemple avec AMI-25, SHU 555A et AMI-227).

En effet, augmenter l'intensité du champ permet d'un côté de réhausser l'aimantation des nanoparticules (si elles n'ont pas atteint la saturation) et de l'autre d'augmenter l'aimantation de l'échantillon imagé (augmentation du nombre de protons alignés, annexe 2). Ces deux effets couplés améliorent la relaxivité. Cependant, les agents peuvent perdre leur stabilité, car les forces attractives magnétiques entre agents augmentent et causent leur agrégation. Aujourd'hui, 30 % des examens se font avec un champ magnétique de 1,5 T, 30 % à 3 T et 30 % à 7 T. Pour améliorer les diagnostics IRM, la recherche tente d'augmenter la proportion des examens réalisés avec l'efficacité de 7 T en développant des agents plus stables.

Le diamètre hydrodynamique des agents, qui dépend de la taille du ou des cœurs magnétiques, joue aussi un rôle important : plus ce diamètre est petit, plus la relaxivité des agents diminue (exemple :  $r_2$  SHU 555A >  $r_2$  Ferumoxytol >  $r_2$  AMI-227 >  $r_2$  MION-46L >  $r_2$  Supravist >  $r_2$  Abdoscan).

Les agents possédant des cœurs de ferrite dopée ( $\text{NiFe}_2\text{O}_4$ ,  $\text{MnFe}_2\text{O}_4$ ,  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$ ) ou des cœurs bimétalliques ( $\text{FePt}$ ,  $\text{FeCo}$ ) ont des relaxivités très grandes comparées à leurs homologues de même taille possédant un cœur d'oxyde de fer magnétique (AIM-227). En effet, ces matériaux ont des propriétés magnétiques nettement plus importantes. Le  $\text{FeCo}$  et le  $\text{MnFe}_2\text{O}_4$ , par exemple, possèdent une aimantation à saturation de 110 uem/g et 215 uem/g respectivement alors que l'aimantation à saturation de la magnétite est de 92 uem/g. Les propriétés magnétiques de ces agents en font leur principale attraction. Néanmoins, des études récentes montrent, dans le cas des nanoparticules à base de manganèse ( $\text{MnO}$ ), que seuls les atomes de Mn de surface interviennent dans le phénomène de relaxation ce qui expliquerait les faibles relaxivités observées avec ces nanoparticules<sup>272</sup>.

Enfin, nous voyons aussi que la taille des agents joue un grand rôle sur les applications ciblées en IRM. D'une manière générale, plus l'agent est petit, plus il est destiné à avoir un temps de vie élevé dans le corps. En effet, la diminution de la taille permet d'augmenter la furtivité des agents vis-à-vis du système immunitaire. Ils peuvent ainsi rester dans le corps suffisamment longtemps pour permettre d'imager le système sanguin et/ou lymphatique et passer des barrières physiologiques pour atteindre des organes sensibles comme le cerveau ou la moelle osseuse.

Ainsi, les développements actuels tendent à réduire la taille des agents ou se focalisent vers des produits plus spécifiques ou mieux tolérés comme des agents de contraste immunospécifiques : les nanoparticules sont ciblées vers des organes, des tumeurs ou des lésions à l'aide d'agent de ciblage, généralement des anticorps, qui sont couplés à la couche fonctionnelle.

### 3.4 Conclusion

---

Nous avons vu que l'IRM est une technique de diagnostic puissante, mais nécessite très souvent l'utilisation d'agents de contraste pour améliorer la qualité des images réalisées. Les images pondérées en  $T_2$  (négatifs) étant plus sensibles que celles pondérées en  $T_1$  pour distinguer les variations de contraste, la demande en agents de contraste négatifs est très importante.

Dans ce domaine, les nanoparticules d'oxyde de fer superparamagnétiques sont les plus étudiées. Le pouvoir contrastant des agents, qui se traduit par leur relaxivité, dépend fortement des propriétés magnétiques des nanoparticules, mais aussi des paramètres de mesures. Aussi, les paramètres qui gouvernent la relaxivité sont nombreux comme la nature du matériau magnétique utilisé, la taille du cœur magnétique, son enrobage, la distance qui le sépare des protons de l'eau environnante, le pH du milieu, la température, l'intensité du champ magnétique principal de l'appareil d'IRM, le type de séquence, etc.

Aujourd'hui, de nombreux agents de contraste négatifs sont commercialisés ; ils sont le plus souvent constitués d'un système cœur/couronne avec un cœur comprenant un ou plusieurs grains magnétiques et une couronne organique. Généralement, ces solutions colloïdales de nanoparticules de magnétite ou de maghémite sont stabilisées par du dextran et/ou sont fonctionnalisées par différents types de molécules organiques biocompatibles tels que des protéines, des fluorophores ou des molécules actives comme l'acide folique qui vont permettre de cibler les cellules cancéreuses.

La taille moyenne de ces agents est comprise entre 50 et 100 nm avec des relaxivités comprises entre 100 et 200  $\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ . Les agents de contraste négatifs de tailles inférieures sont plus rares et leur relaxivité est plus faible.

## 4 BILAN : CADRE DE LA THESE

### 4.1 Contexte de l'étude

Nous avons vu que la conception d'un agent de contraste négatif performant n'est pas simple. Cette conception touche aussi bien à des problèmes du domaine de la chimie et de la chimie des colloïdes, que de la physique et de la biologie. Il faut prendre en compte de nombreux paramètres pour respecter le cahier des charges imposé par le domaine biomédical. Les paramètres les plus importants au niveau du nano-objet magnétique sont :

- la nature, les propriétés magnétiques et la taille pour le cœur magnétique ;
- la nature, l'épaisseur, la densité et l'ancrage pour la couche fonctionnelle ;
- la stabilité colloïdale des nanoparticules fonctionnalisées dans des milieux physiologiques.

Aujourd'hui, la recherche dans cette thématique tend à exploser et à engendrer l'étude de nombreux matériaux par différentes approches synthétiques. Des études antérieures ont montré que des nanoparticules fonctionnalisées par des dendrons pouvaient être des nano-objets intéressants pour des applications biomédicales. De tels systèmes ont été peu étudiés jusqu'à maintenant.

L'architecture arborescente des dendrons présente de nombreux avantages comme par exemple de permettre un enrobage plurifonctionnel de faible épaisseur et densité autour des nanoparticules tout en favorisant leur stabilité en suspension. Une étude sur la fonctionnalisation de nanoparticules d'oxyde de fer magnétique par des dendrons a débuté au laboratoire avec les thèses de T.J. Daou<sup>106</sup> et A. Bertin<sup>273</sup>. L'architecture moléculaire du dendron, hydrophile dérivée d'oligoéthylèneglycol de faible poids moléculaire (Figure 24), a été l'une des clés dans la réussite de ces travaux.

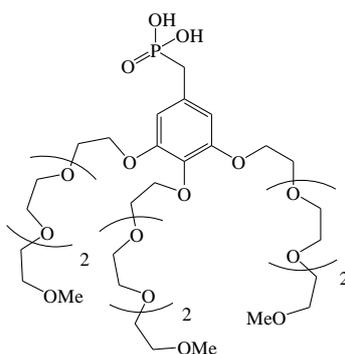


Figure 24 : schéma de la structure du dendron (ANA).

Le greffage des dendrons à la surface de nanoparticules a été effectué en utilisant un groupement phosphonate comme agent de couplage ; il a été montré que ce groupement permettait un taux de greffage plus élevé que ne le permet le groupement carboxylate et que les propriétés magnétiques des nanoparticules étaient préservées après le greffage<sup>106 183 273</sup>.

Les nanoparticules testées dans ce type d'application sont majoritairement synthétisées par co-précipitation. Néanmoins, de plus en plus d'études sont menées sur les nanoparticules élaborées par décomposition thermique car cette technique permet d'aboutir à des nanoparticules moins agrégées.

Les études antérieures menées au laboratoire avaient pour but de synthétiser des nanoparticules d'oxyde de fer de différentes tailles par la méthode de co-précipitation, et d'étudier le greffage d'un dendron lipophile dérivé du stylobène présentant trois chaînes alkyles en périphérie, en utilisant un

groupement phosphonate comme agent de couplage. Les greffages étaient effectués en solvant organique. Des travaux préliminaires sur le greffage de la molécule ANA hydrophile en milieu aqueux avaient donné des résultats encourageants mais il restait à optimiser les conditions de greffage et à mener une étude complète de leur stabilité colloïdale.

Dans ce contexte, il nous semble que le greffage d'un dendron composé de chaîne OEG et d'un groupement phosphonate comme agent de couplage sur un cœur magnétique synthétisé par les deux méthodes de synthèse les plus utilisées actuellement pourrait être une bonne approche pour créer des nano-objets répondant à un maximum de critères du cahier des charges d'un agent de contraste efficace pour l'IRM.

## 4.2 Objectifs des travaux

Les travaux qui vont être présentés dans ce manuscrit ont consisté, dans un premier temps, à synthétiser, par les méthodes de co-précipitation et de décomposition thermique, des nanoparticules d'oxyde de fer de diamètre 10 - 12 nm et à les caractériser structuralement et magnétiquement. Nous avons étudié par la suite le greffage de différents dendrons à la surface de deux types de nanoparticules, puis caractérisé les propriétés et la stabilité colloïdale de ces nanoparticules dendronisées. Enfin, nous avons réalisé des essais préliminaires pour évaluer l'intérêt de ces nano-objets comme agents de contraste négatifs pour l'IRM. L'accent a été mis sur une caractérisation complète des objets synthétisés pour mieux comprendre leurs propriétés physico-chimiques afin de les optimiser.

### A. Premiers objectifs : optimisation du greffage du dendron ANA à la surface des nanoparticules synthétisées par co-précipitation et synthèse de nouveaux dendrons

Dans un premier temps, les protocoles de greffage direct proposés dans les travaux antérieurs ont été optimisés avec une étude de la fonctionnalisation, par le dendron ANA, des nanoparticules faites par co-précipitation. Les nanoparticules ainsi dendronisées ont été caractérisées avant et après greffage pour définir leur taille, leur distribution de taille en solution, leur structure cristalline, leurs propriétés magnétiques, l'épaisseur de la couche organique, leur stabilité en phase aqueuse et physiologique, le type de liaison, le taux de greffage, leur relaxivité.

En parallèle à ces travaux, de nouveaux dendrons fonctionnalisés par différents groupements en périphérie ont été synthétisés pour introduire une stabilisation électrostatique des nanoparticules dendronisées et permettre le greffage ultérieur, via ces groupements, de molécules vectrices, de fluorophores ou de médicaments (Figure 25).

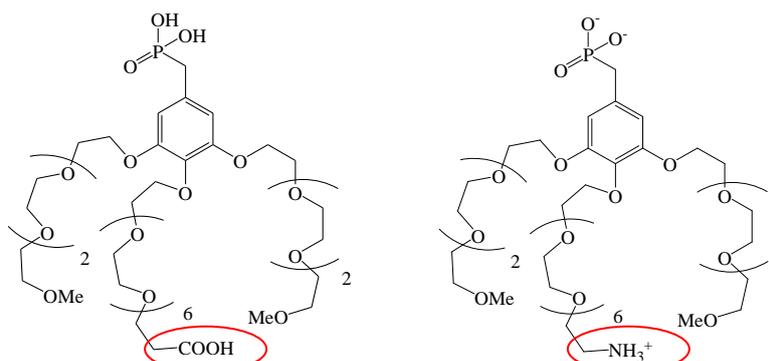


Figure 25 : schéma des structures des dendrons ANACOOH (à gauche) et ANANH2 (à droite).

Ces deux dendrons, tout comme le dendron original ANA, possèdent deux chaînes tétraéthylène glycol aux positions 3 et 5 par rapport au point focal, qui présente un groupement phosphonate assurant l'ancrage avec la nanoparticule. Par contre, pour les dendrons ANACOOH et ANANH<sub>2</sub>, une chaîne plus longue, de type octaéthylène glycol, fonctionnalisée soit par un groupement acide carboxylique, soit par une amine, a été introduite en position *para*.

### **B. Seconds objectifs : greffage des dendrons sur des nanoparticules synthétisées par deux méthodes**

---

Dans un deuxième temps, les protocoles de greffage ont été réajustés en fonction des dendrons fonctionnels afin de les greffer sur les nanoparticules conçues par les deux méthodes de synthèse. Une méthode de greffage par échange de ligands et transfert de phase a ainsi été développée pour greffer tous les types de dendrons sur les nanoparticules synthétisées par décomposition thermique.

Ces nouveaux nano-objets ont été caractérisés avec la même volonté d'obtenir le maximum d'informations sur la qualité du greffage et les propriétés physico-chimiques des suspensions.

### **C. Derniers objectifs : étude préliminaire sur les potentialités de ces nano-objets comme agents de contraste pour l'IRM**

---

L'intérêt de ces nano-objets comme agents de contraste a été évalué par des mesures de relaxivité qui ont, par ailleurs, permis de comparer les différents types de nano-objets élaborés. Des tests préliminaires *in vitro* et *in vivo* ont été réalisés pour évaluer leur toxicité et leur stabilité en milieu physiologique. Les premières images IRM ont été réalisées.





# CHAPITRE II : SYNTHÈSE ET CARACTÉRISATIONS DES NANOPARTICULES



# 1 LA SYNTHÈSE DES NANOPARTICULES

---

Dans cette partie nous décrivons les protocoles utilisés pour la synthèse des nanoparticules d'oxyde de fer magnétiques et des dendrons. Les voies qui ont été retenues pour la synthèse des nanoparticules sont la co-précipitation et la décomposition thermique. Ces deux voies sont les plus courantes et ont déjà été largement étudiées dans la littérature et au sein du laboratoire. Nous avons caractérisé de la manière la plus complète possible les nanoparticules obtenues afin de mieux décrire, dans la suite des travaux, les modifications des propriétés des nanoparticules après l'étape de greffage des dendrons.

Les dendrons monodisperses ont été synthétisés par une série d'étapes classiques de chimie organique (étherification, réduction, bromation). Ils ont été caractérisés par RMN du proton ( $^1\text{H}$ ), RMN du carbone ( $^{13}\text{C}$ ), spectroscopie infrarouge, spectrométrie de masse (pour les composés finaux).

## 1.1 Les synthèses et les caractérisations des nanoparticules

---

L'objectif des travaux qui vont être présentés est de synthétiser des nanoparticules d'oxyde de fer magnétique  $\text{Fe}_{3-x}\text{O}_4$  avec une très bonne cristallinité et une composition déterminée. Sachant que nous voulons obtenir des agents de contraste de la famille des USPIO, les synthèses ont été optimisées pour aboutir à des nanoparticules avec une taille moyenne d'environ 12 nm et une distribution de taille étroite (la plus monodisperse possible).

### 1.1.1 La synthèse par co-précipitation

---

La synthèse de nanoparticules d'oxyde de fer par co-précipitation a été étudiée au sein du laboratoire dans le cadre de la thèse de T.J. Daou.

#### *Le protocole*

En se basant sur les travaux de T.J. Daou, un protocole précis a été mis au point pour élaborer des nanoparticules de  $12 \pm 2$  nm. Ce protocole est le suivant :

- des solutions de  $\text{Fe}^{2+}$  2M et  $\text{Fe}^{3+}$  1M sont préparées par dissolution de  $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  et de  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  dans une solution acide de HCl 2M. La solution d'acide 2M est préparée par dilution de 10 mL d'HCl 37 % dans 54 mL d'eau ultrapure désoxygénée. La désoxygénation se fait par des cycles vide argon suivit de 30 minutes durant lesquelles de l'argon bulle dans l'eau ;
- 2,5 mL de  $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  2M et 10 ml de  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  sont mélangés dans un tricol de 100 mL, chauffés à 70°C sous argon et sous agitation mécanique (Figure 26) ;
- quand la température s'équilibre à 70 °C, 21 mL d'une solution d'hydroxyde de tétraméthylammonium ( $\text{N}(\text{CH}_3)_4\text{OH}_4$ ), concentrée à 3,43 mol/L sont ajoutés goutte à goutte (0,084L/h) ;
- au bout de 15 minutes, la totalité de la base a été ajoutée au milieu réactionnel dans lequel un précipité noir apparaît. Ce précipité marque la formation de la magnétite et le pH du milieu réactionnel est alors supérieur à 10 ;
- la réaction est stoppée 15 minutes après la fin de l'addition de la base ;
- les nanoparticules sont alors récupérées par décantation magnétique et lavées 6 fois, avec 25 mL d'eau ultrapure, dans le but d'éliminer l'excès de base et de chlore ;

- en fonction des caractérisations à mener les nanoparticules sont soit stockées en suspensions dans un pilulier scellé sous argon, soit lyophilisées et stockées sous forme de poudre dans un pilulier scellé sous argon.

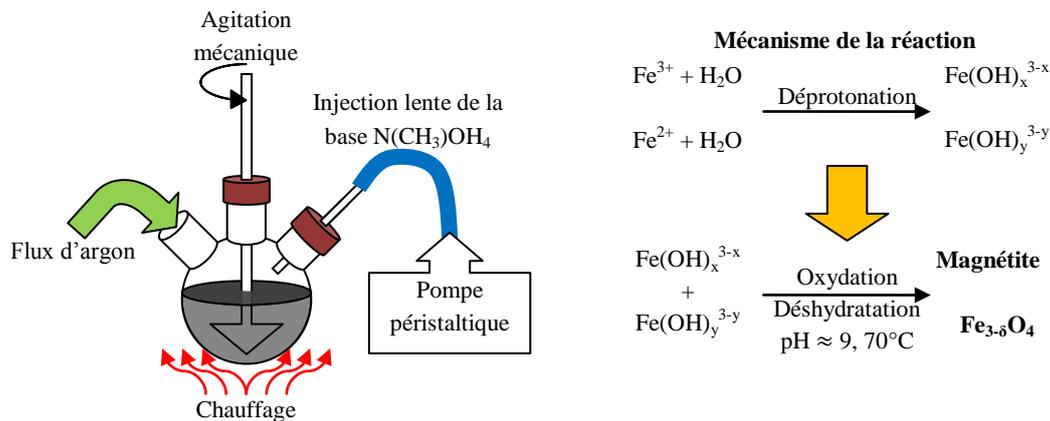


Figure 26 : schéma représentatif du montage de la synthèse par co-précipitation (à gauche) et équation de la réaction (à droite).

Dans la suite de ce manuscrit, les nanoparticules synthétisées par co-précipitation seront nommées NPSco.

### 1.1.2 La synthèse par décomposition thermique et la sélection de taille par précipitation

#### La synthèse

Le protocole de synthèse utilisé est une adaptation de la méthode déjà publiée par J. Park et *al.*<sup>111</sup>. Il permet d'obtenir des nanoparticules de  $12 \pm 2$  nm de façon reproductible et a été mis au point au laboratoire. Ce protocole est le suivant :

- 20 mL d'octyèther ( $b_p = 288^\circ C$ ), 2,2 mmol (1,38g) de stéarate de fer (précurseur) et 4,44 mmol (1,254 g) d'acide oléique sont mélangés dans un dicol de 100 mL (Figure 27) ;
- le mélange est placé dans un bain à ultrasons durant 15 minutes puis agité à  $100^\circ C$  pour bien dissoudre les réactifs et homogénéiser ce qui va être le milieu réactionnel ;
- le milieu réactionnel est chauffé avec une rampe de  $5^\circ C$ /minute jusqu'à  $288^\circ C$  sans agitation. Il est alors maintenu à reflux pendant deux heures à l'air ;
- après retour à température ambiante, un liquide visqueux noir est récupéré. Il est composé des nanoparticules enrobées de molécules d'acide oléique, de l'excès de molécule d'acide oléique et des sous produits de la réaction ;
- pour éliminer la matière organique en excès et afin d'obtenir un produit pur, une succession de trois lavages par centrifugation est effectuée. Le liquide visqueux obtenu est alors dissout dans du chloroforme ou de l'hexane, puis de l'éthanol ou de l'acétone est ajouté pour favoriser la précipitation des nanoparticules pendant la centrifugation (mélange solvant/non solvant, voir paragraphe suivant sur le procédé de sélection de taille par précipitation).

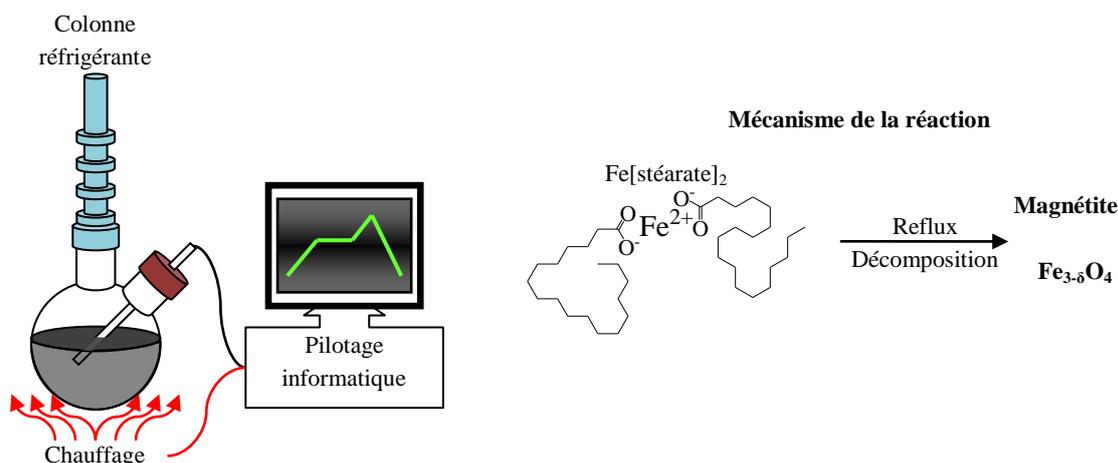


Figure 27 : schéma représentatif du montage de la synthèse par décomposition thermique (à gauche) et schéma de la réaction (à droite).

### ***Le procédé de sélection de taille par précipitation (SSP)***

Les nanoparticules récupérées après les trois lavages n'ont pas une distribution de taille suffisamment étroite pour les applications ciblées. Pour cela, un procédé de sélection de taille par précipitation (SSP<sup>274</sup>), en utilisant un mélange de solvants polaire/non polaire, est réalisé. Les nanoparticules recouvertes d'acide oléique sont stables en solvant non polaire (solvant). En augmentant la polarité du solvant par l'ajout d'un volume de solvant polaire (non solvant), la suspension se déstabilise progressivement. Les premières nanoparticules déstabilisées qui vont donc précipiter sont les plus grosses. En effet, la stabilité des nano-objets en suspension dépend fortement de leur taille et du solvant dans lequel ils sont dispersés. Il devient alors possible de faire précipiter sélectivement les grosses nanoparticules en suspension en faisant varier la polarité du solvant.

Dans notre cas, les nanoparticules ont été dispersées dans un mélange d'hexane et d'acétone. Ces solvants ont été choisis car ils sont miscibles et possèdent un indice de polarité éloigné (annexe 3). Le rapport optimal entre les volumes des deux solvants permettant une bonne séparation de taille est très sensible à la taille des nanoparticules et vraisemblablement à la quantité d'oléate greffé à leur surface. Il faut donc déterminer le rapport de volumes des solvants pour chaque synthèse. Dans un premier temps de l'acétone est ajoutée goutte à goutte dans la suspension de nanoparticules qui sont dispersées dans l'hexane. Au moment où les particules commencent à précipiter, un léger trouble apparaît, ce qui permet de déterminer grossièrement le rapport de volume. Ce mélange est centrifugé à 8 000 tr/min pendant 10 min et l'un ou l'autre des solvants est ajouté éventuellement afin de précipiter approximativement la moitié des nanoparticules. Un surnageant orange pâle et un précipité marron foncé sont séparés. En général, il faut environ un rapport de solvant hexane/acétone 50/50 pour des particules de 12 nm.

Le surnageant contient les nanoparticules de petites tailles et le dépôt celles de plus grosses tailles. C'est le précipité qui est récupéré. Il est séché ou est dispersé et conservé dans de l'hexane à la concentration de 1 mg/mL de nanoparticules. Dans la suite de ce manuscrit, les nanoparticules synthétisées par décomposition thermique seront nommées **NPS<sub>td</sub>@OA**.

## 1.2 Caractérisation des nanoparticules obtenues par les deux méthodes

La structure et la composition des lots de nanoparticules ont été déterminées par différentes techniques.

### 1.2.1 Caractérisations structurales et morphologiques

#### A. Analyses structurales

##### *MET*

Les nanoparticules ont été caractérisées par microscopie électronique à transmission (MET). La préparation d'un échantillon élaboré par co-précipitation (NPSCO) se fait par la dispersion d'une petite quantité du produit dans l'éthanol. Puis, une goutte de cette solution est déposée sur une grille de cuivre carboné. Ces grilles sont observées sous un microscope TOPCON EM-002B. Dans le cas des nanoparticules synthétisées par décomposition thermique (NPStd@OA), une goutte de la suspension est déposée sur la grille avant observation.

Les micrographies MET (Figure 28) montrent que la taille des nanoparticules est de l'ordre de 12 nm, mais la distribution exacte en taille sera donnée et discutée dans la partie suivante. Les clichés obtenus à haute résolution montrent que les nanoparticules synthétisées par les deux méthodes sont bien cristallisées.

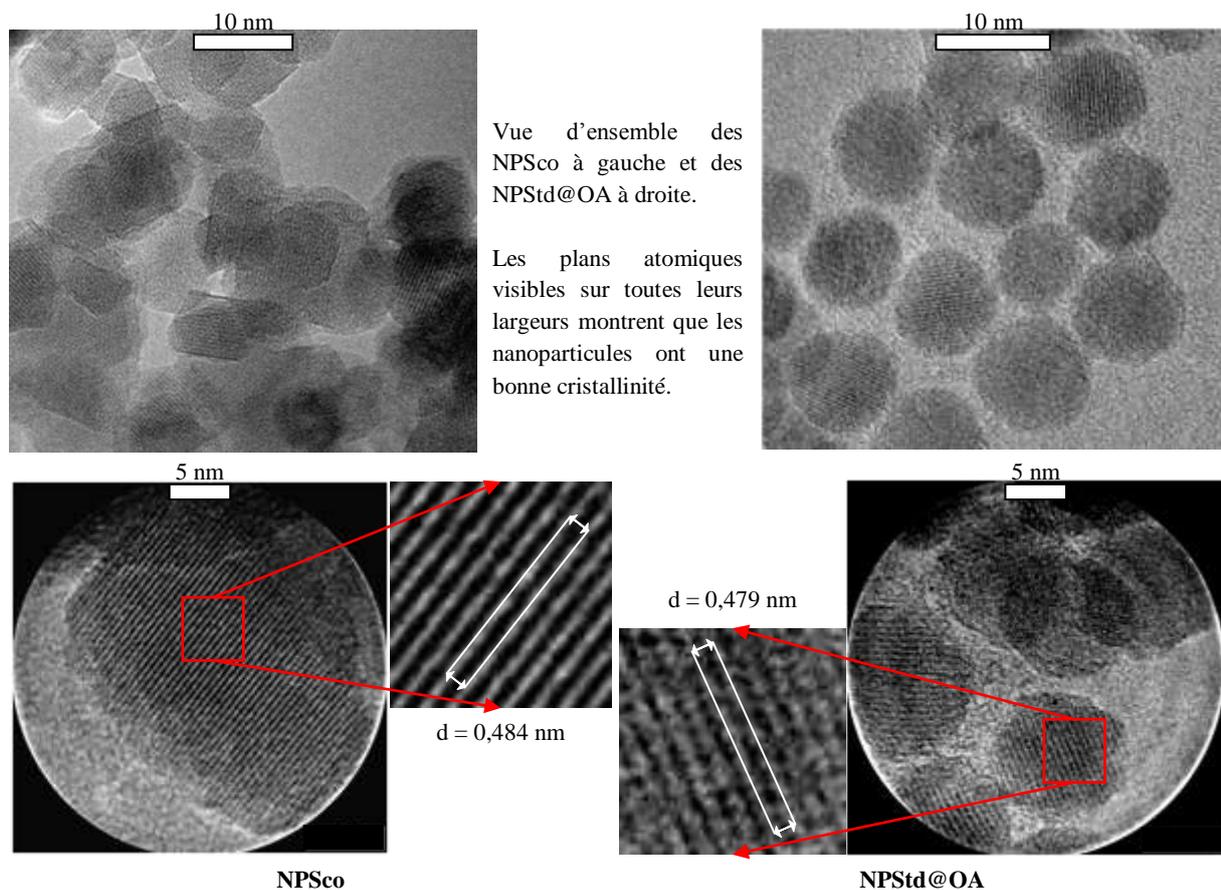


Figure 28 : micrographie MET des NPSCO (à gauche) et des NPStd@OA (à droite).

Les nanoparticules présentent majoritairement des plans avec des distances interréticulaires de l'ordre de 0,48 nm. Cette distance correspond au plan (111) de la magnétite. Le fait que les plans majoritairement exposés par ces nanoparticules soit les plans (111) n'est pas surprenant, car la croissance de la magnétite a lieu souvent suivant l'axe [111] et cette face est souvent observée comme étant majoritaire dans les magnétites naturelles.

Les clichés de diffraction électronique des nanoparticules (Figure 29) confirment leurs structures cristallines de type spinelle.

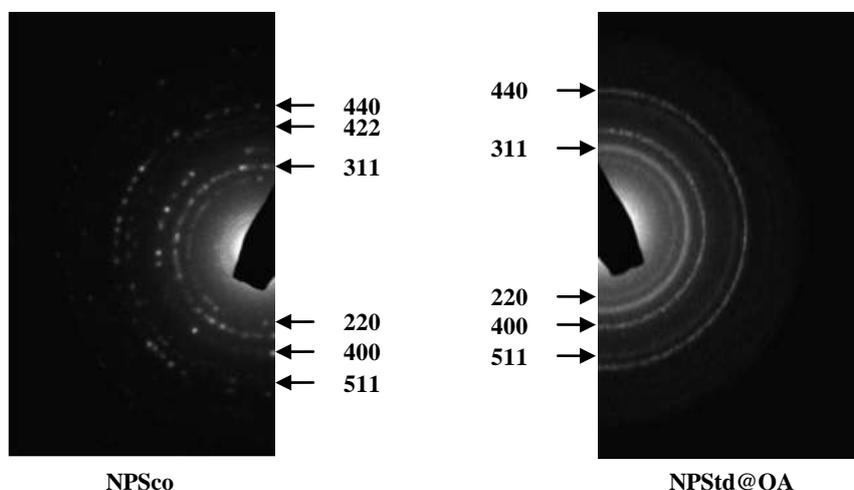


Figure 29 : clichés de diffraction électronique des NPSco (à gauche) et des NPStd@OA (à droite).

Les cercles concentriques observés permettent de remonter à la distance interréticulaire entre les plans du réseau cristallin. Chaque cercle peut être associé à un plan cristallin de la magnétite ou de la maghémite. Leurs structures étant similaires, les clichés de diffraction électronique le sont aussi. La résolution de la diffraction électronique ne permet pas de déterminer si nous avons obtenu de la magnétite ou la maghémite. La caractérisation MET permet juste de montrer la formation d'une structure cristalline de type spinelle.

### ***Spectroscopie infrarouge (IR)***

La composition de nos nanoparticules a aussi été analysée par spectroscopie infrarouge. Nous rappelons que la magnétite et la maghémite présentent deux signatures différentes en spectroscopie infrarouge. Une poudre constituée uniquement de magnétite présente un spectre avec une seule bande localisée à  $590 - 580 \text{ cm}^{-1}$  contrairement à la maghémite qui présente entre  $800$  et  $400 \text{ cm}^{-1}$  plusieurs bandes très proches dont la résolution va dépendre de l'ordre structural.

Dans une phase désordonnée, le caractère statistique de la distribution des cations et des lacunes entraîne un élargissement important des bandes d'absorption dans la gamme  $800 - 500 \text{ cm}^{-1}$  dû à un étalement des fréquences de vibration différentes d'une maille à une autre. Plus l'ordre des lacunes augmente, plus le nombre de bandes résolues augmente. Les bandes d'absorption d'une phase ordonnée sont ainsi plus fines et plus nombreuses.

Les spectres IR des NPSco et des NPStd@OA ont été acquis avec un spectromètre à Transformée de Fourier (FTIR, Digilab FTS 3000) sur des poudres dispersées dans une matrice de KBr (Figure 30).

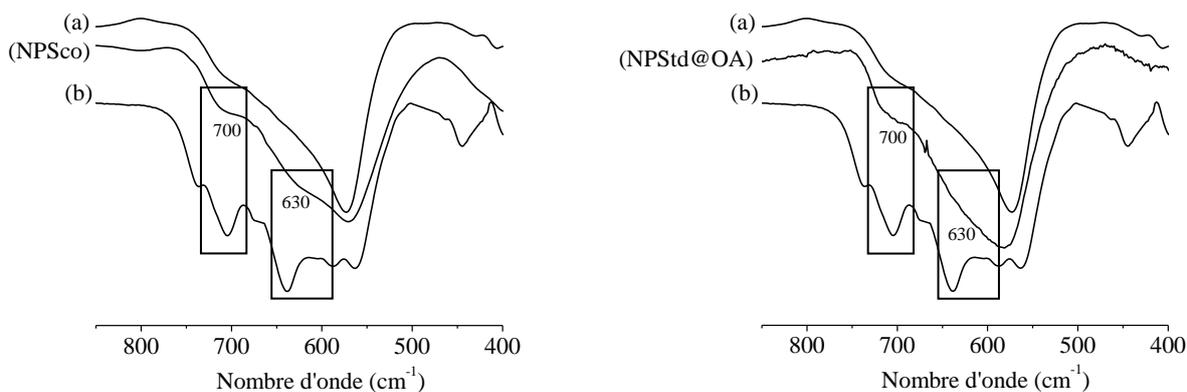


Figure 30 : spectres IR de la magnétite (a), de la maghémite (b), des NPSco (à gauche) et des NPStd@OA (à droite)<sup>29</sup>.

Dans les deux cas, les spectres des nanoparticules présentent une large bande entre 800 et 500  $\text{cm}^{-1}$  avec des épaulements. Le maximum de la bande est respectivement à 570 et 580  $\text{cm}^{-1}$  pour les NPSco et les NPStd@OA. Ce maximum est proche de celui de la magnétite pure. Cependant, la présence de deux épaulements vers 630 et 700  $\text{cm}^{-1}$  (encadrés en noir) sur cette large bande suggère la présence de maghémite dans la structure des nanoparticules. Ainsi, ces spectres tendent à montrer que nos nanoparticules possèdent une structure intermédiaire entre la magnétite et la maghémite résultant certainement d'une oxydation partielle de leur surface.

#### La diffraction des rayons X (DRX)

Les diffractogrammes RX (annexe 4) ont été réalisés à température ambiante avec un diffractomètre Bruker D8 équipé d'une anticathode de Cuivre délivrant un rayonnement monochromatique  $K_{\alpha} = 0,154056 \text{ nm}$  et d'un détecteur Sol-X qui discrimine la fluorescence. Les analyses par DRX ont été conduites afin de calculer la valeur du paramètre de maille des phases obtenues et de déterminer si ces valeurs sont proches du paramètre de la maghémite ou de la magnétite

Nous rappelons que la magnétite et la maghémite sont des spinelles de structure cubique qui présentent des diffractogrammes RX similaires : les pics sont très proches, mais légèrement décalés en raison de la différence entre les paramètres de maille : 0,8346 nm pour la maghémite (fiche JCPDS, 39-1346) et 0,8396 nm pour la magnétite ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) (fiche JCPDS, 19-629)<sup>14</sup>. La largeur des pics étant très sensible à la taille des particules, il peut s'avérer difficile de distinguer ces pics dans les diffractogrammes (Figure 31). Quand le paramètre de maille est proche de celui de la magnétite, nous l'attribuons à une magnétite légèrement oxydée, que nous appellerons magnétite sous-stœchiométrique ; s'il est légèrement supérieur à celui de la maghémite nous l'attribuons à une maghémite contenant du  $\text{Fe}^{2+}$ . La mesure précise de la stœchiométrie nécessite des études par spectrométrie Mössbauer.

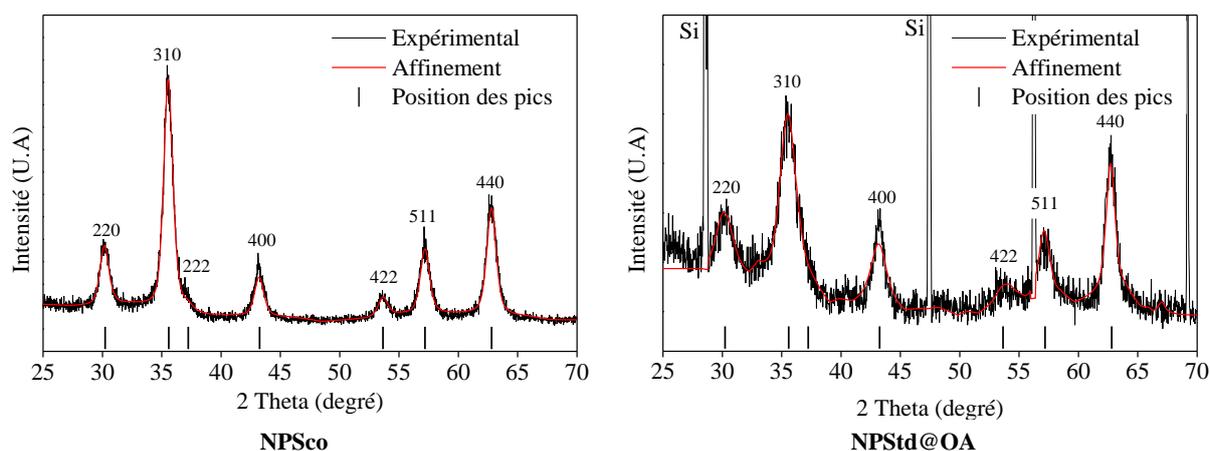


Figure 31 : diffractogrammes RX des NPSco (à gauche) et des NPStd@OA (à droite).

Les diffractogrammes RX des NPSco et des NPStd@OA sont donnés dans la Figure 31. Les NPStd@OA ont été mélangées à de la poudre de silicium pour effectuer la mesure. Les pics de diffraction du silicium servent d'étalon interne afin de déterminer le décalage du zéro du diffractogramme (zero shift).

Les pics de diffractions observés sont attribués à la structure spinelle, indiquant que les échantillons ne contiennent ni de l'hématite ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ) ni des hydroxydes de fer. Les paramètres de maille ont été déterminés à l'aide du programme Fullprof<sup>275</sup> par la méthode de Le Bail<sup>276</sup>. Ils sont de  $0,8387 \pm 0,0004$  nm pour les NPSco et de  $0,8381 \pm 0,0004$  nm pour les NPStd@OA. La comparaison de ces valeurs à celles de la maghémite (0,8346 nm) et de la magnétite (0,8396 nm) montre que les nanoparticules obtenues ont un paramètre de maille intermédiaire entre celui de la magnétite et de la maghémite. Les ions  $\text{Fe}^{2+}$  ont donc été partiellement oxydés.

Le paramètre de maille peut permettre de remonter à la composition de la phase car il a été rapporté qu'il varie linéairement en fonction de la déviation en stœchiométrie  $\delta$  de la magnétite  $\text{Fe}_{3-\delta}\text{O}_4$ . D'après les résultats de J. B. Yang et al. (Figure 32)<sup>277</sup>, la déviation en stœchiométrie serait de l'ordre de  $\approx 0,03 \pm 0,1$  pour les NPSco et de  $\approx 0,08 \pm 0,1$  les NPStd@OA, soit une stœchiométrie  $\text{Fe}_{2,97}\text{O}_4$  et  $\text{Fe}_{2,93}\text{O}_4$  pour les NPSco et les NPStd@OA respectivement.

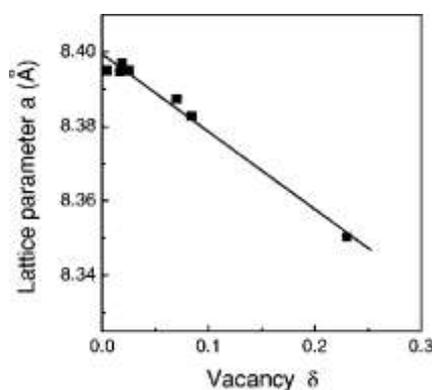


Figure 32 : Evolution du paramètre de maille en fonction de la déviation en stœchiométrie dans  $\text{Fe}_{3-\delta}\text{O}_4$  à température ambiante d'après J. B. Yang et al.<sup>277</sup>.

En conclusion, ces analyses montrent que les nanoparticules synthétisées par les deux méthodes ne sont pas composées à 100 % de magnétite. La détermination de la valeur du paramètre de maille révèle dans les deux cas qu'il s'agit de nanoparticules de magnétite sous-stœchiométrique. Les ions  $\text{Fe}^{2+}$  de la

magnétite sont très sensibles à l'oxydation et plus la taille des nanoparticules est petite, plus cette sensibilité à l'oxydation est importante. L'oxydation observée est certainement superficielle.

### *Spectrométrie Mössbauer*

Pour avoir plus de précisions sur la stœchiométrie des phases, une étude par spectrométrie Mössbauer a été effectuée sur les NPSCO et les NPStd@OA. Les mesures, ainsi que leur interprétation, ont été réalisées par J. M. Grenèche du Laboratoire de Physique de l'Etat Condensé (Université du Maine, Le Mans). Cette technique de sonde locale est sensible au degré d'oxydation des atomes de fer, au rapport des concentrations, ainsi qu'à leur environnement. Elle est la méthode la plus adaptée pour évaluer la déviation de stœchiométrie  $\delta$  dans  $\text{Fe}_{3-\delta}\text{O}_4$ .

Les spectres Mössbauer  $^{57}\text{Fe}$  ont été obtenus à 300 K et à 77 K en géométrie de transmission à l'aide d'un spectromètre conventionnel avec accélération constante et avec une source de  $^{57}\text{Co}$  (Rh). Le signal de vitesse et les valeurs de déplacement isomérique ont été calibrés à l'aide d'une feuille de  $\alpha\text{-Fe}$  à 300 K. Les structures hyperfines des différents spectres ont été affinées au moyen du programme MOSFIT<sup>278</sup> en considérant des composantes quadripolaires et/ou magnétiques comprenant des raies de profil lorentzien.

#### Les nanoparticules synthétisées par décomposition thermique et recouvertes d'acide oléique :

Les spectres Mössbauer des NPStd@OA de 12 nm sont donnés dans la Figure 33.

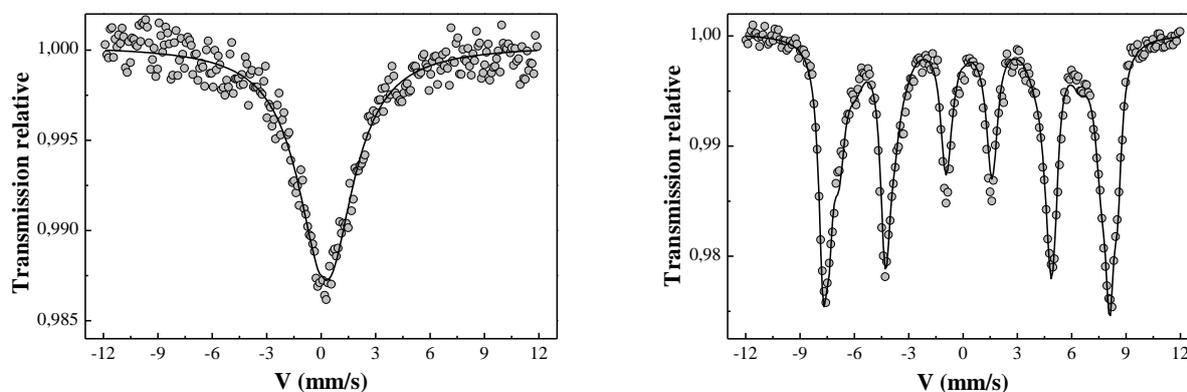


Figure 33 : spectres Mössbauer des NPStd@OA de 12 nm réalisés à 300 K (gauche) et 77 K (à droite).

Le spectre à 300 K (Figure 33, gauche) présente une structure hyperfine avec une seule raie large caractéristique de la présence d'effets de relaxation superparamagnétique provenant de nanoparticules sans interactions, donc isolées. Un ajustement peut être établi à partir d'une lorentzienne, ce qui n'a pas de sens physique *a priori*, mais permet cependant d'estimer la valeur moyenne du déplacement isomérique. Par interpolation entre les valeurs moyennes observées sur les variétés maghémite et magnétite, la valeur du déplacement isomérique de  $0,42 \pm 0,01$  mm/s estimée à 300 K pour les NPStd@OA, permet d'estimer une composition de  $\text{Fe}_{2,79}\text{O}_4$  équivalente à 62 % de maghémite et 38 % de magnétite en nombre d'atomes de Fe dans l'hypothèse d'un modèle cœur-coquille (magnétite-maghémite) de phases stœchiométriques. Toutefois, il est préférable de considérer un gradient d'oxydation de l'extérieur vers l'intérieur de la nanoparticule.

Le spectre à 77 K (Figure 33, droite) présente un seul sextuplet avec des lignes élargies et asymétriques, mais diffère de celui d'une magnétite microcristalline, qui doit être ajusté avec au moins

cinq composantes attribuées aux  $\text{Fe}^{3+}$  en site tétraédrique, aux  $\text{Fe}^{3+}$  en site octaédrique, aux cations  $\text{Fe}^{x+}$  (valence intermédiaire), aux  $\text{Fe}^{3+}$  et  $\text{Fe}^{2+}$  dans les sites octaédriques<sup>279</sup>. Dans le cas présent, la structure hyperfine montre qu'il subsiste des phénomènes de relaxation superparamagnétique qui doivent provenir de la présence des plus petites particules isolées.

C'est pourquoi une distribution de champs hyperfins statiques corrélée avec une distribution de déplacements isomériques a été considérée, afin d'estimer le déplacement isomérique moyen. A partir d'une interpolation des valeurs moyennes de déplacement isomérique à 77 K, nous pouvons estimer la composition moyenne des NPStd@OA de 12 nm à  $\text{Fe}_{2,77}\text{O}_4$ , ce qui est en accord avec les résultats précédents à 300 K soit une proportion de 70 % de maghémite (et 30 % de magnétite). Selon un modèle structural cœur-coquille (magnétite-maghémite), nous pouvons estimer à 2 nm l'épaisseur de maghémite en supposant que les facteurs f Lamb-Mössbauer des deux phases sont identiques.

Les valeurs moyennes des paramètres hyperfins issus de l'ajustement des spectres sont données dans le Tableau 7.

*Tableau 7 : valeurs moyennes des paramètres Mössbauer des NPStd@AO de 12 nm déduits des spectres Mössbauer à 300 K et 77 K.*

Température	Déplacement isomérique ( $\text{mms}^{-1}$ )	Séparation quadripolaire ( $\text{mms}^{-1}$ )	Champ hyperfin (T)	Composition
300 K	$0,42 \pm 0,01$	$0 \pm 0,01$	-	$\text{Fe}_{2,79}\text{O}_4$
77 K	$0,50 \pm 0,01$	$0 \pm 0,01$	$45,4 \pm 0,5$	$\text{Fe}_{2,77}\text{O}_4$

### Les nanoparticules de 10 - 12 nm synthétisées par co-précipitation

Des spectres Mössbauer à 300 K et 77 K ont été enregistrés sur plusieurs échantillons de nanoparticules synthétisées par co-précipitation.

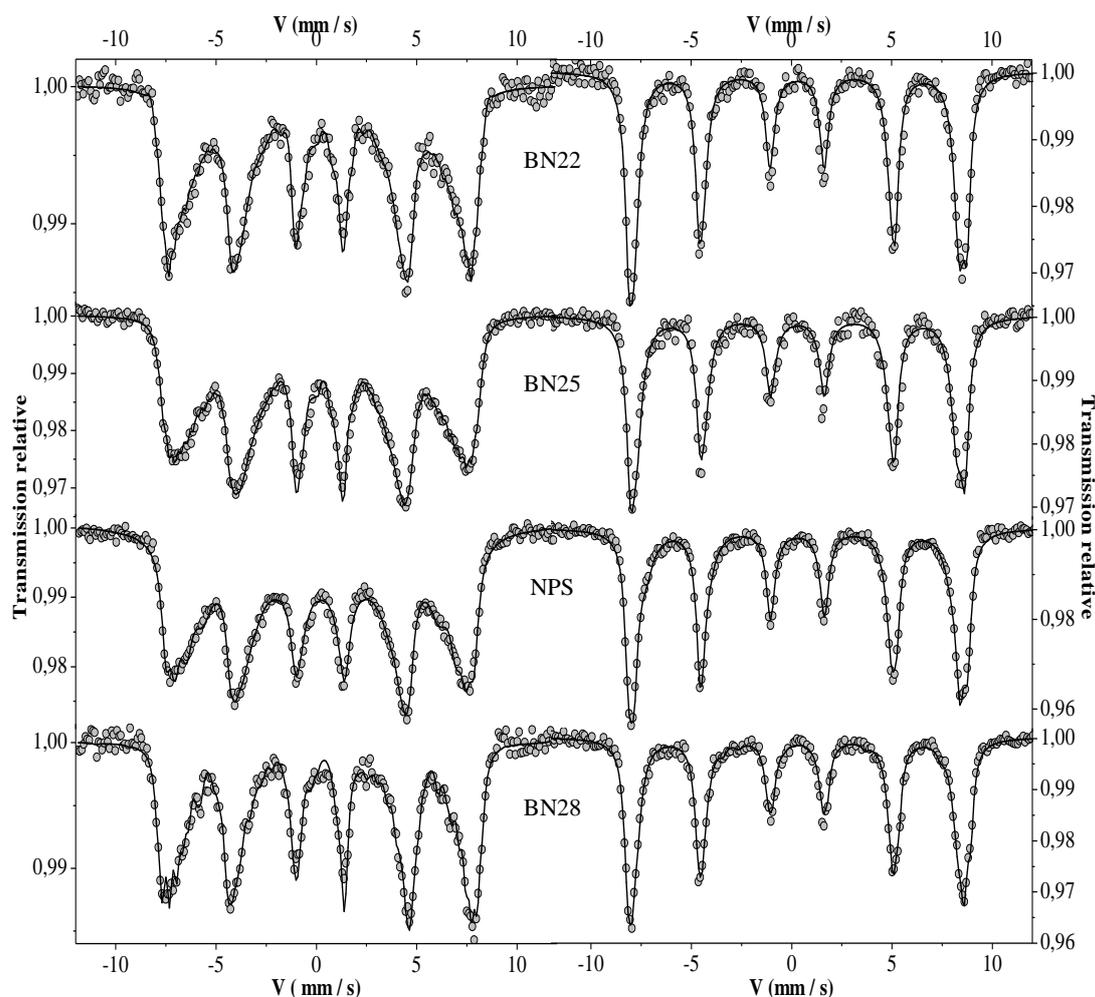


Figure 34 : spectres Mössbauer de différents échantillons de nanoparticules synthétisées par co-précipitation à 300K (gauche) et à 77K (droite).

Les spectres à 300 K (Figure 34, gauche) présentent une structure hyperfine complexe avec un sextuplet présentant des raies larges et asymétriques : le profil de raies (droit à l'extérieur correspond au champ hyperfin maximal donc « statique ») témoigne la présence de nanoparticules avec une aimantation bloquée alors que l'élargissement interne traduit une réduction du champ hyperfin liée à des effets de relaxation superparamagnétique. Sachant que la taille moyenne des nanoparticules est dans la gamme 10 - 12 nm et qu'elles sont normalement superparamagnétiques à température ambiante, ces résultats suggèrent de fortes interactions dipolaires entre les nanoparticules qui doivent être fortement agglomérées. Par interpolation entre les valeurs moyennes observées sur les variétés maghémite et magnétite, la valeur du déplacement isomérique à 300 K permet d'estimer la composition des nanoparticules. Les valeurs de déplacement isomérique obtenues avec les divers échantillons sont 0,35, 0,40 ; 0,37 et  $0,38 \pm 0,01$  mm/s (tableau 2). Une valeur de  $0,37 \pm 0,01$  mm/s permet d'estimer une composition de  $\text{Fe}_{2,72}\text{O}_4$  équivalent à 85 % de maghémite et 15 % de magnétite en nombre d'atomes de Fe dans l'hypothèse d'un modèle cœur-coquille (magnétite-maghémite) de phases stœchiométriques (Tableau 8). Il y a certainement un gradient d'oxydation de l'extérieur vers l'intérieur de la nanoparticule. Néanmoins, ces résultats montrent que ces nanoparticules sont

fortement oxydées avec une composition très proche de celle de la maghémite et sont en accord avec les résultats du laboratoire et ceux rapportés dans la littérature : quand la taille des nanoparticules est inférieure à 15 nm, les nanoparticules sont fortement oxydées<sup>111 121 280</sup>.

Les spectres à 77 K (Figure 34, droite) montrent un seul sextuplet avec des lignes élargies et asymétriques, mais globalement similaire à la structure hyperfine de la maghémite, en accord avec les conclusions précédentes. Cette structure hyperfine confirme également le caractère magnétique statique à 77 K. Nous avons considéré une distribution de champs hyperfins statiques corrélée avec une distribution de déplacements isomériques, mais la variation de ces derniers est très faible. Les valeurs obtenues pour les différents échantillons sont 0,47, 0,44, 0,46 et  $0,47 \pm 0,01$  mm/s (Tableau 8): la valeur moyenne de 0,46 conduit à une composition  $\text{Fe}_{2,71}\text{O}_4$ , ce qui est en accord avec les résultats précédents à 300 K soit une proportion de 90 % de maghémite (et 10 % de magnétite). Selon un modèle structural cœur-coquille (magnétite-maghémite), nous pouvons estimer à 2,5(5) nm l'épaisseur de maghémite en supposant que les facteurs f Lamb-Mössbauer des deux phases sont identiques.

Les valeurs moyennes des paramètres hyperfins estimées à partir de l'ajustement des spectres sont données dans le Tableau 8.

*Tableau 8 : valeurs moyennes des paramètres Mössbauer des NPSco déduites des spectres Mössbauer à 300 K et 77 K.*

Echantillon	Température	Déplacement isomérique (mms <sup>-1</sup> )	Séparation quadripolaire (mms <sup>-1</sup> )	Champ hyperfin (T)	Composition
NPS = 11,7 nm	300 K	$0,38 \pm 0,01$	$0 \pm 0,01$	$35,5 \pm 0,5$	$\text{Fe}_{2,74}\text{O}_4$
	77 K	$0,47 \pm 0,01$	$0 \pm 0,01$	$50,2 \pm 0,5$	$\text{Fe}_{2,72}\text{O}_4$
BN22 = 10,7 nm	300 K	$0,37 \pm 0,01$	$-0,04 \pm 0,01$	$39,3 \pm 0,5$	$\text{Fe}_{2,72}\text{O}_4$
	77 K	$0,46 \pm 0,01$	$-0,01 \pm 0,01$	$50,8 \pm 0,5$	$\text{Fe}_{2,71}\text{O}_4$
BN25 = 11,3 nm	300 K	$0,40 \pm 0,01$	$0 \pm 0,01$	$36,5 \pm 0,$	$\text{Fe}_{2,72}\text{O}_4$
	77 K	$0,44 \pm 0,01$	$-0,03 \pm 0,01$	$50,2 \pm 0,5$	$\text{Fe}_{2,68}\text{O}_4$
BN28 = 10 nm	300 K	$0,38 \pm 0,01$	$0 \pm 0,01$	$35,3 \pm 0,5$	$\text{Fe}_{2,74}\text{O}_4$
	77 K	$0,47 \pm 0,01$	$0 \pm 0,01$	$50,2 \pm 0,5$	$\text{Fe}_{2,72}\text{O}_4$

Ces analyses Mössbauer suggèrent que les nanoparticules synthétisées par co-précipitation sont « plus » oxydées que les nanoparticules synthétisées par décomposition thermique. En fait, les nanoparticules s'oxydent dans le temps et donc les résultats dépendent beaucoup du délai entre la synthèse des nanoparticules et la réalisation de la mesure. Des mesures effectuées actuellement sur des échantillons « frais » montrent que globalement la composition des deux types de nanoparticules est similaire juste après la synthèse et donc que les nanoparticules s'oxydent dans le temps.

En conclusion, les résultats obtenus par les analyses Mössbauer sont en accord avec les précédentes analyses infrarouges et DRX. Ils confirment une oxydation des nanoparticules, phénomène souvent observé, car plus la taille des nanoparticules diminue plus les ions  $\text{Fe}^{2+}$  sont sensibles à l'oxydation.

## B. Analyses morphologiques

---

La taille des nanoparticules a été déterminée : - à partir des largeurs des raies de diffraction X et la relation de Scherrer ; - par la sorptométrie (BET) pour les NPSco et - par une étude statistique sur plusieurs micrographies obtenues à basse résolution avec le MET.

### *Diffraction des RX*

La taille des cristallites est calculée en utilisant la relation de L. B. Scherrer sur le pic 311 qui est le plus intense. Cette méthode est souvent utilisée dans la littérature :

$$\Phi_{h,k,l} (\text{en } \text{\AA}) = \frac{k\lambda}{\frac{B\pi}{180} \cos \theta}$$

- $\Phi_{h,k,l}$  est la dimension moyenne des cristallites dans la direction normale au plan 311 diffractant ;
- $\lambda$  est la longueur d'onde de la radiation X utilisée ( $\text{\AA}$ ) ;
- $\theta$  est l'angle du pic de diffraction mesuré (degré) ;
- B est la largeur à mi hauteur des pics les plus intenses sur nos diffractogrammes ;
- k la constante de Scherrer qui dépend des distorsions, des indices hkl et de la méthode adoptée pour mesurer B. Dans notre cas, k vaut approximativement 0,9.

Cette méthode s'applique pour des tailles de cristallites comprises entre 5 nm et 100 nm. Cependant, la précision des résultats diminue quand la taille des particules augmente. En outre, l'intensité diffractée par les cristallites les plus gros est plus élevée, ce qui donne une valeur expérimentale supérieure à la valeur moyenne réelle. Cette méthode rend compte des tailles des domaines cohérents de diffraction. Les valeurs trouvées sont donc susceptibles d'être différentes de la taille réelle des particules si celles-ci contiennent plusieurs domaines. De plus cette méthode ne donne qu'une valeur moyenne de la taille.

Les diamètres moyens obtenus par cette méthode sont les suivants :

- NPSco :  $\Phi = 11,5 \pm 1$  nm ;
- NPStd@OA :  $\Phi = 11 \pm 1$  nm.

Le diamètre moyen des nanoparticules a aussi été calculé lors des affinements des diffractogrammes avec le programme Fullprof :

- NPSco :  $\Phi = 10 \pm 1$  nm ;
- NPStd@OA :  $\Phi = 12 \pm 1$  nm.

### *MET*

La microscopie est un bon moyen pour mesurer la taille des nanoparticules, car la mesure étant directe, elle donne un résultat très proche de la réalité. Plusieurs clichés MET (Figure 35) ont été réalisés à basse résolution sur nos poudres afin d'avoir une vue d'ensemble des nanoparticules et de faire une étude statistique avec le logiciel Image J. La détermination des diamètres sur plusieurs

nanoparticules permet de tracer un histogramme donnant la distribution de la taille des nanoparticules pour chaque échantillon.

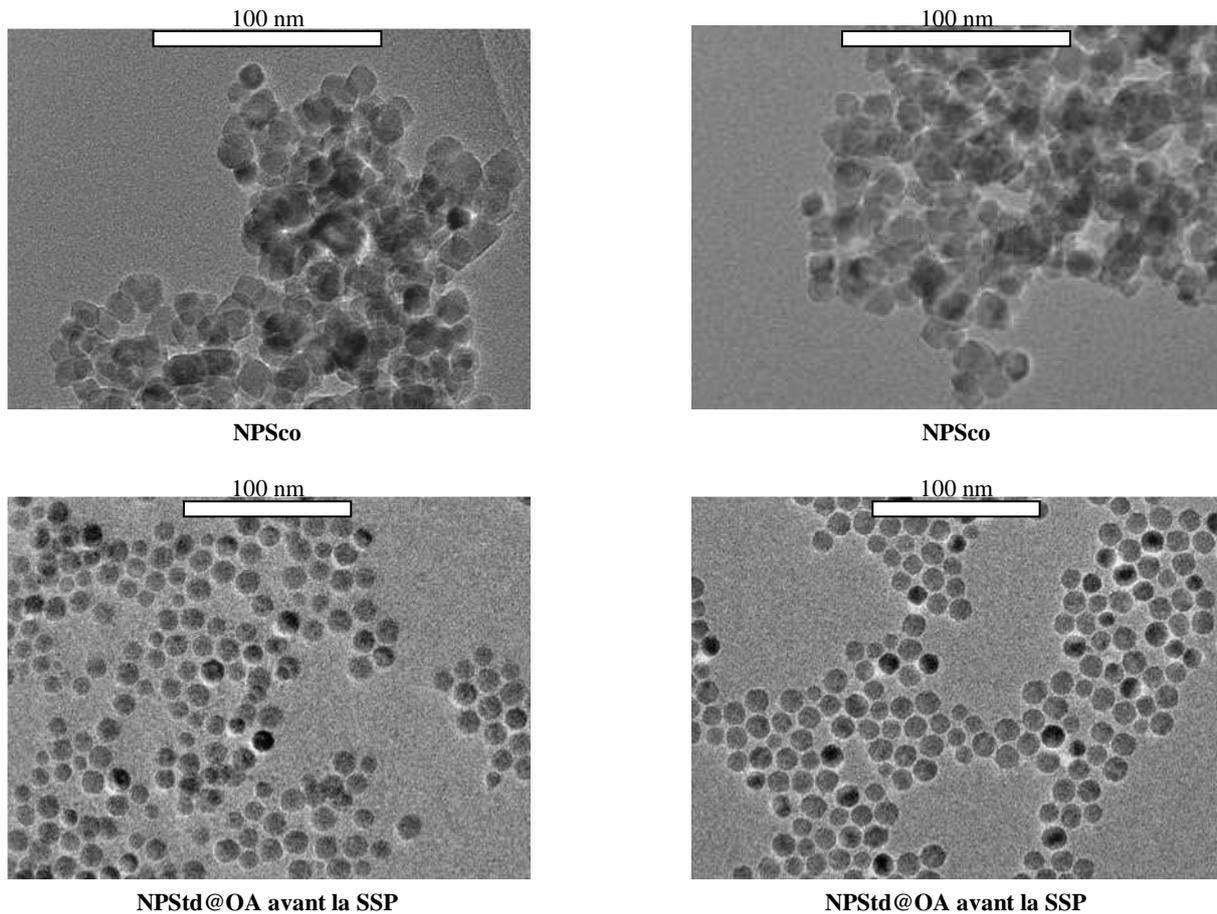


Figure 35 : micrographies MET à basse résolution des NPSco (en haut) et des NPStd@OA avant(en bas à gauche) et après la SSP (à droite).

L'observation des clichés MET donnés dans la Figure 35 montre que les nanoparticules synthétisées par co-précipitation sont très agglomérées et présentent des formes inhomogènes. L'échantillon est composé majoritairement de petites nanoparticules possédant le diamètre attendu, mais contient aussi quelques grosses nanoparticules. L'agglomération et la forme de ces nanoparticules rendent la mesure des diamètres plus délicate.

Les nanoparticules synthétisées par décomposition thermique, étant recouvertes d'acide oléique, ne sont pas agglomérées et s'auto-organisent spontanément sur la grille MET. Les formes de ces nanoparticules sont homogènes et sphériques. Dans la Figure 35 sont présentés les clichés MET des NPStd@OA avant et après l'étape de sélection de taille par SSP. Nous pouvons observer la disparition de la majorité des petites nanoparticules après la SSP. Ceci est confirmé par les histogrammes de la Figure 36.

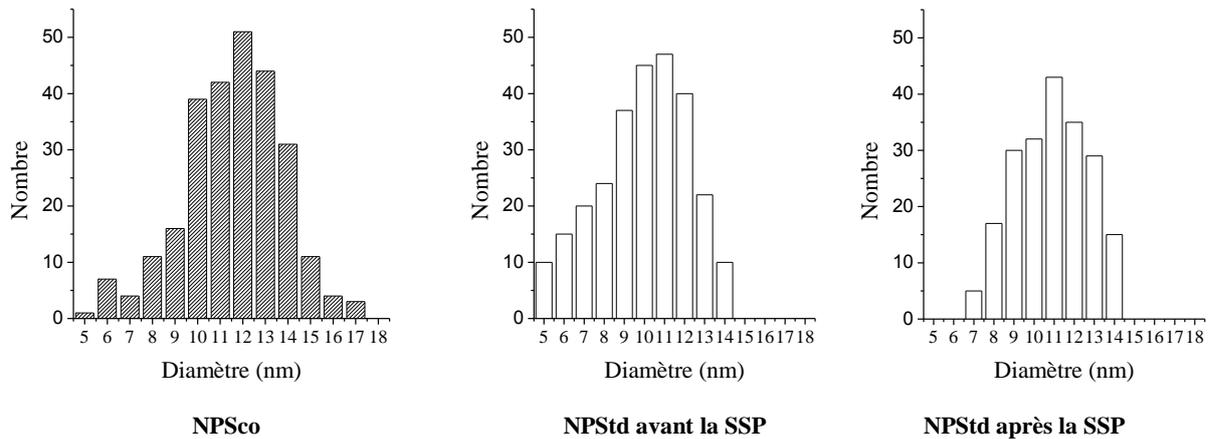


Figure 36 : distributions de taille des NPSco (à gauche) et des NPSStd@OA avant (au centre) et après la SSP (à droite).

Les histogrammes donnés dans la Figure 36 confirment les tendances observées sur les clichés MET. La distribution de taille des NPSStd@OA est beaucoup plus étroite après la SSP. Elle est aussi toujours après la SSP, plus étroite que celle des NPSco.

Les diamètres moyens obtenus par cette méthode sont en accord avec ceux obtenus par diffraction des rayons X (méthode de Scherrer) :

- NPSco :  $\Phi = 11,6 \pm 2$  nm ;
- NPSStd@OA :  $\Phi = 11,3 \pm 1$  nm après SSP.

#### Surface spécifique (BET)

La surface spécifique des NPSco sous forme de poudre a été déduite de l'isotherme d'adsorption de l'azote à l'aide de l'équation de Brunauer-Emmett-Teller (BET)<sup>281</sup>. Les échantillons, dégazés in-situ à 110°C, sont mesurés à la température de l'azote liquide avec l'azote comme molécule sonde. Le diamètre apparent des particules est déduit de la surface spécifique en utilisant l'équation suivante :

$$Sp \text{ (en } m^2) = \frac{4 \pi r^2}{\rho \frac{4}{3} \pi r^3} = \frac{3}{\rho r} = \frac{3}{\rho \frac{\Phi}{2}} = \frac{6}{\rho \Phi}$$

$$\Phi \text{ (en nm)} = \frac{6000}{\rho Sp}$$

- $\Phi$  diamètre équivalent en nm ;
- Sp est la surface spécifique en  $m^2/g$  ;
- $\rho$  est la masse volumique en  $g/cm^3$  (5,18 pour la magnétite).

Cette équation implique l'utilisation de la masse volumique et donc la connaissance de la nature du matériau qui forme les particules. Dans le cas de nos poudres de formule  $Fe_{2,94}O_4$  intermédiaires entre la magnétite  $Fe_3O_4$  et la maghémite  $\gamma-Fe_2O_3$ , la détermination du diamètre apparent par cette équation ne donnera donc qu'un ordre de grandeur. Nos nanoparticules étant majoritairement de magnétite, nous avons utilisé la masse volumique de celle-ci.

Le diamètre moyen obtenu par cette méthode est le suivant :

- NPSco :  $\Phi = 12,2 \pm 2$  nm pour une surface spécifique mesurée de  $95 \text{ m}^2/\text{g}$  ;

### **Bilan**

Le Tableau 9 résume les différentes mesures qui ont été faites pour déterminer la taille des nanoparticules synthétisées.

*Tableau 9 : récapitulatif des différentes mesures.*

Nature	$\Phi_{\text{DRXD.S.}}$ (nm)	$\Phi_{\text{DRXFULL}}$ (nm)	$\Phi_{\text{MET}}$ (nm)	$\Phi_{\text{BET}}$ (nm)
NPSco	$11,5 \pm 1$	$10 \pm 1$	$11,6 \pm 2$	$12,2 \pm 2$
NPStd@OA	$11 \pm 1$	$12 \pm 1$	$11,3 \pm 1$	

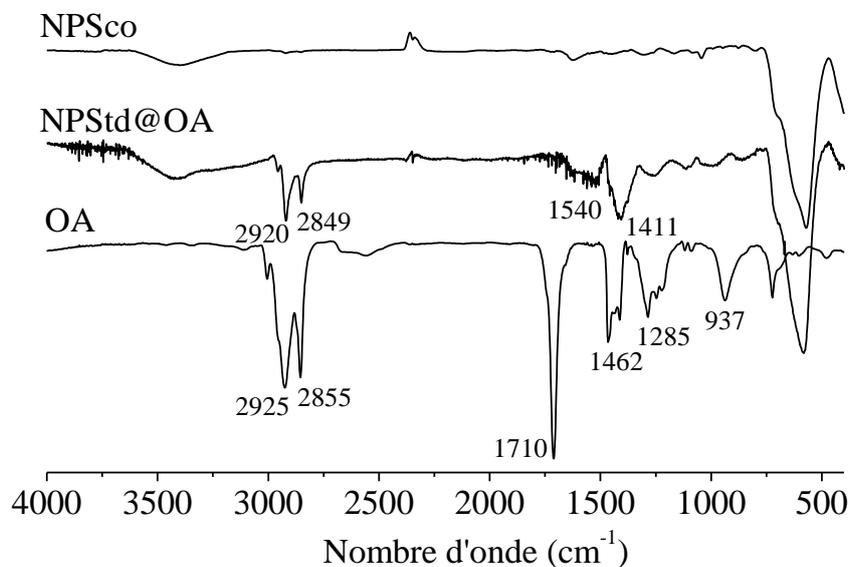
Ces mesures montrent que les nanoparticules synthétisées ont un diamètre de l'ordre de  $11,5 \pm 2$  nm. Nous noterons aussi que les NPStd@OA ont une distribution en taille plus étroite que les nanoparticules synthétisées par co-précipitation NPSco. Cette observation rejoint celles faites dans la littérature qui rapporte que le contrôle de la dispersion et de la taille des nanoparticules est plus délicat dans les synthèses par co-précipitation.

La synthèse des nanoparticules, bien que très reproductible, ne permet pas toujours d'obtenir le diamètre souhaité précis de l'ordre de 11,5 nm. De nombreux lots de nanoparticules ont été synthétisés au cours des travaux dont le diamètre moyen a varié selon les lots de 10 à 12 nm. La taille sera précisée pour chaque expérience quand elle différera de cette valeur moyenne de 11,5 nm.

## **1.2.2 Caractérisation de surface**

### *Spectroscopie infrarouge*

La spectroscopie infrarouge a permis de confirmer l'état de surface des NPSco et des NPStd@OA.



*Figure 37 : spectres infrarouges des NPSco, des NPStd@OA (en noir) et de l'acide oléique (OA).*

Le spectre infrarouge des NPSco (Figure 37) montre bien que ces nanoparticules sont nues car seules les bandes appartenant aux liaisons Fe–O ( $570\text{ cm}^{-1}$ ) et les bandes associées à l'eau vers  $1600$  et  $3500\text{ cm}^{-1}$  sont identifiées. Le spectre des NPStd@OA comprend, en plus des bandes appartenant aux liaisons Fe–O ( $581\text{ cm}^{-1}$ ), les bandes liées à la présence d'acide oléique qui sont indexées dans le tableau suivant.

*Tableau 10 : indexation des principales bandes d'absorption infrarouges de l'acide oléique sur les NPStd@OA.*

Nombre d'onde ( $\text{cm}^{-1}$ )	Vibrations
1420	$\nu_{\text{as}}(\text{COO}^-)$
1540	$\nu_{\text{s}}(\text{COO}^-)$
2849	$\nu_{\text{s}}(\text{CH}_2)$
2920	$\nu_{\text{as}}(\text{CH}_2)$

L'acide oléique non greffé présente une bande intense à  $1710\text{ cm}^{-1}$  associée aux liaisons C=O, ainsi qu'une bande à  $1285\text{ cm}^{-1}$  associée aux liaisons C–O. Les vibrations des liaisons O–H dans le plan et hors du plan apparaissent respectivement à  $1462\text{ cm}^{-1}$  et à  $937\text{ cm}^{-1}$  <sup>282 283 284</sup>. Dans le spectre relatif NPStd@OA, les bandes associées aux liaisons C=O ( $1710\text{ cm}^{-1}$ ) et C–O ( $1285\text{ cm}^{-1}$ ) ainsi que la bande à  $937\text{ cm}^{-1}$  disparaissent quasiment totalement. La bande à  $1710\text{ cm}^{-1}$  est caractéristique des molécules non greffées. Cette bande disparaît complètement dans le spectre des nanoparticules ce qui montre que les lavages ont éliminé la quasi-totalité des molécules d'oléate libres.

En revanche, de nouvelles bandes apparaissent dans la région attribuée aux groupements  $\text{COO}^-$ . Une première bande assez large apparaît dans le domaine  $1700 - 1500\text{ cm}^{-1}$  attribuée aux modes d'élongation symétrique  $\nu_{\text{s}}$  des groupements  $\text{COO}^-$ , et une deuxième bande apparaît dans le domaine  $1400 - 1350\text{ cm}^{-1}$  attribuée aux modes d'élongation asymétrique  $\nu_{\text{as}}$  des groupements  $\text{COO}^-$ . L'attribution de cette dernière n'est pas aisée, car plusieurs bandes de faible intensité coexistent dans cette gamme de nombre d'onde.

La différence entre les nombres d'onde des bandes asymétriques  $\nu_{\text{as}}(\text{COO}^-)$  et symétriques  $\nu_{\text{s}}(\text{COO}^-)$  est généralement utilisée pour distinguer les différents types d'interaction entre le groupement carboxylate et les atomes métalliques. Une grande différence ( $200 - 300\text{ cm}^{-1}$ ) correspond à une interaction de type monodentate, une différence dans la gamme  $140 - 190\text{ cm}^{-1}$  à une interaction de type bidentate pontant et une plus petite différence ( $< 110\text{ cm}^{-1}$ ) au bidentate chélate <sup>285</sup>. Dans notre cas, la différence entre les bandes  $\nu_{\text{as}}(\text{COO}^-)$  et  $\nu_{\text{s}}(\text{COO}^-)$  est de  $220\text{ cm}^{-1}$ , ce qui suggère que le carboxylate forme une liaison monodentate avec la surface d'oxyde de fer. Cependant, ces bandes sont mal résolues, ce qui suggère l'existence de modes de coordination variés <sup>286</sup>.

### **Analyse thermogravimétrique sous air (ATG)**

Des analyses thermogravimétriques (ATG) ont été réalisées sous air avec un appareil de TA INSTRUMENT. La vitesse de montée en température a été fixée à  $5^\circ\text{C}/\text{min}$ . Le but des mesures ATG est de suivre les pertes de masse dues à la présence d'impuretés à la surface des particules (eau chimisorbée et physisorbée et les restes de base organique). Elles peuvent permettre ainsi de remonter au nombre de molécules greffées à la surface des nanoparticules ou d'évaluer l'état d'oxydation d'un matériau.

La courbe ATG des NPSco (Figure 38) montre une perte de masse dès le début de la montée en température, attribuée à l'élimination de l'eau physisorbée, suivie d'une prise de masse entre  $100^\circ\text{C}$  et  $200^\circ\text{C}$ , et d'une faible perte au-dessus de  $250^\circ\text{C}$ . Ce comportement complexe résulte de deux phénomènes qui ont lieu simultanément : la déshydratation et l'oxydation des ions  $\text{Fe}^{2+}$  de la poudre.

La compétition entre la déshydratation et l'oxydation de  $\text{Fe}^{2+}$  ne permet pas d'évaluer la prise de masse correspondant à l'oxydation de  $\text{Fe}^{2+}$ .

La courbe ATG des NPStd@OA montre également une perte de masse dès la montée en température attribuée à l'élimination de trace de solvant. Cependant, la prise de masse observée pour les NPSCO à partir de 100 °C est moins visible avec les NPStd@OA. En effet, la prise de masse est compensée par une perte de masse liée au début de la décomposition des oléates de surfaces des NPStd@OA. Cette compensation se traduit alors sur la courbe par un léger plateau vers 200 °C. Il s'en suit une perte de masse brutale, de l'ordre de 10% entre 200 et 350 °C, dès que l'oxydation des nanoparticules est complète. La courbe se termine par une perte faible au-dessus de 350 °C.

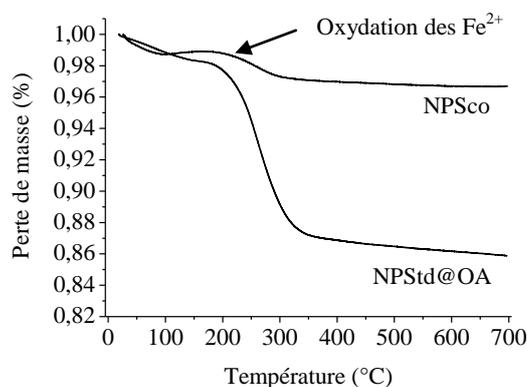


Figure 38 : courbes ATG des NPSCO et de NPStd@OA.

En conclusion, les courbes ATG, qui montrent une grande différence de perte de masse entre les NPSCO et les NPStd@OA, confirment bien, comme les spectres IR, que les NPSCO sont nues tandis que les NPStd@OA sont recouvertes d'oléates. Les ATG ne permettront pas d'évaluer un nombre précis de molécules greffées en raison des phénomènes en compétition qui existent entre les pertes de masse dues à la décomposition des molécules et la prise de masse due à l'oxydation des  $\text{Fe}^{2+}$ . Ces phénomènes compétitifs font que la détermination de taux de greffage s'avérera délicate par cette méthode.

### 1.2.3 Stabilité colloïdale des nanoparticules

#### *Mesures de potentiel zêta en fonction du pH*

La mesure du potentiel zêta est un bon indicateur de la stabilité électrostatique des nanoparticules en suspensions aqueuses (annexe 5). Elle donne, en fonction du pH une évaluation indirecte de la charge de surface des nano-objets et donc des forces d'interactions qui en résultent. La valeur du potentiel zêta dépend de nombreux paramètres comme la nature du matériau, la taille des objets, la force ionique, la température du solvant. Elle permet de déterminer le point isoélectrique (PIE) de nano-objets qui représente le pH pour lequel l'équilibre des charges au voisinage de la surface est nul. La mesure du potentiel zêta est alors un bon moyen de caractériser les modifications de surface après le greffage de molécules par exemple.

Les mesures ont été réalisées avec un nano-size MALVERN (nano ZS). Elles n'ont été effectuées que sur les suspensions de NPSCO (Figure 39) car les NPStd@OA ne sont pas stables en suspension aqueuse du fait de la présence de la couche d'acide oléique hydrophobes.

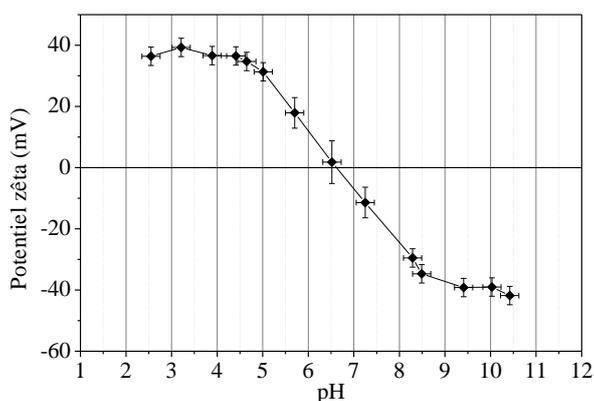


Figure 39 : courbe de l'évolution du potentiel zêta en fonction du pH des NPSco.

Les mesures de potentiel zêta en fonction du pH montrent que le PIE des NPSco est proche du pH = 6,5. Cette valeur correspond à celle retrouvée dans la littérature pour ce type de nanoparticules<sup>144</sup>. Cette mesure confirme donc la nudité des NPSco et la nécessité de modifier leur état de surface pour pouvoir les stabiliser dans des milieux physiologiques à des pH de l'ordre de 7.

### Mesures granulométriques par DLS

La technique de la diffusion dynamique de la lumière (annexe 6) permet d'obtenir la distribution en taille de particules colloïdales en suspension dans un milieu liquide, dans une gamme de 1 nm à quelques micromètres de diamètre. Les mesures ont été effectuées avec un nano-size MALVERN (nano ZS).

Pour faire la mesure, les NPStd@OA ont été dispersées dans de l'hexane qui est le solvant des nanoparticules avant l'étape de greffage. La mesure des NPSco s'est faite dans l'eau qui est utilisée pour l'étape de greffage et à pH = 7 car celui-ci est proche du pH des milieux physiologiques (pH= 7,4).

Les distributions présentées sont celles en volume car elles sont plus représentatives des objets en suspension (Figure 40).

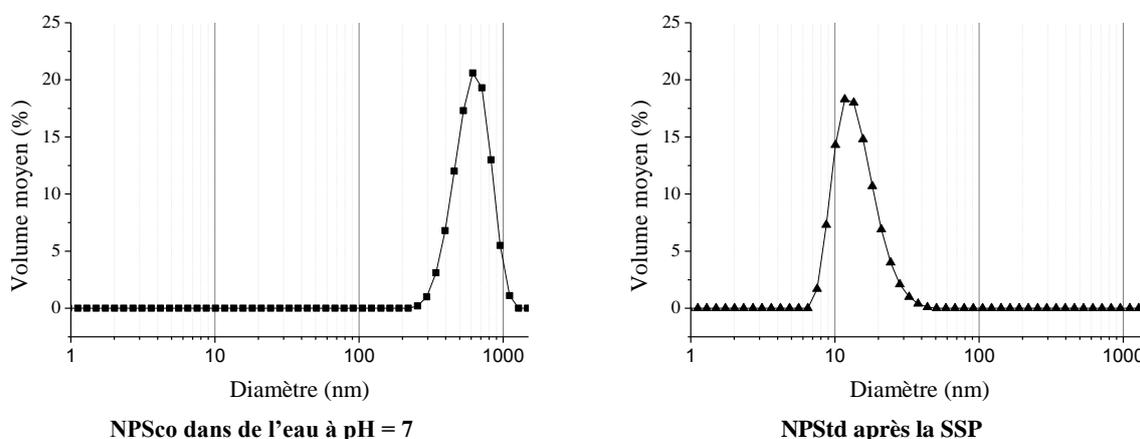


Figure 40 : distribution de taille en volume des NPSco dans l'eau à pH = 7 (à gauche) et des NPStd@OA dans l'hexane.

Les distributions sont monomodales et les diamètres hydrodynamiques moyens des particules en suspension sont :

- NPScO :  $\Phi = 600 \pm 100$  nm ;
- NPStd@OA :  $\Phi = 14 \pm 5$  nm.

Ces diamètres moyens sont supérieurs aux diamètres des nanoparticules déterminés par MET. En effet, dans le cas des NPStd@OA, le rayon hydrodynamique prend en compte la couche de molécules greffées (environ 1,3 nm) et les couches de solvation. Nous rappelons que les NPStd@OA sont recouvertes d'acide oléique dès la fin de leur synthèse. Les molécules d'acide oléique forment une couche qui se déploie dans l'hexane pour stabiliser les nanoparticules. La molécule d'acide oléique a un rayon hydrodynamique d'environ 1,3 nm. La présence de cette couche de molécules augmente donc le diamètre apparent des nanoparticules dans le solvant. Il passe de 11,3 nm à 14 nm ce qui correspond au diamètre d'une nanoparticule de 11,3 nm recouverte d'une monocouche d'acide oléique. Les suspensions de NPStd@OA sont donc stables et monodisperses.

Les NPScO sont nues à la fin de leur synthèse. Nous avons vu dans les paragraphes précédents que leur stabilité en milieu aqueux dépend de leur charge de surface qui, selon le pH, crée des forces de répulsions électrostatiques plus ou moins fortes. Nous avons vu également que les NPScO ont une charge de surface nulle au pH proche de 7 et qu'il n'y avait donc aucune force pour les stabiliser en suspension. Elles forment donc à ces pH des agglomérats de très grosses tailles qui sédimentent rapidement.

#### **1.2.4 Analyse des propriétés magnétiques**

---

Les propriétés magnétiques des NPScO et des NPStd@OA ont été analysées par des mesures de cycles d'aimantation et des courbes ZFC/FC (Zero Field Cool/Field cool, annexe 1).

##### ***Courbes ZFC/FC***

Une des caractérisations des propriétés magnétiques consiste à enregistrer la variation de l'aimantation en fonction de la température sous un champ magnétique statique. Dans un premier temps, l'aimantation est enregistrée entre 5 K et 300 K sous un champ magnétique de 75 Oe après avoir diminué la température de l'ambiante à 5 K sans appliquer de champ magnétique. Cette mesure se traduit par une courbe nommée ZFC (Zero Field Cooled). L'échantillon est ensuite refroidi de 300 K à 5 K en maintenant le champ de 75 Oe, et nous enregistrons l'aimantation entre 5 K et 300 K, toujours sous un champ magnétique de 75 Oe. Cette mesure se traduit par une courbe nommée FC (Field Cooled).

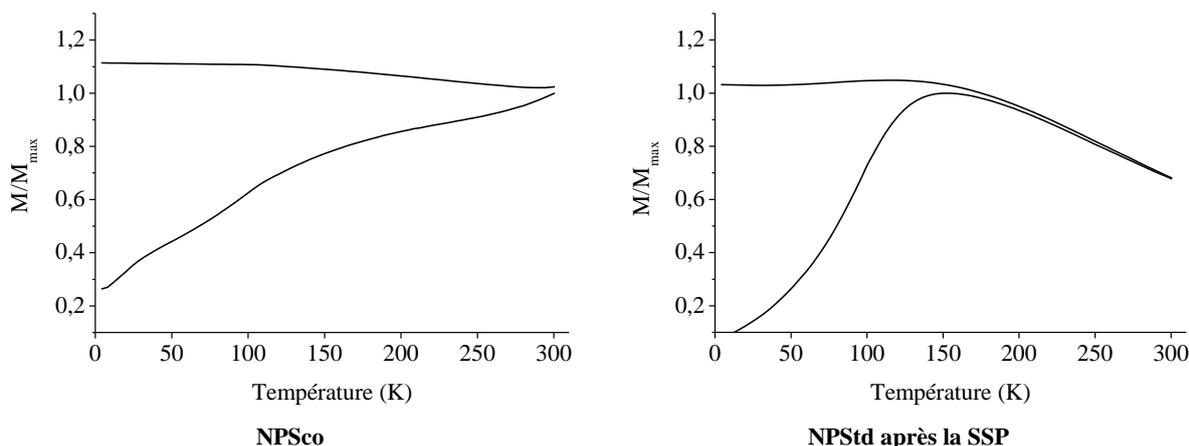


Figure 41 : courbe ZFC/FC des NPSco (à gauche) et des NPStd@OA (à droite).

Les courbes ZFC/FC des NPSco et NPStd@OA (Figure 41) sont caractéristiques des nanoparticules superparamagnétiques. Le maximum de l'aimantation de la courbe ZFC peut être assimilé à la température de blocage  $T_B$  qui marque la transition d'un comportement magnétique superparamagnétique à un comportement ferrimagnétique. Cette température des NPStd@OA, qui est autour de 150 K, correspond aux températures de blocage publiées dans la littérature pour ce type de taille de nanoparticules<sup>114</sup>. La courbe ZFC des NPSco ne montre clairement pas de maximum de l'aimantation et la température de blocage semble être supérieure à 300 K. Cette haute valeur de  $T_B$  résulte de l'état d'agrégation des NPSco qui induit des interactions dipolaires importantes entre nanoparticules et provoque un décalage de la température de blocage vers des valeurs plus hautes. En effet, ces interactions introduisent une barrière d'énergie supplémentaire pour le retournement de l'aimantation, ce qui se traduit par une augmentation de la température du maximum de la ZFC<sup>287 288 289</sup>.

### Cycles d'aimantation

Les cycles d'aimantation donnent l'évolution de l'aimantation d'un matériau en fonction de l'intensité d'un champ magnétique extérieur. Les cycles d'aimantation sont effectués à 300K et à 5 K après avoir refroidi l'échantillon sans appliquer de champ magnétique. L'aimantation à saturation est déterminée d'après la masse d'échantillon pesée, en retranchant la masse d'acide oléique (pour les NPStd@OA), d'eau ou de solvant résiduel calculée à partir des courbes ATG.

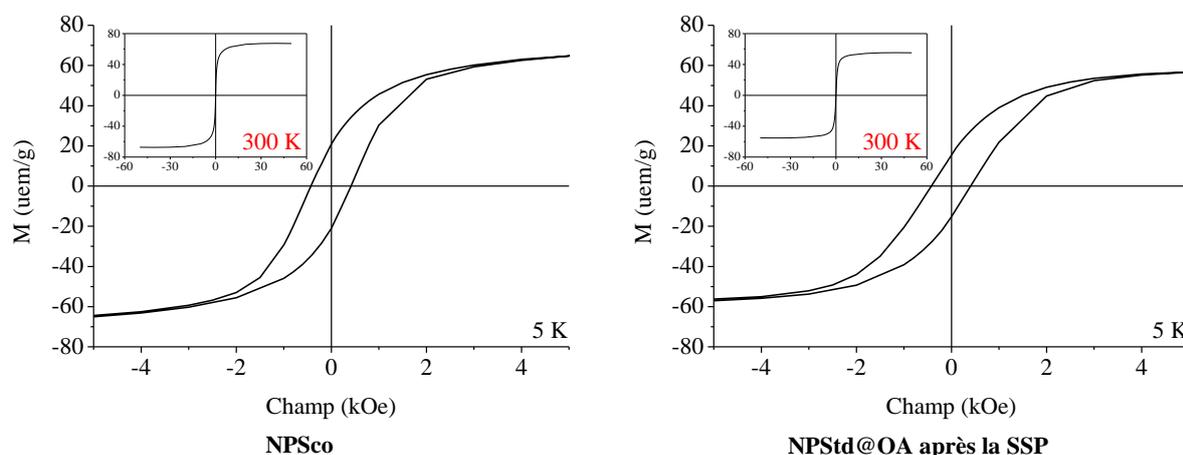


Figure 42 : cycle d'aimantation à 5K et 300K des NPSco (à gauche) et des NPStd@OA (à droite).

Les courbes d'aimantation des NPScO et des NPStd@OA enregistrées à température ambiante et à 5 K sont présentées dans la Figure 42.

#### Cycle à 300K :

Dans les deux cas, le cycle ne comporte pas d'hystérésis à température ambiante. Ils sont caractéristiques d'un comportement superparamagnétique. Les valeurs d'aimantation à saturation des NPScO et des NPStd@OA de diamètre 11,5 nm sont de 65 et 55 uem/g respectivement. L'aimantation à saturation des NPStd@OA est donc inférieure à celle des NPScO. De plus les aimantations à saturation sont inférieures à celles de la magnétite (92 uem/g) et de la maghémite massives (76 uem/g). Ces plus faibles valeurs sont généralement expliquées par des effets de taille et/ou par des effets de surface prépondérants à cette échelle. En effet, ces valeurs plus faibles sont attribuées à un « canting » de la couche oxydée<sup>290 291</sup>.

Pour valider cette hypothèse des spectres Mössbauer ont été enregistrés à basse température et sous champ afin de mieux comprendre les effets magnétiques en surface et la répartition des atomes de Fe au sein des sites tétraédriques et octaédriques. Les spectres Mössbauer ont été enregistrés à 10 K sous un champ appliqué de 8 T orienté parallèlement à la direction du rayonnement  $\gamma$  (Figure 43). Des spectres ont été obtenus avec des nanoparticules de 12 et 9  $\pm$ 1 nm issues de la synthèse par décomposition thermique et avec des nanoparticules de 12  $\pm$ 1 nm synthétisées par co-précipitation.

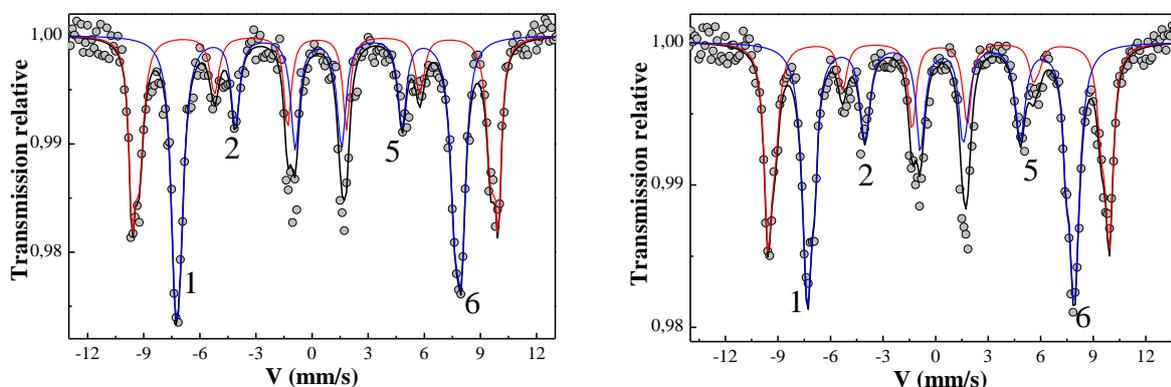


Figure 43 : spectres Mössbauer des NPStd@OA de 9 nm (gauche) et de 12 nm (droite) à 10 K et sous un champ de 8 T.

Sur les spectres Mössbauer des nanoparticules synthétisées par décomposition thermique, nous constatons un dédoublement des raies externes (1, 6) et intermédiaires (2, 5) et une diminution des intensités des raies intermédiaires. Ces phénomènes sont la conséquence d'une structure ferrimagnétique : en effet, les moments de Fe des sites octaédriques vont s'orienter parallèlement au champ externe alors que ceux des sites tétraédriques seront antiparallèles. Comme les champs hyperfins sont opposés aux moments magnétiques (terme de Fermi prépondérant mais de valeur négative), le champ effectif, équivalent à la somme vectorielle du champ hyperfin et du champ appliqué, sera supérieur au champ hyperfin pour le site tétraédrique, et inférieur pour le site octaédrique. Ce comportement ferrimagnétique permet ainsi de séparer les deux composantes, et d'estimer précisément chacune des populations tétraédriques et octaédriques à partir des surfaces d'absorptions relatives. Par ailleurs, comme le champ magnétique est appliqué parallèlement dans le système cryomagnétique utilisé, l'orientation des moments entrainera une diminution des intensités des raies intermédiaires (un alignement parfait conduisant à la disparition de ces raies).

Pour les NPStd@OA de 9 et 12 nm (Figure 43), les raies intermédiaires sont présentes et leurs intensités relatives permettent de mesurer un angle moyen de « canting » des moments de Fe de l'ordre de 30 - 35° de spin pour les sites tétraédriques et octaédriques. Plusieurs spectres Mössbauer sous champ magnétique ont été mesurés pour des NPStd@OA provenant de lots différents, et les résultats étaient similaires aux incertitudes de mesure près. Le spectre présenté dans la Figure 43 est représentatif des différents spectres obtenus.

Il est à noter que le « canting » observé dans les oxydes type ferrite peut provenir d'un désordre chimique interne modifiant ainsi le schéma des interactions entre les porteurs de moments magnétiques, induisant des phénomènes de frustration magnétique et par conséquent une structure non colinéaire. Dans le cas de nanoparticules, les effets de surface deviennent très importants avec des distorsions structurales provoquées par la brisure de symétrie à l'origine d'une structure magnétique présentant un « canting » de spin (modification des angles de superéchange, des valeurs des couplages et des moments magnétiques)<sup>292,293,294,295,296</sup>. A partir des valeurs moyennes des angles de « canting », il est possible d'estimer l'épaisseur  $e$  de la couche superficielle possédant une structure magnétique avec un « canting » de spin, qui *a priori* appartiendrait à la maghémite issue de l'oxydation de la magnétite ( $e = r/2 \sin^2\theta$ ) où  $r$  correspond au rayon moyen de la nanoparticule et  $\theta$  à l'angle moyen de « canting ».

Pour les NPStd@AO de 9 nm,  $e = 0,72 \pm 0,1$  nm soit 2 couches atomiques au maximum dont les moments seraient cantés. Par ailleurs, l'analyse des résultats en terme de proportions sites tétraédriques/octaédriques 41:59 montre un léger excès de Fe en site tétraédriques ce qui se traduit par des phénomènes de spin inversés pour ces petites particules, pouvant ainsi induire une structure magnétique non colinéaire (due à la frustration) en « volume ».

Pour les NPStd@AO de 12 nm,  $e = 0,77 \pm 0,1$  nm ce qui correspond à 2 couches atomiques dont les moments seraient cantés. Par ailleurs, l'analyse des résultats en termes de proportions sites tétraédriques/octaédriques 38:62 est en parfait accord avec ceux de la phase maghémite, fortement majoritaire.

L'aimantation à saturation des nanoparticules de 9 nm est de 47 uem/g et celle des nanoparticules de 12 nm de 55 uem/g. L'épaisseur de la couche cantée explique la plus faible aimantation de ces nanoparticules et la différence entre les aimantations des nanoparticules de 9 et 12 nm s'expliquerait par la répartition des atomes de fer sur les sites induisant pour les nanoparticules de 9 nm une structure magnétique non colinéaire en volume conduisant à une diminution supplémentaire de l'aimantation..

Le spectre Mössbauer des nanoparticules de 10 nm synthétisées par co-précipitation est présenté dans la Figure 44.

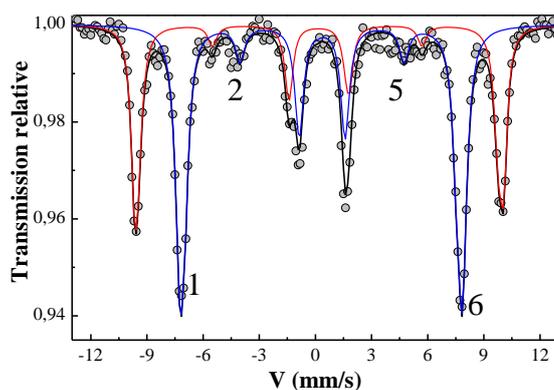


Figure 44 : spectre Mössbauer des NPSCO (BN28) à 10 K et sous un champ de 8 T.

Pour les NPSCO, les observations sont similaires à celles décrites précédemment dans le cas des nanoparticules synthétisées par décomposition thermique et recouvertes d'acide oléique. Les angles moyens de « canting » des moments de Fe pour les sites tétraédriques et octaédriques sont de l'ordre de 22 - 23(5) °, soit une couche magnétiquement cantée de 0,35(5) nm d'épaisseur, équivalente à 1 couche. Par ailleurs, l'analyse des résultats en termes de proportions sites tétraédriques/octaédriques 38:62 est en parfait accord avec ceux de la phase maghémite, fortement majoritaire.

Nous pouvons constater que les nanoparticules synthétisées par co-précipitation (NPSCO) présentent une couche magnétiquement cantée d'une épaisseur plus petite que celle des nanoparticules synthétisées par décomposition thermique NPSTD@OA (0,35 et 0,7 nm respectivement). Cette différence explique en grande partie l'aimantation à saturation plus élevée pour les nanoparticules synthétisées par co-précipitation par comparaison à celles synthétisées par décomposition thermique. Une étude antérieure sur l'influence de l'agent de couplage (carboxylate ou phosphonate) sur les propriétés magnétiques de nanoparticules d'oxyde de fer avait montré que les nanoparticules fonctionnalisées en utilisant un groupement carboxylate en tant qu'agent de couplage présentaient une couche cantée de surface plus importante que celles fonctionnalisées par un groupement phosphonate<sup>183</sup>. Ainsi, cette couche cantée plus importante pour les nanoparticules synthétisées par décomposition thermique pourrait s'expliquer par la présence des molécules d'acide oléique à la surface des nanoparticules.

#### Cycle à 5 K

A basse température, les courbes d'aimantation présentent un cycle d'hystérèse ouvert. Les valeurs des champs coercitifs sont respectivement de 416 et 400 Oe pour les NPSCO et les NPSTD@OA et les valeurs de  $M_r/M_s$  (aimantation rémanente/aimantation à saturation) sont respectivement de 0,27 et de 0,3 pour les NPSCO et les NPSTD@OA. Un ensemble de nanoparticules superparamagnétiques avec des axes d'anisotropie uniaxiale orientés aléatoirement présente en théorie un rapport  $M_r/M_s$  égal à 0,5 à basse température<sup>297</sup>. Le rapport observé ici est inférieur à 0,5 tant pour les NPSCO que pour les NPSTD@OA. Il y a donc des interactions dipolaires dans nos deux poudres. La valeur du rapport  $M_r/M_s$  des NPSCO est cependant inférieure à celle des NPSTD@OA, ce qui montre que les interactions dipolaires sont plus importantes dans la poudre de NPSCO que dans la poudre de NPSTD@OA (les NPSTD@OA sont en effet moins agrégées que les NPSCO).

## 1.3 Conclusion

---

Les deux méthodes de synthèse employées ont permis d'obtenir des nanoparticules d'oxyde de fer magnétiques avec une taille moyenne de  $11,5 \pm 1$  nm. Les caractérisations montrent une bonne cristallinité des nanoparticules. L'analyse structurale montre que leur structure cristalline peut être qualifiée de magnétite sous-stœchiométrique. Les nanoparticules issues de la décomposition thermique (**NPStd@OA**) sont recouvertes d'acide oléique en fin de synthèse et sont très stables dans les solvants organiques. Contrairement aux nanoparticules synthétisées par co-précipitation (**NPSco**), elles ne s'agrègent pas ce qui leur confère une distribution de taille en suspension plus étroite et un diamètre hydrodynamique moyen plus petit. Cependant, les NPStd@OA présentent une aimantation à saturation plus faible que les NPSco (55 et 65 uem/g respectivement). Cette plus faible aimantation a été attribuée à la présence d'une couche cantée en spin de plus grande épaisseur.

## 2 LES DENDRONS : SYNTHÈSE ET CARACTÉRISATION

---

L'objectif des travaux qui vont être présentés est de synthétiser des dendrons possédant différentes fonctionnalités en périphérie et en quantité suffisante pour être en mesure d'effectuer une étude complète sur le greffage. Toutes les molécules synthétisées, aussi bien les dendrons finaux que les produits intermédiaires, ont été analysées par RMN du proton, du carbone et par spectrométrie de masse (annexe 11). Ces trois techniques de caractérisation sont indispensables pour définir de la manière la plus simple et la plus efficace les molécules obtenues et leur degré de pureté. Une étude des spectres IR des trois dendrons finaux a également été réalisée dans le but de bien définir les bandes appartenant à l'agent de couplage phosphonate et de suivre leur évolution après le greffage.

### 2.1 La synthèse des dendrons

---

Les synthèses des dendrons ont été effectuées par une série d'étapes classiques de chimie organique (étherification, réduction, bromation, annexe 7). Les dendrons sont les briques de base pour l'élaboration de composés branchés globulaires appelés « dendrimères »<sup>298 299</sup>. Ces synthons possèdent un point focal pouvant se greffer sur un support moléculaire ou solide pour la synthèse d'hybrides ; ils possèdent également des extrémités branchées pouvant être fonctionnalisées.

#### 2.1.1 Le dendron de départ : ANA

---

La synthèse du dendron ANA est simple de mise en œuvre et peut donc être effectuée à l'échelle de plusieurs grammes<sup>183 300</sup>. Cette synthèse peut être décrite en deux grandes étapes qui sont le greffage des chaînes tétraéthylène glycol sur un cycle aromatique puis la formation du groupement phosphonate au point focal du dendron (Figure 47).

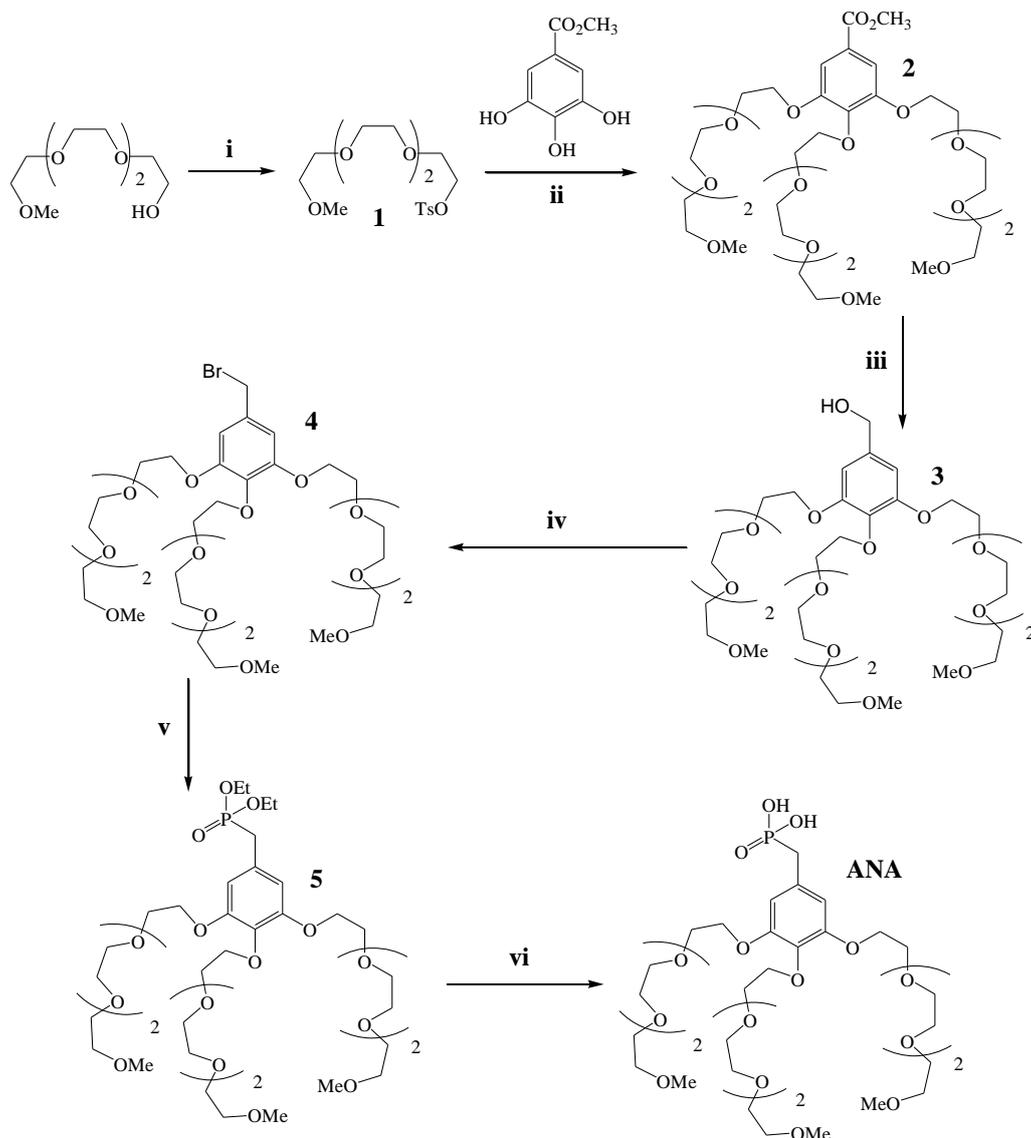


Figure 45 : schéma réactionnel des différentes étapes de la synthèse du dendron ANA.  
 i)  $p\text{TsCl}$  (1,4 eq.),  $\text{NaOH}$  (1,9 eq.),  $\text{THF}/\text{H}_2\text{O}$ ,  $0\text{ }^\circ\text{C} \rightarrow T_{\text{amb}}$ , 2 jours, 96 % ;  
 ii) 3, 4, 5-trihydroxybenzoate de méthyle (1,0 eq.), **1** (3,4 eq.),  $\text{KI}$  (0,005 eq.),  $\text{K}_2\text{CO}_3$  (10 eq.),  $\text{DMF}$ ,  $80\text{ }^\circ\text{C}$ , 72 h, 71 % ;  
 iii)  $\text{LiAlH}_4$  (1,3 eq.),  $\text{THF}$ ,  $0\text{ }^\circ\text{C} \rightarrow T_{\text{amb}}$ , 20 h, 95 % ;  
 iv)  $\text{TMSBr}$  (1,3 eq.),  $\text{CHCl}_3$ ,  $0\text{ }^\circ\text{C} \rightarrow T_{\text{amb}}$ , 2 jours, 92 % ;  
 v)  $\text{P}(\text{OEt})_3$  (3,6 eq.),  $140\text{ }^\circ\text{C}$ , 2 h, 99 % ;  
 vi)  $\text{TMSBr}$  (2,7 eq.),  $\text{CH}_2\text{Cl}_2, \text{MeOH}$ ,  $0\text{ }^\circ\text{C} \rightarrow T_{\text{amb}}$ , 2 jours, 94 %.

### Greffage des chaînes TEG

La synthèse du dendron **ANA** commence par l'activation de la fonction alcool de l'éther monométhyle de tétraéthylène glycol sous la forme de tosylate. Cette activation est effectuée par traitement avec du chlorure de tosyloxy en présence de soude (solution aqueuse saturée) dans le tétrahydrofurane (THF) maintenu à  $0\text{ }^\circ\text{C}$ <sup>301</sup>. Cette première étape permet d'obtenir le produit **1** avec un rendement de 96 %.

La réaction de Williamson entre le 3,4,5-trihydroxybenzoate de méthyle et l'alcool activé **1** dans le diméthylformamide (DMF) en présence de  $\text{K}_2\text{CO}_3$  et de  $\text{KI}$  permet le greffage des chaînes TEG (étape ii) et mène à l'ester méthylique **2** avec un rendement de 71 %.

### Formation du groupement phosphonate

L'ester méthylique **2** est alors réduit par  $\text{LiAlH}_4$  (étape iii) dans le THF pour obtenir l'alcool benzylique correspondant **3** avec un rendement de 95%. La bromation de l'alcool **3** par le bromure de triméthylsilane (étape iv) dans le chloroforme à  $0^\circ\text{C}$  conduit au dérivé bromé correspondant **4** avec un rendement de 92 %.

Ce dernier est alors traité par de la triéthylphosphite à  $140^\circ\text{C}$  (étape v) pour obtenir le phosphonate d'éthyle **5** avec un rendement quasi quantitatif (99 %). Celui-ci est alors hydrolysé par une procédure de silylation/méthanolyse en utilisant le bromure de triméthylsilane (étape vi) dans du dichlorométhane ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) suivi d'une méthanolyse (Figure 46) pour aboutir à la molécule **ANA** avec un rendement de 94 %.

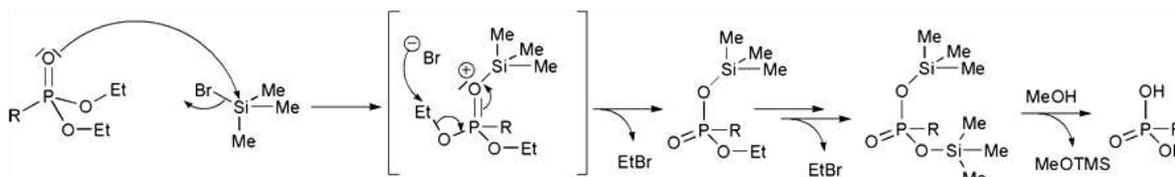


Figure 46 : mécanisme de silylation/méthanolyse du dialkylphosphonate.

## 2.1.2 Les dendrons fonctionnalisés en périphérie: : ANACOOH et ANANH2

### A. Le composé intermédiaire

La synthèse de ces deux dendrons commence par celle d'un composé intermédiaire commun (composé INT, Figure 47). Structurellement parlant, ce composé **INT** est très proche du dendron **ANA**, mais nécessite cependant deux étapes de synthèse supplémentaires (i et iv) de protection/déprotection de l'alcool qui servira de point d'ancrage à la chaîne PEG8-COOH ou PEG8-NH2 des dendrons ANACOOH et ANANH2 respectivement (Figure 48 et Figure 49).

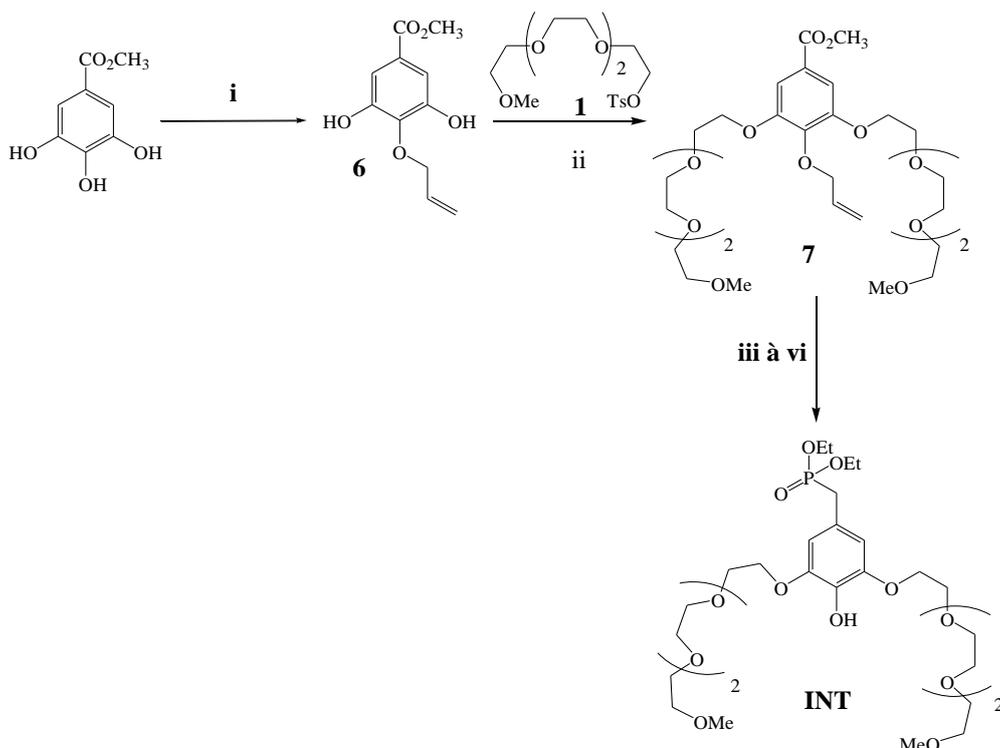


Figure 47 : schéma réactionnel des différentes étapes de la synthèse du composé INT.

i) Bromure d'allyle (1,0 eq.),  $\text{KHCO}_3$  (4,0 eq.), KI (0,005 eq.), DMF, 30 °C, 5 jours, 87 %;

ii) **1** (2,2 eq.),  $\text{K}_2\text{CO}_3$  (5,0 eq.), KI (0,3 eq.), acétone, 60 °C, 24h, 70 % ;

iii)  $\text{LiAlH}_4$  (0,5 eq.), THF, 0 °C  $\rightarrow T_{\text{amb}}$ , 1 h, 95 % ;

iv)  $\text{PBr}_3$  (1,8 eq.),  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , 0 °C  $\rightarrow T_{\text{amb}}$ , 2 h, 92 % ;

v)  $\text{P}(\text{OEt})_3$ , 160 °C, 2h, 99 % ;

vi)  $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$  (0,02 eq.),  $\text{NaBH}_4$  (2,5 eq.), THF/DMF,  $T_{\text{amb}}$ , 2 h, 76 %.

### Protection sélective de la position *para* du cœur aromatique et greffage des chaînes TEG

La synthèse du composé INT commence par la protection sélective de l'alcool en position *para* du 3,4,5-trihydroxybenzoate de méthyle. Cette protection est effectuée par traitement avec du bromure d'allyle dans du DMF à 30°C en présence de  $\text{KHCO}_3$  et de KI. Le composé **6** est alors obtenu avec un rendement de 87 %. La réaction de Williamson entre le produit **6** et l'alcool activé **1**, en présence de  $\text{K}_2\text{CO}_3$  et de KI, permet alors le greffage de deux chaînes TEG et mène à l'ester méthylique **7** avec un rendement de 70 %.

### Formation du groupement phosphonate d'éthyle

L'ester méthylique **7** est alors réduit par  $\text{LiAlH}_4$  dans le THF pour obtenir l'alcool benzylique correspondant **8** avec un rendement de 95 % dont la bromation par le tribromure de phosphore dans le  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  à 0 °C conduit au produit bromé avec un rendement de 92 %. Ce dernier est alors traité par de la triéthylphosphite à 160 °C pour obtenir l'ester phosphonique avec un rendement de 99 %.

La dernière étape consiste à déprotéger l'alcool en position *para* du groupement phosphonate pour le rendre actif pour la futur étape de greffage des chaînes PEG8-COOH et PEG8-NH<sub>2</sub>. Cette réaction se fait en présence de  $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4/\text{NaBH}_4$  dans un mélange de THF et de DMF. Le composé **INT** est alors obtenu avec un rendement de 76 %.

## B. La finalisation : ANACOOH

La synthèse de la molécule **ANACOOH** continue par le greffage de la chaîne PEG8-COOH sur le composé **INT** (Figure 48),

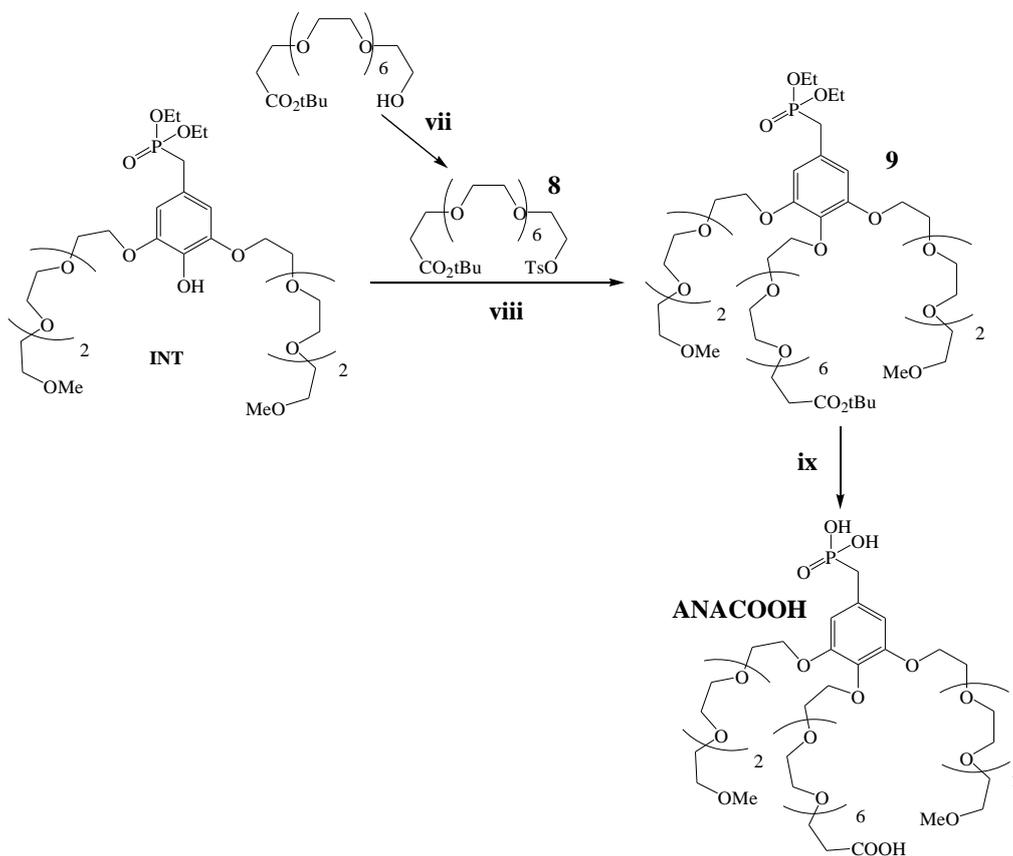


Figure 48 : schéma réactionnel des dernières étapes de la synthèse du dendron **ANACOOH**.

vii) *pTsCl* (1,5 eq.), *NEt*<sub>3</sub> (3,0 eq.), *CH*<sub>2</sub>*Cl*<sub>2</sub>, 0°C → *T*<sub>amb</sub>, 40 h, 77 %;

viii) **8** (1,0 eq.), *K*<sub>2</sub>*CO*<sub>3</sub> (4,0 eq.), *KI* (0,3 eq.), acétone, 60°C, 72h, 90 %;

ix) *TMSBr* (15,0 eq.), *CH*<sub>2</sub>*Cl*<sub>2</sub>, 0°C → *T*<sub>amb</sub>, 95 %.

La première étape de synthèse consiste en l'activation, par le chlorure de tosyloxy, de la fonction alcool de la chaîne PEG8-COO<sup>t</sup>Bu et conduit au produit **8** avec un rendement de 77 %. Une réaction de Williamson permet alors le greffage, avec 70 % de rendement, de la chaîne octaéthylène glycol en position *para* de l'ester phosphonique (produit **9**). Par la suite, il s'agissait d'hydrolyser à la fois l'ester phosphonique et l'ester tertibutyle. Cette double hydrolyse a été possible en utilisant TMSBr en fort excès : le dendron **ANACOOH** est alors obtenu avec un rendement de 95 %.

### C. La finalisation : ANANH2

La synthèse de la molécule **ANANH2** continue par le greffage de la chaîne PEG8-NH2 sur le composé **INT** (Figure 49).

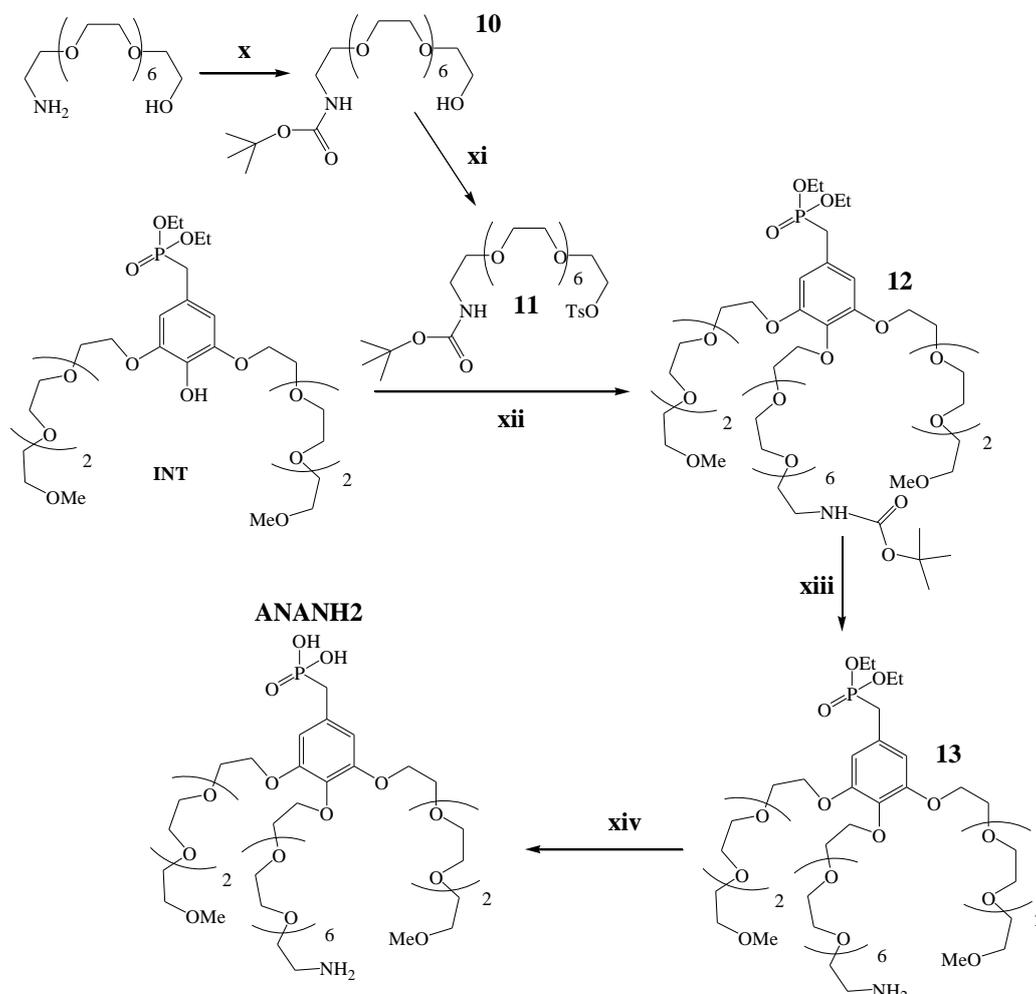


Figure 49 : schéma réactionnel des dernières étapes de la synthèse du dendron **ANANH2**.

- x)  $\text{Boc}_2\text{O}$  (1.0 eq.),  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ,  $0\text{ }^\circ\text{C} \rightarrow T_{\text{amb}}$ , 1 nuit, 95 % ;
- xi)  $p\text{TsCl}$  (1.1 eq.),  $\text{NEt}_3$  (2.3 eq.),  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ,  $0\text{ }^\circ\text{C} \rightarrow T_{\text{amb}}$ , 40 h, 75 % ;
- xii) **II** (1.0 eq.),  $\text{K}_2\text{CO}_3$  (4.0 eq.),  $\text{KI}$  (0.3 eq.), acétone,  $60\text{ }^\circ\text{C}$ , 1 nuit, 70 % ;
- xiii)  $\text{TFA}$  (15.0 eq.),  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ,  $0\text{ }^\circ\text{C} \rightarrow T_{\text{amb}}$ , 1 nuit, 88 % ;
- xiv)  $\text{TMSBr}$  (15.0 eq.),  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ,  $0\text{ }^\circ\text{C} \rightarrow T_{\text{amb}}$ , 1 h, 94 %.

La première étape consiste à protéger l'amine primaire du produit commercial PEG8NH2 avec un groupement labile tertibutyl carbonate. Le produit **10** est alors obtenu avec un rendement de 95 %. Ce dernier est ensuite activé sous forme de tosylate (produit **11**) avec un rendement de 75 %. Après une réaction de Williamson qui permet d'obtenir le produit **12** avec 70 % de rendement, il s'agissait de déprotéger l'amine primaire et d'hydrolyser l'ester phosphonique. La déprotection de l'amine primaire s'effectue avec de l'acide trifluoroacétique dans le  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  et conduit au produit **13** avec un rendement de 88 % sans qu'aucune trace d'hydrolyse du phosphonate d'éthyle n'ait été détectée (même en présence d'un fort excès d'acide trifluoroacétique). Cette hydrolyse est alors effectuée par traitement par le TMSBr dans le  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  suivi d'une méthanolyse et conduit au dendron **ANANH2** avec un rendement de 94 %.

## 2.2 Caractérisations des molécules obtenues

### 2.2.1 RMN du proton

Les spectres RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 300MHz) et  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz) des trois dendrons finaux sont donnés dans les figures suivantes.

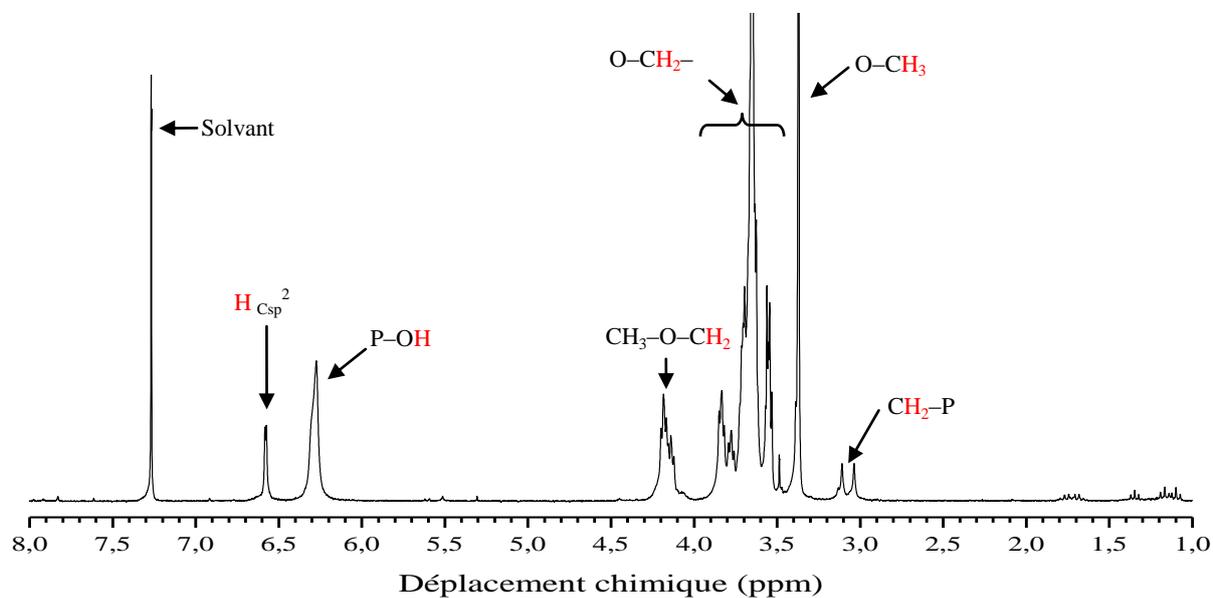


Figure 50 : spectre RMN  $^1\text{H}$  du dendron ANA ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz).

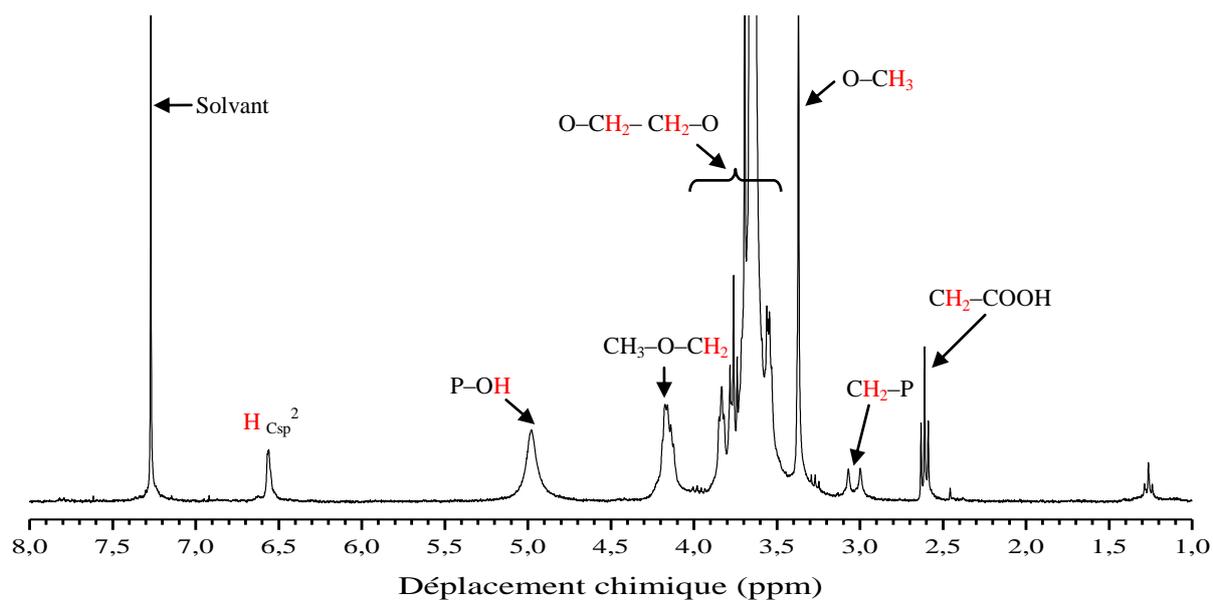


Figure 51 : spectre RMN  $^1\text{H}$  du dendron ANACOOH ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz).

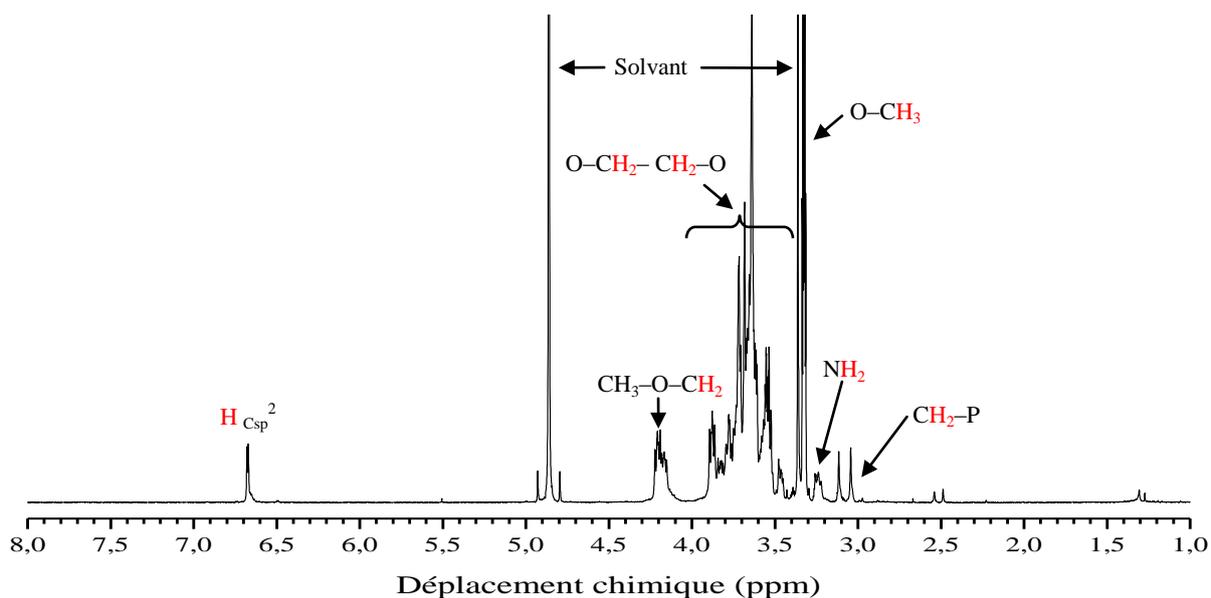


Figure 52 : spectre RMN  $^1\text{H}$  du dendron ANANH2 (MeOD, 300 MHz).

L'indexation et l'intégration des pics permet de retrouver les protons appartenant aux chaînes PEG (singulet à 3,4 ppm, multiplets entre 3,5 et 3,9 ppm, triplets entre 4,1 et 4, 5 ppm), au cœur aromatique (singulet à 6,6 ppm) et confirme dans les trois cas la présence du groupement phosphonate (doublet vers 3,05 ppm correspondant aux protons directement liés à l'oxygène du phosphore). Des pics supplémentaires apparaissent sur les spectres des dendrons ANACOOH et ANANH2. L'indexation et l'intégration de ces pics confirment que ces signaux sont le résultat de la présence du groupement acide carboxylique (vers 2,2 ppm) ou amine respectivement (vers 3,3 ppm).

Quelques pics parasites apparaissent sur les trois spectres (entre 1 et 2 ppm) en raison des difficultés de purification de ces molécules fortement hydrophiles. Mais, l'intensité de ces pics demeure faible et leur présence acceptable pour les étapes suivantes de synthèse des hybrides par greffage sur les nanoparticules.

## 2.2.2 Spectroscopie Infrarouge

Les spectres des molécules ont été acquis, comme pour les nanoparticules, avec un spectromètre à transformateur de Fourier (FTIR, Digilab FTS 3000) en utilisant des pastilles de KBr. Les spectres IR des trois molécules sont donnés dans la Figure 53, la Figure 54, et la Figure 55.

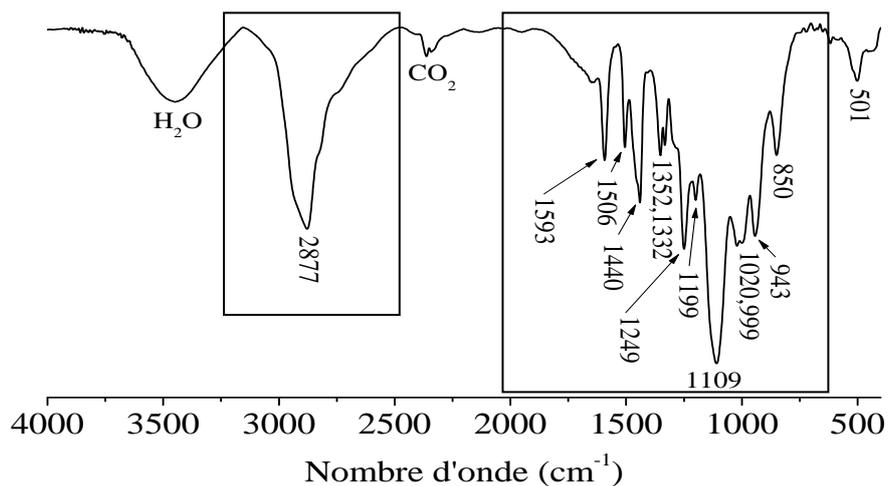


Figure 53 : spectre infrarouge du dendron ANA.

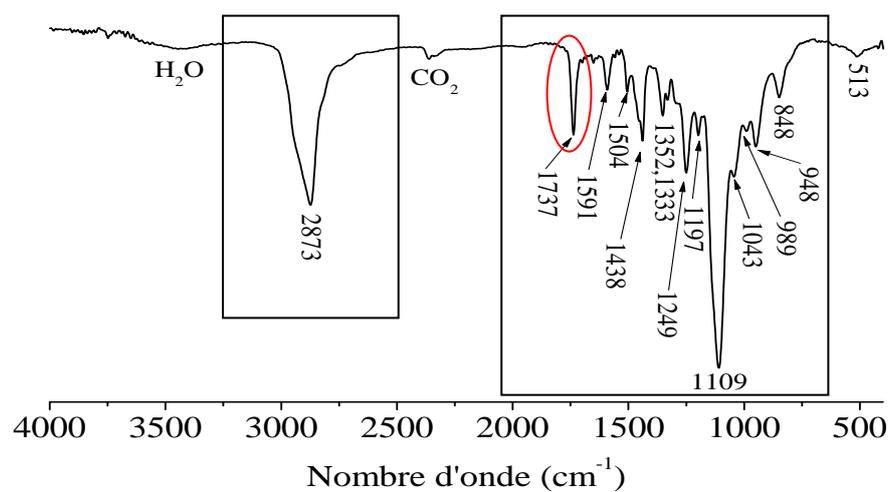


Figure 54 : spectre infrarouge du dendron ANACOOH.

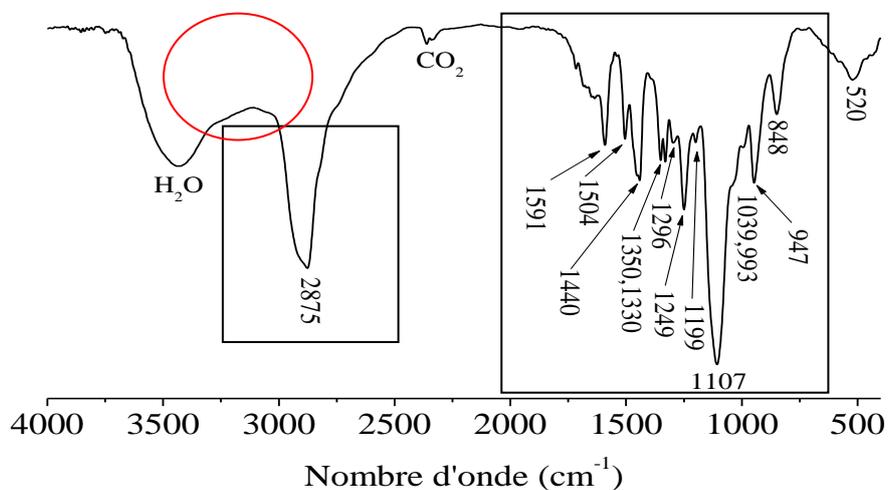


Figure 55 : spectre infrarouge du dendron ANANH2.

L'analyse de ces spectres IR montre que l'allure des spectres reste globalement la même pour les trois dendrons entre 2000 et 500  $\text{cm}^{-1}$  (cadres noirs sur les figures correspondantes). Nous remarquerons cependant des différences directement liées à la présence des groupements acide carboxylique et amine des dendrons **ANACOOH** et **ANANH2** (cercles rouges sur les figures correspondantes). Ces différences se traduisent par la présence d'un pic à 1737  $\text{cm}^{-1}$ , correspondant à la liaison C=O du groupement carboxylate, sur le spectre du dendron **ANACOOH** et d'une large bande centrée sur 3250  $\text{cm}^{-1}$ , lié à la présence de l'amine primaire, sur le spectre du dendron **ANANH2**. L'indexation des principaux pics est donnée dans le tableau suivant.

Tableau 11 : indexation (en  $\text{cm}^{-1}$ ) des principales bandes d'absorption des trois dendrons<sup>302</sup>.

Liaison	ANA	ANACOOH	ANANH2
$\delta(\text{PO}_3)$	501	513	520
C-H (aromatique)	850	848	848
	943	948	947
P-OH et/ou P-O	1020, 999	1043, 989	1039, 993
C-C-C (aromatique)	1109	1109	1107
P=O	1199	1197	1199
aromatique-O-C	1249	1249	1249
C-N			1296
C-O-C	1332	1332	1330
C-H ( $\text{CH}_3$ )	1352	1352	1350
C-H ( $\text{CH}_2$ )	1440	1438	1440
C=C (aromatique)	1506	1504	1504
C=C (aromatique)	1593	1591	1591
C=O (acide carboxylique)		1737	
C-H ( $\text{CH}_2$ et $\text{CH}_3$ )	2877	2873	2875
N-H (amine primaire)			Large bande centrée sur 3250

### Les bandes du groupement phosphonate

Pour démontrer que le greffage des dendrons se fait via l'agent de couplage phosphonate, il était important de localiser avec précision les bandes P-OH et P=O. Plusieurs études ont été menées sur la fonctionnalisation d'oxydes métalliques par des acides phosphoriques ou phosphoniques tel que de l'hématite, de la goethite, de la maghémite, de l'oxyde de titane et d'aluminium. Elles ont montré des bandes similaires dans la zone 1200 - 900  $\text{cm}^{-1}$ . Pour les auteurs de ces études, la présence de bandes d'absorption dans la zone 1000-900  $\text{cm}^{-1}$  serait caractéristique des bandes P-OH, la bande P=O se situant autour 1250 - 1200  $\text{cm}^{-1}$ . Les bandes P-O sont souvent identifiées à 1070 - 1080, 1045, 1024 et 998  $\text{cm}^{-1}$  (dans la zone 1100 - 990  $\text{cm}^{-1}$ )<sup>53 57 92 303 304 305 306 307 308 309 310 311 312 313 314 315 316 317 318 319</sup>. Les résultats montrent qu'il n'est pas aisé d'attribuer les bandes à un complexe donné. En effet, la densité électronique autour du phosphore a une très grande influence sur la position des bandes, une forte liaison P-O conduit à un décalage de la bande correspondante vers des fréquences plus élevées<sup>305</sup>. De ce fait, il est possible donc d'observer de grandes différences de position ou de nombres de bandes suivant le pH et la densité d'adsorption de molécules de phosphate<sup>306 307 310</sup>.

Le tableau suivant donne un aperçu des positions des bandes d'absorption IR données dans la littérature pour des phosphates ou phosphonates adsorbés à la surface d'oxydes métalliques.

Tableau 12 : quelques exemples de positions des bandes P=O, P-O et P-OH.

Conditions expérimentales	Complexe ou molécule	Fréquences (cm <sup>-1</sup> )
Adsorption du phosphate sur la goethite <sup>305</sup>	FeO(OH) <sub>2</sub> PO à pH = 3	1178 (ν (P=O)), 1001 (ν (P-OH)), 876 (ν (P-OH))
Adsorption de l'acide Methylphosphonique sur la goethite <sup>307</sup>	FeO(PO)OH(CH <sub>3</sub> ) <sup>x-1</sup>	1108 (ν (P=O)), 992 (ν (P-OH)), 974 (ν (P-O-Fe))
	(FeO) <sub>2</sub> PO(CH <sub>3</sub> ) <sup>2(x-1)</sup> pH = 3,5 à 8	1095 (ν (P=O)), 1011 (ν (P-O- Fe)), 983 (ν (P-O-Fe))
Adsorption du phosphate et de l'acide phényle phosphonique sur ZrO <sub>2</sub> et TiO <sub>2</sub> <sup>53</sup>	Complexe tri-nucléaire	Disparition des bandes à 940 (ν (P-OH)), 1220 (ν (P=O)) après greffage.
Adsorption d'acide phényle phosphonique sur TiO <sub>2</sub> <sup>311</sup>	Bidentate pontant	1221 (ν (P=O)), 1074 (ν <sub>as</sub> (P-O)), 998 (ν <sub>as</sub> (P-OH)), 936 (ν <sub>s</sub> (P-O)), 924 (ν <sub>s</sub> (P-OH))
Adsorption de phosphate sur la goethite <sup>320</sup>	(FeO) <sub>2</sub> (OH)PO ou (FeO)(OH) <sub>2</sub> PO	1123 (P=O), 1006 (P-O-Fe), 982 (P-O-Fe ou P-OH)
	(FeO) <sub>2</sub> PO <sub>2</sub> ou (FeO)(OH)PO <sub>2</sub>	1044 (P-O), 1096 (P-O)
	FeOPO <sub>3</sub>	1001 (P-O), 1025 (P-O / P-O-Fe)
	H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	890 (P-OH), 1006 (P-OH), 1174 (P=O)
	H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> <sup>-</sup>	874 (P-OH), 940 (P-OH), 1075 (P-O), 1155 (P-O)
	HPO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	847 (P-OH), 989 (P-O), 1077 (P-O) 1006 (P-O)
Complexe d'acide méthylphosphonique de Fe III <sup>316</sup>	CH <sub>3</sub> -PO <sub>3</sub> H <sub>2</sub>	1256 et 1186 (δ(P-OH)), 1150, 115, 1013, 1074, 1040, (ν (PO <sub>3</sub> ))
Complexe d'acide aminométhylphosphonique de Fe III <sup>316</sup>	Mononucléaire	1143 (ν (P=O)), 1074 et 1031 ((ν (P-O-Fe))

La détermination de la localisation des bandes P-OH et P=O sur nos dendrons s'avère donc très délicate car il y a des recouvrements de plusieurs bandes. Afin de confirmer la position de ces bandes sur les spectres IR de nos dendrons à point focal de type acide phosphonique, nous avons mesuré le spectre infrarouge de l'alcool benzylique précurseur **3** auquel nous avons soustrait, après normalisation, le spectre du dendron ANA, ceci afin de faire ressortir les nouvelles bandes d'absorption spécifiques du groupement acide phosphonique (Figure 56).

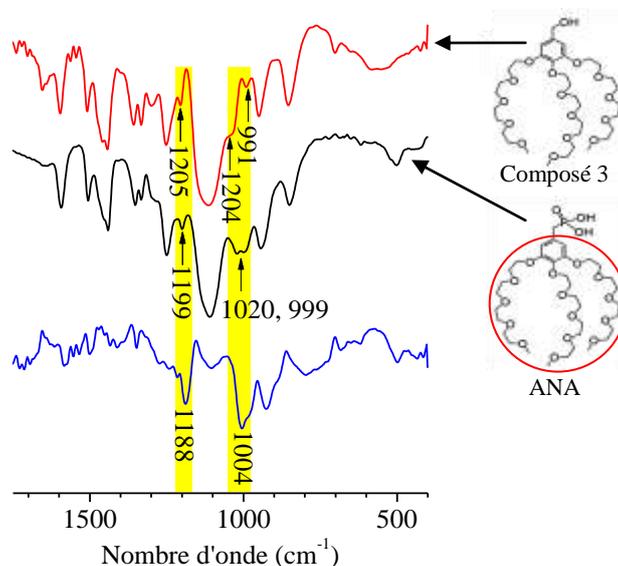


Figure 56 : spectres infrarouges du composé 3 (rouge), du dendron ANA (noir) et de la différence des intensités entre le composé 3 et le dendron ANA (bleu).

L'analyse de ces spectres montre qu'il y a très peu d'évolution des bandes d'absorption entre ces deux composés de part et d'autre des zones surlignées en jaune : en effet, ces bandes appartiennent aux modes de vibration du cœur aromatique et des chaînes PEG (encerclé en rouge) de la structure principale commune aux deux produits. Le spectre issu de la soustraction le confirme par la faible intensité des pics après l'opération de soustraction.

Les plus grands changements s'opèrent dans les zones surlignées en jaune, centrées sur 1000 et 1200  $\text{cm}^{-1}$  où se localisent généralement les bandes P=O et P-OH. En effet, la transformation de la fonction alcool benzylique en acide phosphonique fait évoluer le spectre du composé **3** pour faire apparaître de nouvelles bandes d'absorption dans ces deux zones (1199, 1020 et 999  $\text{cm}^{-1}$ ). Le spectre issu de la soustraction entre **3** et ANA confirme la présence des bandes P=O, P-O et P-OH dans cette zone (nouveaux pics à 1188 et 1004  $\text{cm}^{-1}$ ). La confrontation de ces observations avec les données de la littérature permet donc de conclure que la bande d'absorption du dendron ANA localisées à 1199  $\text{cm}^{-1}$  est celle de la liaison P=O et les bandes localisées à 1020 et 999  $\text{cm}^{-1}$  sont celles des liaisons P-O et P-OH respectivement.

## 2.3 Conclusion

---

Plusieurs grammes du dendron ANA ont été synthétisés dans le but de faire une étude sur l'évolution du taux de greffage en fonction de différents paramètres tels que le solvant du milieu réactionnel, le pH et la concentration en dendron. Les autres dendrons, étant plus délicats à synthétiser (10 à 11 étapes de synthèses), ont été produits en faible quantité. La structure finale des dendrons a été confirmée par RMN du proton, RMN du carbone et spectrométrie de masse (voir annexe 11). Les analyses infrarouges ont permis de valider la présence des groupements acide carboxylique ou amine sur les dendrons ANACOOH et ANANH<sub>2</sub> respectivement. L'étude de l'évolution du spectre infrarouge du dendron ANA a permis de localiser avec précision les bandes P=O et P-OH, données importantes pour la suite des travaux et l'étude sur le greffage des trois dendrons.



**CHAPITRE III :**  
**FONCTIONNALISATION**  
**DES NANOPARTICULES**



# 1 FONCTIONNALISATION DES NANOPARTICULES SYNTHETISEES PAR CO-PRECIPITATION

---

Dans cette partie nous décrirons les études effectuées pour optimiser la stabilité des suspensions. Pour cela nous ferons une brève rétrospective sur les travaux antérieurs aux nôtres qui ont été effectués avec le dendron ANA et qui ont orienté nos premières expériences. Nous présenterons donc la méthode de greffage qui avait été utilisée et les problèmes qu'elle a soulevés. Nous présenterons ensuite les travaux qui ont été réalisés pour remédier à ces problèmes.

## 1.1 Greffage du dendron ANA : travaux antérieurs (NPSco@ANA)

---

Les premières expériences de greffage avec le dendron ANA visaient à étudier l'évolution du nombre de molécules adsorbées (taux de greffage) à la surface des nanoparticules en fonction de la concentration initiale de dendron dans le milieu réactionnel. En effet, malgré la forte affinité de l'agent de couplage phosphonate pour les oxydes de fer, toutes les molécules en suspension ne se greffent pas à la surface des nanoparticules, il y a toujours un équilibre entre molécules greffées et molécules libres. Ainsi, théoriquement, plus la concentration initiale en molécules est grande plus le taux de greffage est susceptible d'être élevé. L'objectif des premiers travaux a donc été de tracer l'isotherme d'adsorption en fonction de la concentration initiale de dendrons dans le milieu réactionnel. Un autre objectif a été de déterminer la quantité minimale de dendrons à ajouter pour recouvrir la surface des nanoparticules. Ces travaux ont été réalisés dans le cadre de la thèse de T.J. Daou<sup>106</sup>.

### *Le protocole (méthode A)*

Ces expériences sont réalisées sur des nanoparticules d'oxyde de fer magnétique de 12 nm de diamètre qui ont été synthétisées par co-précipitation (NPSco) :

- 50 mg des NPSco sont dispersés dans 50 ml d'eau ultrapure désoxygénée ;
- cette solution est passée aux ultrasons (Bioblock Vibra Cell pendant deux minutes et une puissance de 75 %) pendant dix minutes pour favoriser la dispersion des nanoparticules ;
- ensuite, une quantité fixée de molécules organiques est ajoutée rapidement. Le pH de la solution est mesuré. Les flacons sont bien fermés, sous atmosphère inerte, pour éviter toute perte d'eau par évaporation ou tout contact avec l'oxygène de l'air au cours de la fonctionnalisation ;
- les solutions sont mises sous agitation mécanique pendant 24 heures. Le pH de la solution est fixé par la quantité de molécules organiques ajoutées et ne varie quasiment pas au cours de l'étape de fonctionnalisation ;
- Les NPSco sont lavées pour extraire les molécules non greffées. Cette opération est réalisée par séparation des nanoparticules du milieu réactionnel par décantation magnétique (à l'aide d'un aimant) ou par centrifugation.

Les nanoparticules synthétisées par co-précipitation et greffées avec le dendron ANA seront nommées **NPSco@ANA** dans la suite du manuscrit.

## Les résultats

Les taux de greffage ont été évalués, de manière indirecte, par analyse UV-visible de la quantité de molécules restant dans le surnageant. En effet, le dendron ANA possède un pic d'absorbance propre à 270 nm. La droite de calibration de l'absorbance en fonction de la concentration (Figure 68) permet d'estimer la quantité de molécules organiques non greffées présentes dans les surnageants. Des analyses complémentaires par ICP-AES du fer et du phosphore ont aussi été effectuées directement sur les nanoparticules fonctionnalisées et purifiées pour confirmer les résultats obtenus.

La première isotherme d'adsorption des dendrons ANA à la surface des nanoparticules est présentée dans la Figure 57. Dans un premier temps la quantité de dendrons adsorbés en surface augmente quasi-linéairement avec l'augmentation de la concentration d'équilibre de dendrons en solution. Puis au delà d'une certaine concentration, la quantité de dendrons adsorbés décroît pour finalement s'annuler.

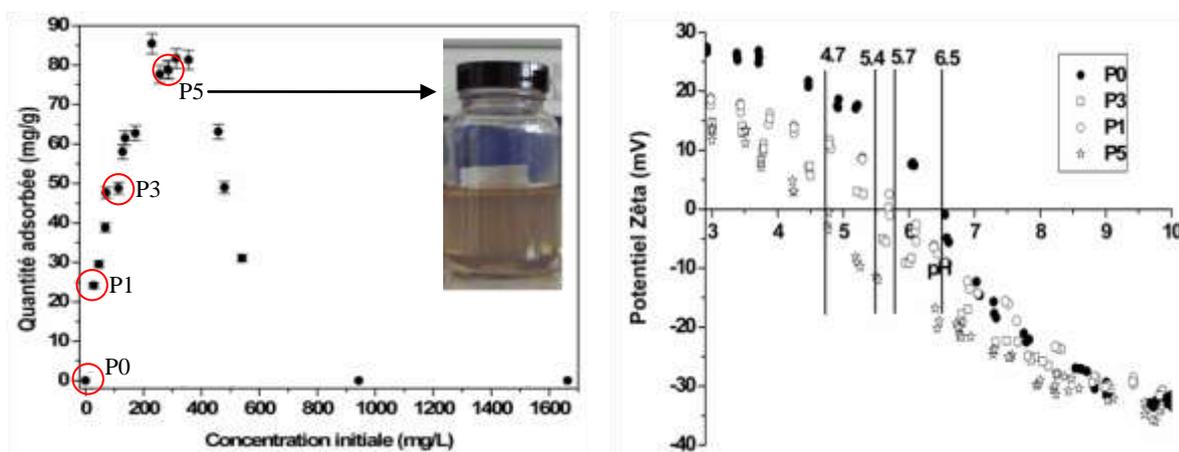


Figure 57 : première isotherme d'adsorption des dendrons ANA sur les NPSco (à gauche), courbe de potentiel zêta en fonction du pH et variation du point iso électrique en fonction du taux de greffage (à droite).

Ainsi, dans cette étude, une limite sur la quantité de dendrons pouvant être introduite, et donc une limite sur le taux de greffage, a été atteinte. L'explication d'un tel résultat est d'ordre électrostatique, car le greffage se réalise via les interactions électrostatiques entre la surface des nanoparticules et les groupements phosphonates<sup>162 182</sup>. Il faut donc favoriser ces interactions et la surface des nanoparticules doit être chargée positivement pour attirer les agents de couplage phosphonate qui sont chargés négativement après la déprotonation de leurs liaisons P–OH.

Cependant, lorsque la concentration du dendron ANA augmente dans le milieu réactionnel, le pH diminue et, passe en dessous de 3, le groupement phosphonate n'est donc plus chargé ( $pK_{a1} \approx 3$  et  $pK_{a2} \approx 5$ ). Les interactions électrostatiques entre les nanoparticules (chargées positivement lorsque  $pH \leq 6,8$ ) et les molécules (chargées négativement lorsque  $pH \geq 3$ ) ne sont plus favorisées et rendent le greffage difficile (Figure 58). Le taux de greffage du dendron ANA a donc atteint un maximum lorsque le milieu réactionnel, concentré à 230 mg/L (P5, Figure 57), a atteint un pH légèrement supérieur à 3. La suspension alors obtenue avec cette concentration présentait la meilleure stabilité bien qu'aucune mesure granulométrique n'ait été effectuée. Au-delà de 280 mg/L, le pH est inférieur 3 et le taux de greffage diminue<sup>183</sup>.

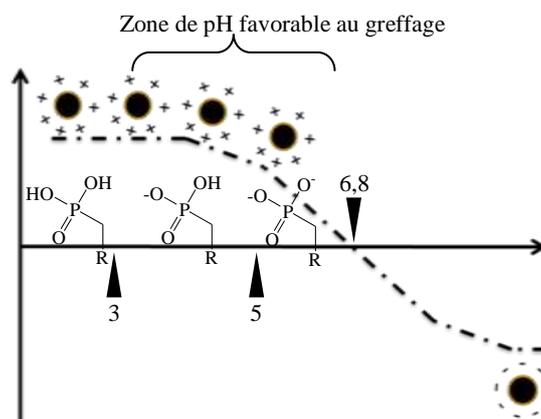


Figure 58 : évolution de la charge de l'agent de couplage phosphonate du dendron ANA et de la charge de surface des nanoparticules en fonction du pH.

L'autre fait marquant de cette étude a été de suivre l'évolution du potentiel zêta en fonction du pH des NPSco fonctionnalisées à différents taux de greffage. Les mesures ont montré un décalage des courbes vers les pH acides avec l'augmentation du taux du greffage. Le point isoélectrique des nanoparticules est passé de 6,5 pour les NPSco nues à une valeur de 4,7 pour le taux de greffage le plus élevé (P5, Figure 57). Ainsi, la stabilité des NPSco a été augmentée au pH des milieux physiologiques par l'augmentation des répulsions électrostatiques.

### **Bilan et problématique**

Le greffage du dendron ANA a amélioré la stabilité des suspensions de NPSco dans des domaines de pH réalistes pour des applications dans le domaine biomédical. Cependant, au seuil d'adsorption, la quantité théorique de dendron qui peut être greffée à la surface d'une nanoparticule de 12 nm, sachant que la surface d'un dendron ANA est de  $0,75 \text{ nm}^2$ , est estimée à  $\approx 1,5$  molécules par  $\text{nm}^2$  de nanoparticules. Dans cette première étude, le taux de greffage maximal atteint était de  $0,67$  molécules/ $\text{nm}^2$  et les suspensions alors obtenues n'étaient pas très concentrées en nanoparticules dendronisées. Le taux de greffage et la qualité des suspensions peuvent donc être améliorés, en augmentant la quantité de molécules introduites dans le milieu réactionnel tout en gardant des interactions électrostatiques favorables. Ceci a fait l'objet de nos premiers travaux.

## **1.2 Greffage du dendron ANA : optimisation du taux de greffage et de la stabilité des suspensions**

Jusqu'à présent, les expériences de greffage avaient été réalisées en milieux aqueux et, pour des problèmes de pH définis par la quantité de dendron, la quantité de dendrons introduite dans le milieu réactionnel était limitée. Sachant que pour greffer un maximum de dendron sur les nanoparticules, il faut en introduire un maximum dans le milieu réactionnel, nos travaux se sont d'abord dirigés vers l'utilisation d'un solvant organique comme milieu réactionnel dans le but d'essayer de contourner ce problème. Nous avons aussi perfectionné le protocole de greffage.

### **1.2.1 Première approche : utilisation d'un solvant organique**

Pour cette étude, le THF et le dichlorométhane ont été retenus car ce sont de bons solvants du dendron ANA et ils ne le dégradent pas. Le protocole de greffage est resté le même (méthode A), la

seule différence est que nous avons dispersé au préalable les nanoparticules sous forme de poudre dans les solvants organiques. Nous avons fait varier la concentration initiale de dendron de 200 mg/L à 500 mg/L par intervalle de 100 mg/L.

A la fin de la réaction de greffage, plusieurs observations qualitatives ont pu être faites sur les suspensions obtenues (Figure 59).



*Figure 59 : photo des suspensions obtenues, 30 minutes après la fin de la réaction de greffage, dans le THF (à gauche) et dans le dichlorométhane (à droite). La concentration initiale de dendrons est de gauche à droite de 200, 300, 400 et 500 mg/L respectivement.*

Les photos des suspensions réalisées par cette méthode montrent qu'une grande partie des nanoparticules sédimente et que la concentration de nanoparticules en suspensions croît avec la quantité de dendrons introduite.

Nous avons également constaté que la concentration de nanoparticules en suspension est plus importante ( suspensions plus opaques) pour les concentrations initiales de dendrons de 300, 400 et 500 mg/L comparativement aux suspensions réalisées dans l'eau avec 230 mg/L (Figure 57). L'introduction d'une plus grande quantité de dendrons dans le milieu réactionnel permettrait donc d'augmenter les taux de greffage et donc le nombre de nanoparticules stables en suspension. La vérification de ce résultat, en analysant les nanoparticules dendronisées et les surnageants des étapes de lavage par centrifugation n'a pas été possible. En effet, les suspensions étant très stables dans ces solvants organiques, il a été impossible de séparer correctement les nanoparticules greffées de la suspension et donc d'obtenir des résultats de taux de greffage non ambigus (Figure 60).



*Figure 60 : photos de quelques surnageants obtenues après des lavages par centrifugation. Ils sont colorés car ils contiennent des nanoparticules dendronisées et ne permettent pas une étude précise du taux de greffage.*

D'autres méthodes de purification comme la dialyse et les colonnes d'exclusion stérique ont été testées sans succès. Ce n'est qu'avec l'arrivée de l'ultrafiltration, que nous présenterons dans la suite du manuscrit (annexe 8), que nous avons pu obtenir une méthode fiable de purification.

La distribution de taille des NPSco@ANA qui n'avaient pas sédimenté a été mesurée par DLS (Figure 61).

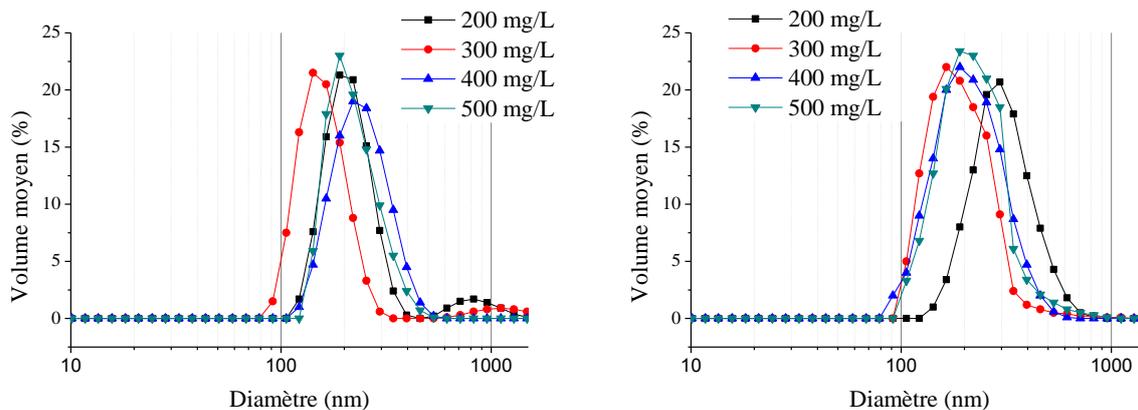


Figure 61 : exemple de distributions de taille obtenues sur des NPSco@ANA en suspension dans le THF (à gauche) et dans le dichlorométhane (à droite).

Ces mesures montrent que la distribution de taille des NPSco@ANA est supérieure à 100 nm quelle que soit la concentration initiale de dendrons. L'augmentation de la concentration n'a pas eu d'influence sur la distribution de taille. Les particules en suspension sont donc ici constituées de nanoparticules agrégées et/ou agglomérées dont la taille et le poids provoquent rapidement leur sédimentation.

L'hypothèse émise alors est que le séchage des nanoparticules, avant leur greffage, à l'aide d'un lyophilisateur, provoque une agrégation quasi irréversible de ces dernières et constitue un mauvais point de départ pour obtenir de bonnes suspensions où les nanoparticules ne sédimentent pas et leur distribution de taille reste inférieure à 100 nm.

### **Bilan**

Ces premiers travaux montrent que l'utilisation d'un solvant organique permet d'introduire de plus grandes quantités de dendrons et d'obtenir des suspensions de nanoparticules avec une bonne stabilité et une bonne concentration. Cependant, les distributions de taille des nano-objets en suspension restent encore très élevées pour les applications biomédicales ciblées. Une autre méthode de greffage, décrite dans les paragraphes suivants, a été développée.

### **1.2.2 Seconde approche : favoriser la dispersion (méthode B)**

Suite aux conclusions des travaux précédents, une nouvelle méthode de greffage (méthode B) a été développée pour améliorer la distribution de taille des NPSco@ANA. Pour cela les NPSco ne doivent pas être agrégées afin de favoriser leur dispersion lors de la réaction de greffage et, théoriquement, obtenir des suspensions de nano-objets ayant une distribution de taille plus fine. Les NPSco étant nues à la fin de leur synthèse, il n'est pas simple d'éviter leur agrégation, mais il est possible de la limiter en évitant de les sécher par lyophilisation et en utilisant beaucoup plus la dispersion par ultrasons.

C'est dans cette optique qu'a été créée la méthode B de greffage :

- 1,5 mL (ce volume correspond à 50 mg de NPSco) sont prélevés du milieu réactionnel de la synthèse par co-précipitation ;
- les nanoparticules contenues dans ce volume sont lavées six fois par décantation magnétiques avec de l'eau ultrapure ( $\geq 5$  mL à chaque lavage) et à pH = 7 pour favoriser leur sédimentation ;

- les derniers lavages sont réalisés avec le solvant qui sera utilisé pour le greffage (le THF et l'eau désoxygénée dans notre cas) et les nanoparticules sont conservées dans un minimum de solvant ;
- ce petit volume de solution de nanoparticules lavées et non séchées, est réajusté avec le solvant de greffage pour atteindre 50 mL. A ce moment de l'expérience, les nanoparticules s'agglomèrent et sédimentent ;
- la dernière étape consiste à introduire la quantité de dendron (étape d'ajout) souhaitée dans le mélange. Les flacons sont bien fermés, sous atmosphère inerte, pour éviter toute perte d'eau par évaporation ou tout contact avec l'oxygène de l'air au cours de la fonctionnalisation. Ces flacons sont ensuite plongés dans un bain à ultrasons maintenu à une température de  $35 \pm 2^\circ\text{C}$  pendant 90 minutes.

### A. Expériences réalisées dans le THF

Seul le THF a été testé avec la méthode B, car contrairement au dichlorométhane, il est miscible dans l'eau. Il peut donc être utilisé lors des étapes de lavage et les NPSco peuvent y être transférées sans être séchées. Plusieurs concentrations initiales de dendrons ont été testées : 200, 400 et 800 mg/L.

La photo de la Figure 62 présente des échantillons réalisés durant cette étude. Elle illustre bien l'amélioration de la qualité des échantillons préparés avec la méthode B par rapport à la méthode précédente : les suspensions sont beaucoup plus stables dans le temps et très peu de nanoparticules sédimentent. Ainsi, la suspension réalisée avec une concentration initiale de 400 mg/L est nettement plus opaque que celle réalisée avec les précédentes méthodes.

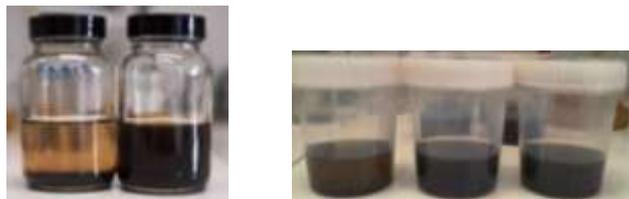


Figure 62 : - à gauche, photo de deux échantillons, 30 minutes après la fin de la réaction de greffage, réalisés avec une concentration initiale de dendrons de 0 mg/L (témoin, à gauche) et 400 mg/L (à droite) ;  
- à droite, photo des échantillons, après 3 jours de repos, obtenus avec une concentration initiale de dendrons de 200, 400 et 800 mg/L de gauche à droite respectivement.

La distribution de taille des NPSco@ANA non sédimentées a été mesurée par DLS (Figure 63).

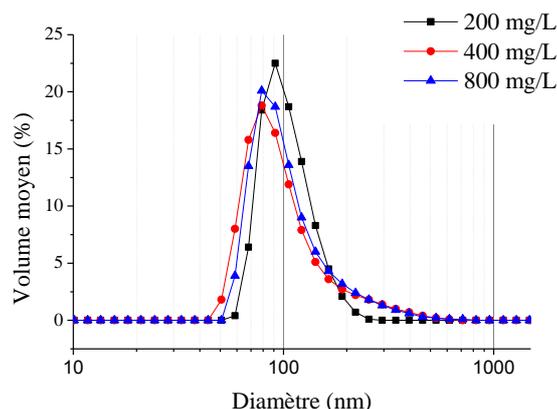


Figure 63 : exemple de distribution en taille des NPSco@ANA obtenues par la méthode B.

Les mesures granulométriques montrent que les suspensions de NPSco@ANA obtenues par la méthode B présentent des diamètres hydrodynamiques moyens plus petits (inférieur à 100nm) et des distributions de taille plus étroites que celles obtenues par la méthode A (supérieur à 100 nm). De plus la taille moyenne semble diminuer quand la concentration initiale de dendrons augmente, mais cela ne peut être affirmé, car comme dans les expériences précédentes, il n'a pas été possible de purifier correctement les suspensions.

Les suspensions de NPSco@ANA réalisées par la méthode B dans le THF sont donc de meilleure qualité. Les taux de greffage n'ont pas pu être évalués, mais l'opacité des suspensions suggère qu'il est beaucoup plus important et a permis de stabiliser plus de particules en suspension.

## **B. Expériences réalisées dans l'eau**

---

En parallèle à l'étude précédente, il était intéressant de réaliser une étude du même type en restant dans l'eau. En effet, l'utilisation d'un solvant organique comme milieu réactionnel a montré des limites lorsqu'il a fallu transférer les nanoparticules dendronisées NPSco@ANA du THF vers l'eau. Le transfert effectué par évaporation du THF puis redispersion dans l'eau a engendré une forte déstabilisation des suspensions. Réétudier le greffage dans les milieux aqueux avec la méthode B a été donc envisagé pour éviter les problèmes de transfert de solvant.

Sachant qu'il faut tenir compte du pH du milieu réactionnel, les concentrations testées ont été de : 200 mg/L dans le but de comparer la méthode B à la méthode A, 300 mg/L et 400 mg/L pour voir si la méthode B pouvait donner de meilleures suspensions malgré les contraintes de pH (les pH des milieux réactionnels devraient descendre en dessous de 3).

En réalisant les expériences, le pH du milieu réactionnel après l'ajout des dendrons ANA a été :

- proche de 4 pour une concentration de 200 mg/L ;
- proche de 3,5 pour une concentration de 300 mg/L ;
- et proche de 3 pour une concentration de 400 mg/L.

Les pH des milieux réactionnels ont été supérieurs à ceux attendus. L'explication vient certainement des lavages des NPSco qui n'ont pas été suffisants pour enlever tous les résidus de base résultant de la réaction de co-précipitation. Cette légère basicité a été suffisante pour garder des pH favorables à la réaction de greffage. Les photos des suspensions obtenues sont présentées dans la Figure 64.



*Figure 64 : - à gauche, photo de deux échantillons, 30 minutes après la fin de la réaction de greffage, obtenus avec une concentration initiale de dendrons de 0 mg/L (témoin, à gauche) et 200 mg/L (à droite) ;*

*- à droite, photo des échantillons, après 3 jours de repos, obtenus avec une concentration initiale de dendrons de 200, 300 et 400 mg/L de gauche à droite respectivement.*

Comme pour les expériences réalisées dans le THF, les suspensions obtenues par la méthode B dans l'eau sont de bonne qualité. Les concentrations des NPSco@ANA en suspensions sont plus élevées et comme dans les travaux antérieurs, nous avons constaté que la qualité de la suspension est moins bonne lorsque le pH du milieu réactionnel est proche de 3. Des mesures granulométriques des suspensions de NPSco@ANA non sédimentées ont été entreprises bien que nous n'ayons pas pu purifier les suspensions (Figure 65).

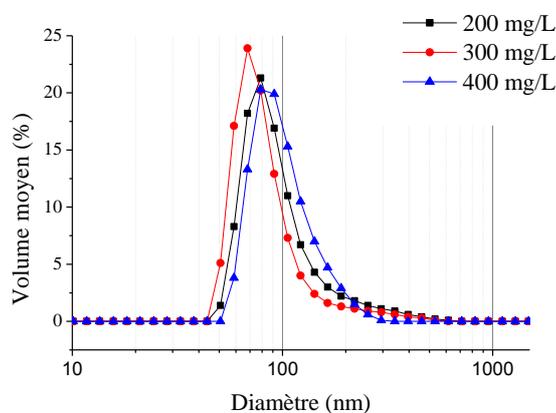


Figure 65 : exemple de distribution en taille des suspensions de NPSco@ANA obtenues par la méthode B dans l'eau, à pH = 7.

Les mesures granulométriques montrent que les NPSco@ANA en suspension ont des distributions de taille larges avec un diamètre moyen inférieur à 100 nm.

### C. Bilan

La fonctionnalisation des nanoparticules par la méthode B permet d'obtenir des suspensions très stables et très concentrées en NPSco@ANA. Favoriser la dispersion des nanoparticules lors de la réaction de greffage a permis de réduire la distribution de taille des nano-objets en suspensions. Le diamètre hydrodynamique moyen devient inférieur à 100 nm. Les taux de greffage semblent eux aussi avoir augmenté mais, faute de preuves liées à des problèmes de purification, cela n'a pas pu être vérifié dans un premier temps.

Les travaux réalisés dans l'eau ont été très prometteurs au vu de la qualité des suspensions obtenues. Cependant, la distribution de taille des nano-objets en suspensions reste encore trop large et doit être réduite en vue des applications ciblées. Des problèmes semblent persister avec le pH des milieux réactionnels qui défavorise le greffage lorsque les concentrations en dendrons deviennent trop élevées.

Pour remédier à ce problème du pH conditionné par la quantité de dendron introduite, nous avons décidé d'ajuster le pH avec une base ou un acide après ajout des dendrons dans le milieu réactionnel de greffage.

### 1.2.3 Troisième approche : greffage dans l'eau en ajustant le pH (méthode B/pHréa)

La mise en suspension en milieu aqueux, par la méthode B, des nanoparticules a été très convaincante dans le sens où, des suspensions plus concentrées en NPSco@ANA ont été obtenues. Cela a été possible grâce à l'introduction de plus grandes quantités de dendrons dans le milieu réactionnel et à la meilleure dispersion des NPSco. Une autre approche a donc été développée, à savoir réajuster le pH (contre l'acidité de la molécule organique par l'ajout d'une base) à une valeur donnée

après l'ajout des dendrons. L'objectif a été alors d'introduire une plus grande quantité de dendrons ANA ( $\geq 400$  mg/L) dans le milieu réactionnel tout en conservant son pH largement supérieur à trois.

Pour ces expériences, nous avons pu disposer d'un appareil d'ultrafiltration pour purifier les échantillons des molécules non greffées. Les filtrats obtenus par cette méthode sont incolores et transparents de toutes nanoparticules, ils ont pu être analysés sans ambiguïté (Figure 69) par spectroscopie UV-visible afin d'évaluer les taux de greffage. Des études approfondies sur l'évolution du taux de greffage en fonction du pH, de la température et de la concentration en dendrons ont pu commencer.

## A. Evolution du taux de greffage en fonction du pH et de la température

---

### *Hypothèse et conditions de greffage*

Nous savons que le greffage du dendron ANA est favorisé par des interactions électrostatiques entre le groupement phosphonate et la surface des nanoparticules. Pour augmenter au maximum ces interactions, il faut augmenter la charge des deux éléments qui dépend du pH du milieu réactionnel (Figure 58, page 90). Le PIE des nanoparticules est d'environ 7 donc plus le pH est inférieur à 7, plus la « charge de surface » (positive) augmente. Le groupement phosphonate du dendron présente deux pKas, un à 3 et un à 5 donc un pH supérieur à 5 serait l'idéal pour favoriser les attractions. Pour optimiser au mieux les conditions de greffage, nous avons choisi d'étudier trois pH :

- le pH = 4 où les nanoparticules sont fortement « chargées » positivement, donc bien dispersées, mais le groupement phosphonate ne portera qu'une « charge négative » ;
- le pH = 5 où les nanoparticules ont une densité de charge positive moyenne, donc moins bien dispersées qu'à pH = 4, mais le groupement phosphonate est plus déprotoné (plus d'une « charge négative ») ;
- enfin, le pH = 6 où les nanoparticules ont une densité de charge positive plutôt faible, donc sont encore moins stables en suspension qu'à pH = 4 ou 5 et le groupement phosphonate serait complètement déprotoné. Cependant, nous savons aussi que le PIE des nanoparticules greffées se déplace vers les pH acides ( $\leq 4$ ). Il faut donc trouver un équilibre.

Théoriquement, les pH = 5 et 6 sont plus attractifs, car le groupement phosphonate étant doublement déprotoné, les taux de greffage devraient augmenter. Cependant, lorsque le pH se rapproche de 6,8, la charge des nanoparticules diminue et peut provoquer la baisse du taux de greffage. Il ne faut pas dépasser le pH  $\geq 6,8$  à partir duquel la charge de surface des nanoparticules n'est plus favorable au greffage. De plus, les nanoparticules greffées auraient un PIE vers 4, pH où elles s'agglomèrent, donc des greffages à pH = 5 et 6 limiteraient la réagglomération des nanoparticules greffées.

Il a été aussi choisi d'augmenter la température du milieu réactionnel pour voir si il était possible d'activer thermiquement la réaction de greffage et donc de la rendre plus efficace.

### *Le protocole (méthode B/pHréa)*

Le protocole est resté proche de celui de la méthode B (voir début du chapitre 6) à la différence que le pH du milieu réactionnel est réajusté avant de lancer le greffage (annexe 9) :

- 1,5 mL (ce volume correspond à 50 mg de NPSco) sont prélevés du milieu réactionnel de la synthèse par co-précipitation ;
- les nanoparticules contenues dans ce volume sont lavées une dizaine de fois par décantation magnétique avec de l'eau ultrapure ( $\geq 5$  mL à chaque lavage) et à  $\text{pH} = 7$  pour favoriser leur sédimentation. Elles sont conservées dans un minimum de solvant ;
- en parallèle de l'étape de lavage des nanoparticules, une quantité choisie de dendrons est dissoute dans 50 ml d'eau désoxygénée ultrapure. Cette solution sera appelée « S-ANA » ;
- le petit volume de nanoparticules lavées et non séchées est réajusté avec les 50 ml de la solution S-ANA. Le mélange obtenu sera appelé « NPSco + S-ANA » ;
- le pH du mélange est mesuré et réajusté (pHréa) à la valeur voulue avec une solution diluée (4 fois) d'hydroxyde de tétraméthylammonium qui est la base utilisée pour la synthèse des NPSco ;
- les flacons sont bien fermés, sous atmosphère inerte, pour éviter toute perte d'eau par évaporation ou tout contact avec l'oxygène de l'air au cours de la fonctionnalisation. Ces flacons sont ensuite plongés dans un bain à ultrasons maintenu à la température souhaitée pendant 90 minutes.

### *Les expériences*

Les expériences ont été réalisées avec une concentration initiale de dendrons ANA fixé à  $600 \pm 5$  mg/L, et à des températures de  $35^\circ\text{C}$  et  $75^\circ\text{C}$ . Elles sont récapitulées dans le tableau suivant :

*Tableau 13 : récapitulatif des expériences faites durant l'étude sur l'évolution du taux de greffage en fonction du pH et de la température du milieu réactionnel.*

Non de l'échantillon	pH étudié	Température $\pm 2^\circ\text{C}$	pH de S-ANA $\pm 0,1$	pH de NPSco + S-ANA $\pm 0,1$	pHréa $\pm 0,1$	pH à la fin de l'expérience $\pm 0,1$	pH après l'ultrafiltration $\pm 0,1$
ANA4.1	$\geq 4$	35	3,1	3,2	4	4	5,8
ANA4.2		75	3	3,1	3,9	4,2	5,9
ANA5.1	$\geq 5$	35	3	3,2	4,9	4,9	5,8
ANA5.2		75	2,9	3,1	5	5,1	5,8
ANA6.1	$\geq 6$	35	2,9	3	6,2	6	5,8
ANA6.2		75	3	3,2	6,1	6,3	5,9

A la fin des réactions de greffage, les échantillons ont été purifiés par ultrafiltration. L'ultrafiltration est un procédé qui consiste à filtrer une solution sous pression à travers une membrane perméable (Figure 66, annexe 8). Elle permet de faire la séparation, dans notre cas, des NPSco@ANA du milieu réactionnel. L'intérêt de cette technique de purification est que les NPSco@ANA ne se retrouvent pas « à sec » et cela limite leur agglomération. La purification par ultrafiltration s'est effectuée de façon discontinue comme suit :

- un volume X des suspensions à purifier est introduit dans l'appareillage ;
- ce volume est doublé avec un volume d'eau ultrapure (nouveau volume 2X) ;
- la pression est appliquée pour filtrer le mélange et le volume 2X de suspensions est réduit de moitié. Nous retrouvons alors le volume X de départ ;
- ce volume X est redoublé à nouveau puis réduit de moitié etc.

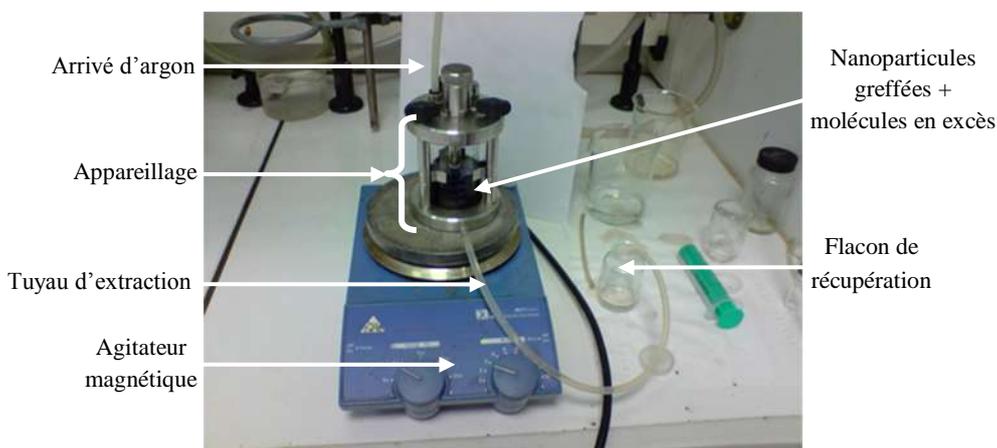


Figure 66 : photo du dispositif de montage de l'appareil d'ultrafiltration.

Les échantillons ont été lavés ainsi par tranche de 25 ml soit huit filtrats récupérés pour chaque échantillon. Les pH des suspensions après les lavages sont similaires (Tableau 13) et proches du pH de l'eau ultrapure avec laquelle sont lavées les nanoparticules (5,6 car elle dissout un peu de dioxyde de carbone). Cette stabilisation des pH au pH de l'eau de lavage conforte l'idée que la purification est complète.

Le réajustement du pH avant la réaction de greffage a fait de la méthode B/pHréa une excellente voie pour obtenir des suspensions de très bonnes qualités et nettement plus concentrées. La purification des suspensions ne les a pas, de plus, déstabilisées (Figure 67). Nous noterons cependant qu'il y a toujours une partie des NPSco@ANA qui sédimente avec le temps, mais les proportions sont très faibles comparativement à celles des précédents travaux. Cette sédimentation semble néanmoins être plus liée à la forte concentration des échantillons qu'à un problème de greffage des dendrons.



Figure 67 : - photo de la suspension ANA5.1, à pH = 7, après les lavages par ultrafiltration (gauche) ;  
 - photo de la suspension ANA5.1 purifiée après lyophilisation de la suspension et redispersion des NPSco@ANA dans de l'eau à pH = 7 (centre) ;  
 - photo de la suspension de NPSco non greffées dans de l'eau à pH = 7 (droite).

La photo de la figure précédente montre que les nanoparticules greffées avec le dendron ANA se redispersent sans difficulté dans une eau au pH proche de point isoélectrique des nanoparticules. Les suspensions restent ainsi stables dans le temps (plusieurs jours).

### **Détermination des taux de greffage**

Les filtrats issus des étapes d'ultrafiltration ont été analysés par spectroscopie UV-visible pour déterminer les taux de greffage. Pour calculer la quantité de molécules contenue dans les filtrats, une droite de calibration de l'absorbance en fonction de la concentration a été tracé (Loi de Beer-Lambert),

le dendron ANA possédant un pic caractéristique d'absorption intense et centré sur 270 nm (Figure 68).

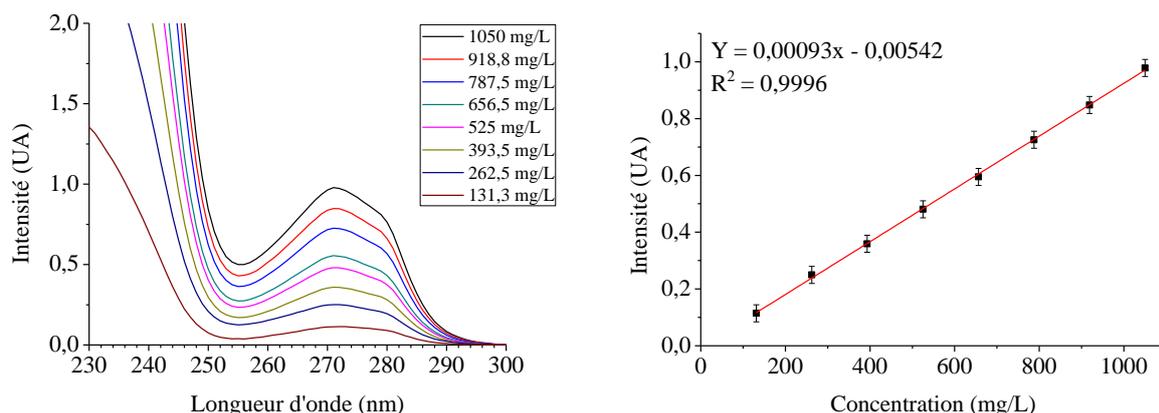


Figure 68 : - à gauche, spectres UV-visible de l'évolution de l'absorbance en fonction de la longueur d'onde pour chaque solution étalon du dendron ANA ;  
- à droite, courbe de calibration de l'absorbance en fonction de la concentration à l'équilibre au maximum d'adsorption à 270 nm.

La courbe de calibration a été tracée à partir de la hauteur du maximum d'absorbance, c'est donc cette même hauteur qui a été mesurée sur les spectres des filtrats (Figure 69)

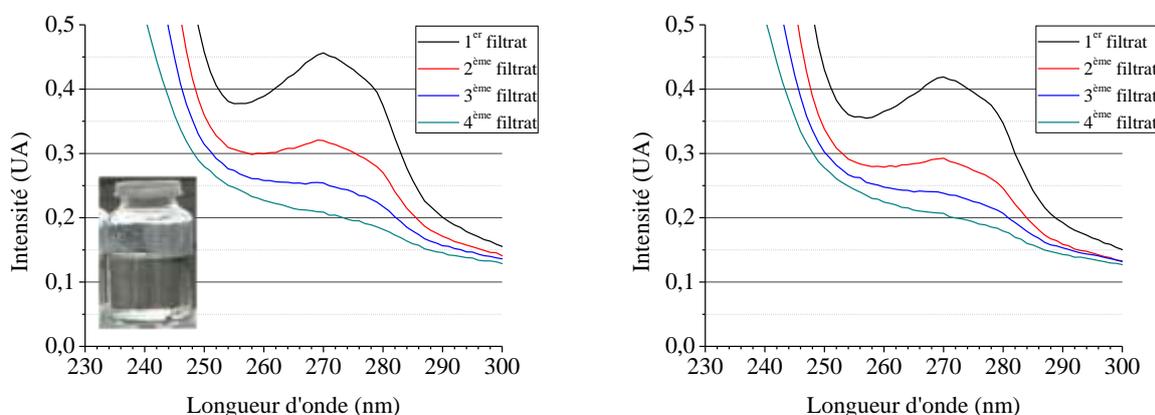


Figure 69 : exemple de spectres UV-visible des filtrats (coin gauche) extraits de la purification de ANA4.1 (à gauche) et ANA5.1 (à droite).

Comme nous pouvons l'observer sur la Figure 69, l'intensité du pic d'absorption, donc la concentration des dendrons ANA, diminue avec le nombre de lavages. Cette figure est une bonne représentation de l'efficacité de la méthode de purification par ultrafiltration. Après 4 lavages, les dendrons non greffés ont pratiquement disparu des filtrats.

Le tableau suivant résume les résultats obtenus par cette méthode de dosage indirecte de la quantité de dendrons greffés. La somme des hauteurs des pics des différents filtrats permet de déterminer la concentration en dendrons non greffés à partir de la courbe de calibration. De cette concentration nous déduisons le nombre de moles puis le nombre de dendrons greffés. Connaissant la masse de nanoparticules introduites et donc la surface associée (la surface est calculée à partir de la surface spécifique mesurée par BET soit  $95 \text{ m}^2/\text{g}$ ), nous en déduisons les taux de greffage donc le nombre de molécules greffées par  $\text{nm}^2$  de nanoparticule :

Tableau 14 : calculs de la concentration de molécules dans les filtrats et des taux de greffage.

Nom de l'échantillon	pHréa ± 0,1	Température ± 2 °C	Somme des intensités des pics des différents filtrats ± 0,001 UA	Concentration de dendrons non greffés ± 7 mg/L	Masse de dendrons greffés ± 0,4 mg	Taux de greffage ± 0,1 Molécule/nm <sup>2</sup>
ANA4.1	4	35	0,551	598	5,15	0,87
ANA4.2	3,9	75	0,566	614	5,41	0,91
ANA5.1	4,9	35	0,547	593	6,24	1,06
ANA5.2	5	75	0,536	582	6,72	1,14
ANA6.1	6,2	35	0,549	595	6,17	1,05
ANA6.2	6,1	75	0,538	584	6,62	1,12

Si l'on compare les différents taux de greffage obtenus en fonction des conditions de greffage, nous constatons que ces taux sont meilleurs lorsque le pH du milieu réactionnel est  $\geq 5$ . Cependant, il y a très peu de différence entre les taux de greffage obtenus à  $\text{pH} \geq 5$  et ceux obtenus à  $\text{pH} \geq 6$ . Ces résultats sont en accord avec l'hypothèse qu'un groupement phosphonate doublement chargé négativement à partir de  $\text{pH} = 5$ , interagirait mieux avec la surface des nanoparticules « chargée » positivement.

La température n'a, par contre, pas eu un grand impact sur les taux de greffage. En effet, nous remarquons qu'à même valeur de pH, ces taux n'augmentent pas significativement.

Enfin, nous constatons que les taux de greffage obtenus dans cette étude sont nettement supérieurs à ceux obtenus dans les travaux antérieurs où le taux de greffage maximum était de 0,67 molécule/nm<sup>2</sup>. Toutefois nous pouvons constater que nous n'atteignons pas le taux de greffage maximal théorique de 1,5 molécules/nm<sup>2</sup>.

#### *Stabilité colloïdale des nanoparticules dendronisées*

Le tableau suivant récapitule les mesures de potentiel zêta sur les NPSCO@ANA après la purification par ultrafiltration.

Tableau 15 : récapitulatif des mesures de potentiel Zeta réalisées après la purification par ultrafiltration.

Non de l'échantillon	pHréa ± 0,1	Température ± 2 °C	pH après l'ultrafiltration ± 0,1	Potentiel Zêta après l'ultrafiltration ± 3 mV
ANA4.1	4	35	5,8	-8,5
ANA4.2	3,9	75	5,9	-10
ANA5.1	4,9	35	5,8	-12
ANA5.2	5	75	5,8	-13
ANA6.1	6,2	35	5,8	-13
ANA6.2	6,1	75	5,9	-13

Les mesures montrent que la valeur du potentiel zêta des NPSCO@ANA est, comme dans les travaux antérieurs (Figure 57 page 89), négatif après le greffage et augmente, en valeur absolue, avec le taux de greffage. Cela illustre le décalage des courbes de potentiel zêta vers les pH acide quand le taux de greffage augmente et donc valide l'efficacité du greffage. Néanmoins, ces valeurs montrent que la stabilité des suspensions n'est pas due à des interactions électrostatiques, car des valeurs absolues supérieures à 30 mV sont nécessaires pour obtenir des suspensions stabilisées électrostatiquement.

Des mesures de distribution de taille ont été réalisées sur les suspensions de NPSco@ANA après leur purification. Elles sont effectuées sur les nanoparticules qui n'ont pas sédimenté et sont présentées dans la Figure 70.

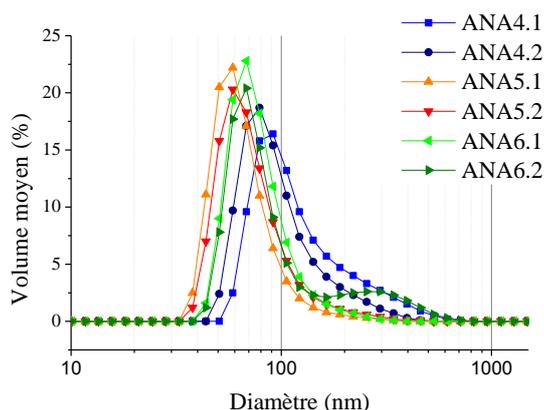


Figure 70 : distributions de taille des NPSco@ANA après l'étape d'ultrafiltration.

Le diamètre hydrodynamique moyen diminue quand le taux de greffage augmente et la température du milieu réactionnel n'a pas eu de réel impact. Nous remarquerons également que les distributions de taille sont plus étroites pour les échantillons qui ont un taux de greffage élevé (ANA5.1, ANA6.1, ANA5.2). Ainsi, les suspensions réalisées à pH = 5 ont une distribution de taille centrée sur 60 nm qui est attrayante pour des applications biomédicales.

Cependant, pour les suspensions réalisées à pH = 6, il semblerait que le pH du milieu réactionnel, bien qu'il ait favorisé le greffage, n'a pas favorisé la dispersion des nanoparticules durant le greffage, le diamètre moyen des particules en suspensions est légèrement supérieur à celui obtenu à pH = 5.

### **Bilan**

Les travaux effectués avec la méthode B/pHréa nous ont permis d'améliorer la stabilité des suspensions de NPSco@ANA. En effet, en ajustant le pH des milieux réactionnels à l'aide d'une base, nous avons pu introduire une plus grande quantité de molécules (6,5 fois plus que dans la méthode A). Des taux de greffage de molécules à la surface des nanoparticules plus élevés ont été obtenus. Ces taux plus élevés ont permis de mieux stabiliser les suspensions et surtout d'obtenir des suspensions concentrées.

Nous avons vu aussi que la température du milieu réactionnel a très peu d'influence sur le taux de greffage. C'est l'augmentation du pH qui a favorisé le greffage, le taux de greffage devient maximum pour un pH proche de 5. Cette « stabilisation du taux de greffage à partir de pH = 5 s'expliquerait par le fait qu'à partir de ce pH, le groupement phosphonate est fortement déprotoné. Les premiers spectres IR et les ATG des NPSco@ANA (annexe 0, explications détaillées dans la suite du manuscrit) confirment le greffage du dendrons ANA à la surface des NPSco.

Nous avons pu constater aussi, d'après les spectres UV-visible et les spectres IR que l'ultrafiltration est une bonne méthode pour la purification des échantillons et qu'elle ne conduit pas à une déstabilisation des suspensions.

La méthode B/pHréa est donc celle que nous avons gardée pour la suite des études sur le greffage et la conception de suspensions exploitables en IRM. Des améliorations restent cependant à faire, notamment sur les distributions de taille des NPSco@ANA et le taux de greffage qui peut être encore optimisé.

## B. Isotherme d'adsorption à pH constant

---

Suite aux travaux précédents sur le pH et la température du milieu réactionnel, plusieurs points se sont dégagés pour améliorer la qualité de nos suspensions :

- le premier est que le pH = 5 est le plus adapté pour réaliser l'étape de greffage car à ce pH, les NPSco et les dendrons présentent la meilleure opposition de « charge » : déprotonation du groupement phosphonate des dendrons, et valeur de potentiel zêta de l'ordre de  $20 \pm 5$  mV, selon les mesures, pour les NPSco, (Figure 57 page 89, Figure 39 page 67) ;
- il n'est pas nécessaire d'augmenter la température du milieu réactionnel ;
- il faut maximiser la stabilité de la suspension à la fin de la réaction de greffage pour limiter la sédimentation. Pour cela, le volume du milieu réactionnel sera augmenté à la fin de la réaction de greffage pour réduire les effets liés à la concentration et le pH ajusté à des valeurs supérieures ou égales à 7. En effet, sachant que le PIE des NPSco@ANA se décale vers les pH acide ( $\leq 4$ ) lorsque le taux de greffage augmente, il est préférable de s'en éloigner à la fin de la réaction de greffage ;

Une nouvelle étude a débuté visant à construire une isotherme d'adsorption du dendron à pH = 5 avec des concentrations initiales de dendrons allant de 200 à 1200 mg/L.

### *Le protocole (méthode B/pHréa op)*

- 1,5 mL issu du produit de la synthèse de la co-précipitation (ce volume correspond à 50 mg de NPSco) sont prélevés ;
- les nanoparticules contenues dans ce volume sont lavées une dizaine de fois par décantation magnétique avec de l'eau ultrapure ( $\geq 5$  mL à chaque lavage) et à pH = 7 pour favoriser leur sédimentation. Elles sont conservées dans un minimum de solvant ;
- en parallèle de l'étape de lavage des nanoparticules, une quantité donnée de dendrons est dissoute dans 50 mL d'eau désoxygénée ultrapure. Cette solution sera appelée « S-ANA » ;
- le petit volume de nanoparticules lavées et non séchées est réajusté avec les 50 mL de la solution S-ANA ;
- le pH du mélange est mesuré et ajusté (pHréa) à pH = 5 avec une solution diluée (4 fois) d'hydroxyde de tétraméthylammonium qui est la base utilisée pour la synthèse des NPSco ;
- les flacons sont bien fermés, sous atmosphère inerte, pour éviter toute perte d'eau par évaporation ou tout contact avec l'oxygène de l'air au cours de la fonctionnalisation. Ces flacons sont ensuite plongés dans un bain à ultrasons et maintenus à la température de  $35 \pm 2^\circ\text{C}$  pendant 90 minutes ;
- à la fin de la réaction, 25 mL d'eau désoxygénée sont ajoutés au milieu réactionnel et le pH est réhaussé à environ 7,4 (pHréa/fin). Le flacon est replongé cinq minutes dans le bain à ultrasons.

Deux séries d'expériences ont été réalisées (notées.1 et .2), les mesures de pH sont récapitulées dans le Tableau 16 :

Tableau 16 : récapitulatif des expériences réalisées à pH = 5.

Non de l'échantillon	Concentration initiale de dendrons $\pm 5$ mg/L	pH de S-ANA $\pm 0,1$	pHréa $\pm 0,1$	pH à la fin de l'expérience $\pm 0,1$	pH après l'ajout de 25 mL d'eau $\pm 0,1$	pHréa/fin $\pm 0,1$	Sédimentation
ANA200.1	220	3,2	5,2	5,1	5,2	7,3	Légère
ANA200.2	220	3,3	5,1	5,3	5,4	7,1	
ANA400.1	400	3,2	5,2	4,9	5	7,6	
ANA400.2	420	3,3	5,1	5,3	5,5	7,1	
ANA600.1	600	3	5,2	5,1	5,2	7,6	
ANA600.2	620	3	5,1	5,2	5,2	7,1	
ANA800.1	820	3	5,2	5	5,1	7,6	
ANA800.2	820	3	5,1	5,2	5,4	7	Très légère
ANA1000.1	1000	2,9	5,2	5,2	5,3	7,6	
ANA1000.2	1020	3	5,1	5	5,2	7,1	
ANA1200.1	1200	2,9	5,2	5,3	5,4	7,2	
ANA1200.2	1220	2,9	5,1	5,1	5,3	7,1	

Avant de purifier les suspensions, elles sont laissées 10 minutes au contact d'un aimant de 0,34T. Cette étape a pour but d'extraire par sédimentation les gros agrégats qui peuvent être présents dans les suspensions de nanoparticules ainsi fonctionnalisées. La quantité de nanoparticules qui sédimente est de l'ordre de  $35 \pm 5$  %. Les surnageants obtenus sont très opaques et sont purifiés par ultrafiltration suivant la même méthode décrite dans l'étude précédente (voir chapitre III, 1.2.3.A) : 5 lavages pour les suspensions réalisées avec des concentrations de 200 et 400 mg/L, 6 pour celles avec 600 et 800 mg/L et 7 pour celles avec 1000 et 1200 mg/L.

Les spectres UV-visibles des filtrats confirment que la purification est complète après cette étape (Figure 71)

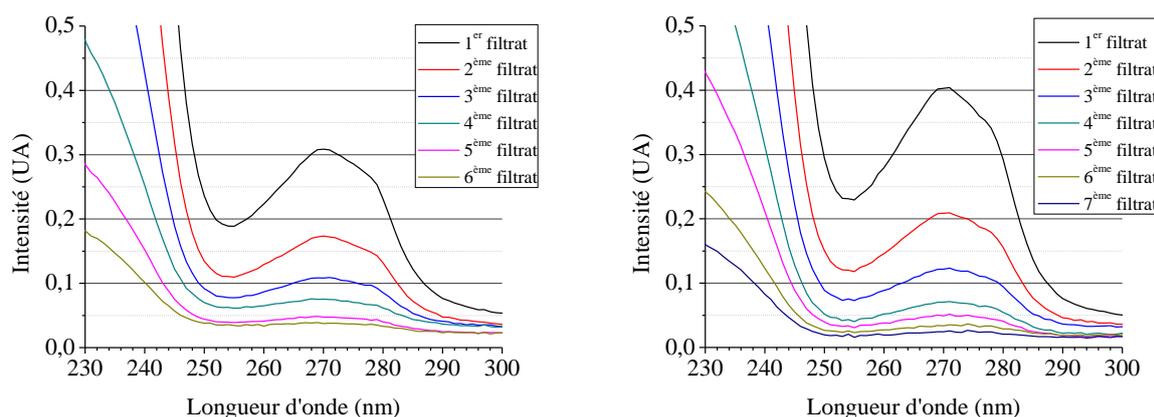


Figure 71 : exemple de spectre UV-visible des filtrats extraits de la purification de ANA800.1 (à gauche) et ANA1200.1 (à droite).

Le pH des suspensions après la purification est mesuré et ajusté à une valeur proche de 7. Les suspensions ainsi obtenues sont très concentrées (opaques) et très stables quelle que soit la concentration initiale en dendrons (Figure 72).

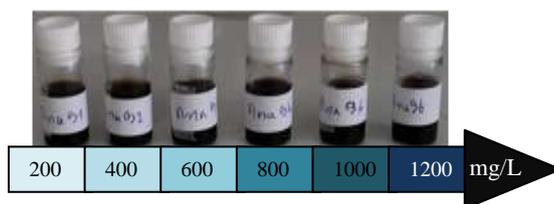


Figure 72 : photo des suspensions après purification.

Ces suspensions ont été placées à nouveau au contact d'un aimant de 0,34 T pour bien vérifier leur stabilité sous champ magnétique (Figure 73).

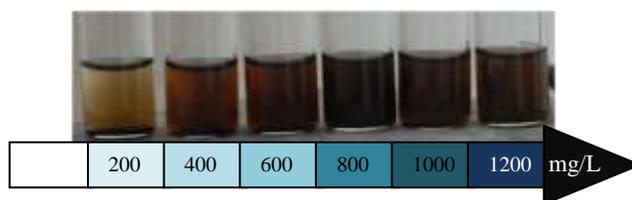


Figure 73 : photo des suspensions après 30 minutes sous un champ magnétique.

Sur la Figure 73 nous pouvons voir que la stabilité des suspensions n'est pas la même après application d'un champ magnétique. Plus la concentration initiale de dendron introduite dans le milieu réactionnel augmente, plus la concentration en nanoparticules des suspensions augmente. Cette observation suggère que le taux de greffage a augmenté et permis d'améliorer la stabilité d'un plus grand nombre nanoparticules à pH = 7.

### Les taux de greffage

Trois techniques d'analyses ont été utilisées pour évaluer les taux de greffage : les dosages UV-visible des filtrats où l'on dose la quantité de dendrons non greffés, les analyses élémentaires où l'on dose les taux de fer et de phosphore et les analyses thermogravimétriques (ATG) où le nombre de molécules greffées est déduit des différences de perte de masse.

#### Les analyses thermogravimétriques sous air :

Comme nous l'avons évoqué, les analyses ATG n'ont finalement pas permis d'avoir une mesure précise des taux de greffage en raison de la compétition entre pertes de masse, dues aux réactions de déshydratation et de décomposition des dendrons greffés, et le gain de masse lié à l'oxydation des  $Fe^{2+}$  des NPSCO (Figure 74).

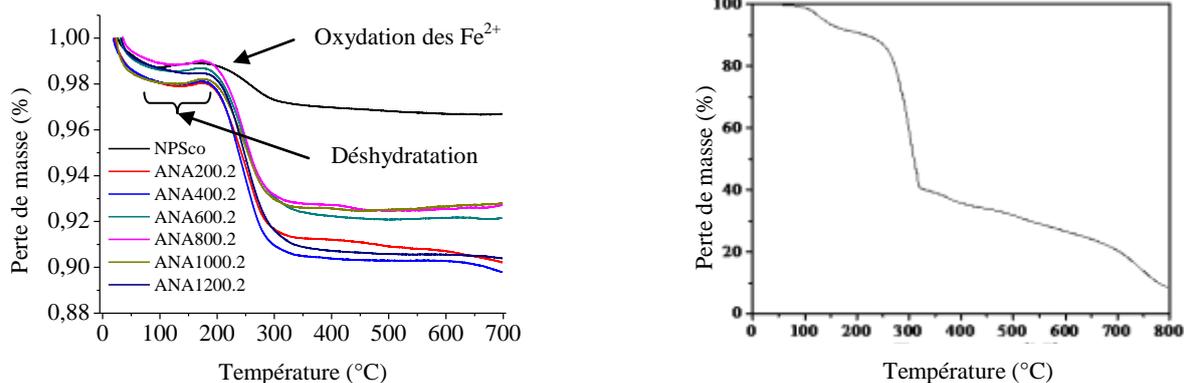


Figure 74 : courbes ATG (sous air, rampe de 5°C/min) des nanoparticules dendronisées avec différents taux de greffage (à gauche) et du dendron ANA (à droite).

La courbe ATG du dendron ANA (Figure 74 droite) montre une première perte de masse qui débute à 100 °C et est attribuée à la déshydratation du dendron. Une deuxième perte de masse plus importante débutant vers 200 °C est attribuée à la décomposition de la partie aromatique et des chaînes PEG du dendron. Enfin, une dernière perte de masse faible est observée ensuite et est attribuée à la décomposition de la partie phosphonate.

Les courbes ATG des nanoparticules dendronisées (après lyophilisation) confirment la présence de dendrons ANA à la surface des nanoparticules. Les pertes de masse sont beaucoup plus importantes sur les NPSco@ANA (entre 5 et 10 %) que sur les NPSco (3 %). L'évolution des courbes montre une perte de masse dès le début de la montée en température, attribuée à l'élimination de l'eau physisorbée, suivie d'une prise de masse légère entre 100 °C et 180 °C attribuée à l'oxydation des Fe<sup>2+</sup> des poudres. Cette légère prise de masse prouve que la réaction de greffage n'a pas provoqué une oxydation totale des nanoparticules.

A partir de 180 °C, la perte de masse observée résulte de la décomposition du dendron ANA. Cette décomposition est d'abord rapide, entre 200 °C et 300 °C (perte de masse brusque), et se finit sur un pallier entre 300 °C et 700 °C (perte de masse légère). Le dendron après greffage se décompose donc dans la même gamme de température que le dendron seul. La seule différence est que nous n'observons pas la décomposition de la partie phosphonate ce qui confirme son greffage à la surface des nanoparticules.

En estimant que la prise de masse due à l'oxydation des NPSco est de l'ordre de  $2 \pm 0,5$  % et en considérant que la perte de masse due à la décomposition des dendrons est comprise entre 200°C et 700°C, nous pouvons estimer de manière semi-quantitative le taux de greffage.

Tableau 17 : estimation des taux de greffage par ATG.

Non de l'échantillon	Perte de masse totale en %	Masse de dendrons en %	Masse de NPSco en %	Surface des NPSco en nm <sup>2</sup>	Nombre de dendrons greffés	Taux de greffage $\pm 0,04$ Molécule/nm <sup>2</sup>
ANA200.1	= 7,6 + 2	9,6	90,4 - 2	$8,75 \times 10^{18}$	$7,98 \times 10^{18}$	0,92
ANA200.2	= 7,6 + 2	9,6	90,4 - 2	$8,75 \times 10^{18}$	$7,98 \times 10^{18}$	0,92
ANA400.1	= 8,4 + 2	10,4	89,6 - 2	$8,67 \times 10^{18}$	$8,65 \times 10^{18}$	0,99
ANA400.2	= 8,2 + 2	10,2	89,8 - 2	$8,69 \times 10^{18}$	$8,48 \times 10^{18}$	0,97
ANA600.1	= 9,1 + 2	11,1	88,9 - 2	$8,60 \times 10^{18}$	$9,23 \times 10^{18}$	1,07
ANA600.2	= 6,4 + 2	8,4	91,6 - 2	$8,87 \times 10^{18}$	$6,99 \times 10^{18}$	0,79
ANA800.1	= 7,6 + 2	9,6	90,4 - 2	$8,75 \times 10^{18}$	$7,98 \times 10^{18}$	0,91
ANA800.2	= 6,4 + 2	8,4	91,6 - 2	$8,87 \times 10^{18}$	$6,98 \times 10^{18}$	0,79
ANA1000.1	= 8,8 + 2	10,8	89,2 - 2	$8,63 \times 10^{18}$	$8,98 \times 10^{18}$	1,04
ANA1000.2	= 6 + 2	8	92 - 2	$8,91 \times 10^{18}$	$6,65 \times 10^{18}$	0,75
ANA1200.1	11,5 + 2	13,5	86,5 - 2	$8,37 \times 10^{18}$	$11,22 \times 10^{18}$	1,34
ANA1200.2	10 + 2	10	90 - 2	$8,71 \times 10^{18}$	$8,32 \times 10^{18}$	0,95

Les taux de greffage ont été calculés en déduisant des calculs la partie phosphonate non décomposée sur les nanoparticules. Ils sont globalement compris entre 0,8 et 1,2 molécules/ nm<sup>2</sup>.

Il est difficile de conclure sur l'évolution du taux de greffage en fonction de la concentration initiale de dendron dans le milieu réactionnel à partir des courbes ATG. En effet, les pertes de masse ne semblent pas augmenter avec la concentration initiale de dendrons comme nous pouvions l'attendre. Elles sont même plus faibles pour la plupart des échantillons greffés avec une forte concentration initiale de dendrons (ANA600.1, 800.1, 800.2, 100.2 et 1200.2). Cela peut être la conséquence d'une compétition entre oxydation et perte de masse avec une préservation des nanoparticules de l'oxydation après greffage ou encore la compétition entre l'oxydation des Fe<sup>2+</sup> et

décomposition du dendron qui s'effectuerait tout au long de l'expérience et la perte de masse qui ne serait pas totalement terminée à 700 °C.

Les dosages UV-visibles (Tableau 18) :

Le tableau suivant donne les résultats des dosages qui ont été effectués avec la même méthode que dans l'étude sur l'évolution du taux de greffage en fonction du pH et de la température (voir chapitre III, 1.2.3.A).

*Tableau 18 : estimation des taux de greffage par dosages de la quantité des dendrons non greffés.*

Non de l'échantillon	Concentration initiale de dendrons $\pm 5$ mg/L	Concentration de dendrons non greffés $\pm 7$ mg/L	Masse de dendrons greffés $\pm 0,4$ mg	Taux de greffage $\pm 0,1$ Molécule/nm <sup>2</sup>
ANA200.1	220	160	2,96	0,51
ANA200.2	220	165	2,71	0,46
ANA400.1	400	320	4,01	0,68
ANA400.2	420	318	5,1	0,86
ANA600.1	600	484	5,79	0,98
ANA600.2	620	481	6,94	1,18
ANA800.1	820	651	8,44	1,43
ANA800.2	820	647	8,63	1,46
ANA1000.1	1000	870	8,43	1,43
ANA1000.2	1020	849	8,53	1,45
ANA1200.1	1200	1086	8,84	1,49
ANA1200.2	1220	1046	8,65	1,47

Les analyses élémentaires (Tableau 19) :

Des analyses élémentaires ont été effectuées sur les suspensions après leur purification afin de doser le taux de fer et de phosphore et évaluer ainsi le taux de greffage. Pour ces analyses, les échantillons sont dissouts avec un acide fort puis injectés dans un plasma à haute température (10000 K).

Les calculs qui résultent de ces analyses sont présentés dans le Tableau 19. A partir de la masse de fer, la masse en oxyde de fer est calculée et la surface des nanoparticules est déduite en considérant la surface spécifique (95 m<sup>2</sup>) mesurée par BET. Le nombre de moles de phosphore, qui est égal à celui des dendrons nous permet de remonter au nombre de dendrons greffés.

*Tableau 19 : estimation des taux de greffage par dosages du fer et du phosphore.*

Non de l'échantillon	Taux de fer $\pm 4$ mg/Kg	Taux de phosphore $\pm 0,1$ mg/Kg	Masse NPSCO $\pm 0,05$ mg	Surface des NPSCO en nm <sup>2</sup>	Nombre de dendrons greffés	Taux de greffage $\pm 0,1$ Molécule/nm <sup>2</sup>
ANA200.1	417	2,5	0,577	$5,48 \times 10^{19}$	$4,86053 \times 10^{19}$	0,89
ANA200.2	448	2,6	0,620	$5,88 \times 10^{19}$	$5,05495 \times 10^{19}$	0,85
ANA400.1	422	2,9	0,584	$5,55 \times 10^{19}$	$5,63821 \times 10^{19}$	1,02
ANA400.2	484	3,62	0,669	$6,36 \times 10^{19}$	$7,03804 \times 10^{19}$	1,10
ANA600.1	459	4	0,635	$6,03 \times 10^{19}$	$7,77685 \times 10^{19}$	1,28
ANA600.2	459	2,98	0,644	$6,13 \times 10^{19}$	$5,79375 \times 10^{19}$	0,95
ANA800.1	466	3,9	0,616	$5,84 \times 10^{19}$	$7,58242 \times 10^{19}$	1,30
ANA800.2	445	3,53	0,654	$6,22 \times 10^{19}$	$6,86307 \times 10^{19}$	1,10
ANA1000.1	427	3,4	0,489	$4,62 \times 10^{19}$	$6,61032 \times 10^{19}$	1,42
ANA1000.2	352	3,2	0,591	$5,61 \times 10^{19}$	$6,22148 \times 10^{19}$	1,11
ANA1200.1	439	4,8	0,573	$5,44 \times 10^{19}$	$9,33221 \times 10^{19}$	1,71
ANA1200.2	414	3,54	0,607	$5,77 \times 10^{19}$	$6,88251 \times 10^{19}$	1,19

## Bilan :

Les taux de greffage estimés par les dosages UV-visible et les analyses élémentaires sont tracés en fonction de la concentration initiale de dendrons dans la Figure 75.

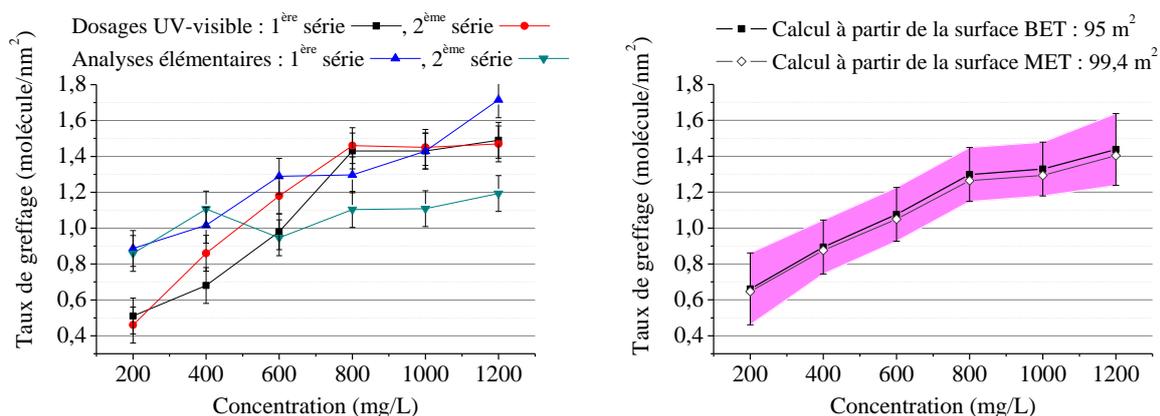


Figure 75 : courbe d'évolution du taux de greffage en fonction de la concentration initiale (à gauche) et courbe résultant de la moyenne de toutes les mesures (à droite).

Les courbes montrent que les taux de greffage augmentent avec la concentration initiale de dendrons pour atteindre un palier à partir de 800 mg/L. Cette évolution est observée sur les deux séries d'expériences avec les dosages par UV-visible. Ces dosages sont très reproductibles : de nombreuses valeurs se recoupent sur ces séries de mesures, le taux de greffage pour l'expérience faite avec 600 mg/L est approximativement le même que celui estimé dans les études précédentes (proche de 1 molécule/nm<sup>2</sup>). Les analyses élémentaires conduisent à la même conclusion, mais présentent des valeurs de taux de greffage plus irrégulières et quelques valeurs aberrantes à basse et haute concentration (200 mg/L série 1 et 2, 1200 mg/L, série 1). Ces différences peuvent provenir de la préparation des échantillons (problème de dilution) pour les analyses élémentaires ou d'une sous estimation de la hauteur des pics pour les dosages UV-visibles.

Pour dégager une évolution relative du taux de greffage en fonction de la concentration initiale de dendrons, une courbe des valeurs moyennes a été tracée. Elle confirme la tendance observée et montre que le taux de recouvrement de la surface des nanoparticules oscille entre 90 % (1,2 molécule/nm<sup>2</sup>) et 100 % (1,4 molécule/nm<sup>2</sup>). Le taux de greffage devient donc maximal pour les NPSco à partir de 800 mg/L en appliquant la méthode B/pHréa 2. Une autre courbe des valeurs moyennes a été tracée à partir des résultats obtenus en considérant, non pas la surface spécifique donnée par la mesure BET, mais celle calculée à partir du diamètre des nanoparticules (11,6 nm) obtenu par MET. La surface spécifique obtenue par ce calcul (99,4 m<sup>2</sup>) n'étant que légèrement plus grande que celle obtenue par BET (95 m<sup>2</sup>), il y a très peu de différence entre les isothermes d'adsorption.

Enfin, l'évolution du taux de greffage dans ces analyses rejoint l'observation faite sur la Figure 73 (page 104) où la concentration en nanoparticules dendronisées des suspensions sous champ magnétique augmente avec la concentration initiale de dendrons pour se stabiliser à partir de 800 mg/L.

## 1.2.4 Caractérisations des nanoparticules fonctionnalisées élaborées pour construire l'isotherme d'adsorption

### A. Stabilité colloïdale des nanoparticules dendronisées

#### Mesures de potentiel zêta en fonction du pH

Des mesures de potentiel zêta ont été effectuées sur chaque suspension avant et après purification à  $\text{pH} = 6,8 \pm 0,1$ , qui est le pH du point isoélectrique des NPSco nues et des mesures de potentiel zêta en fonction du pH ont été réalisées sur la suspension obtenue avec une concentration initiale de 800 mg/L (Figure 76).

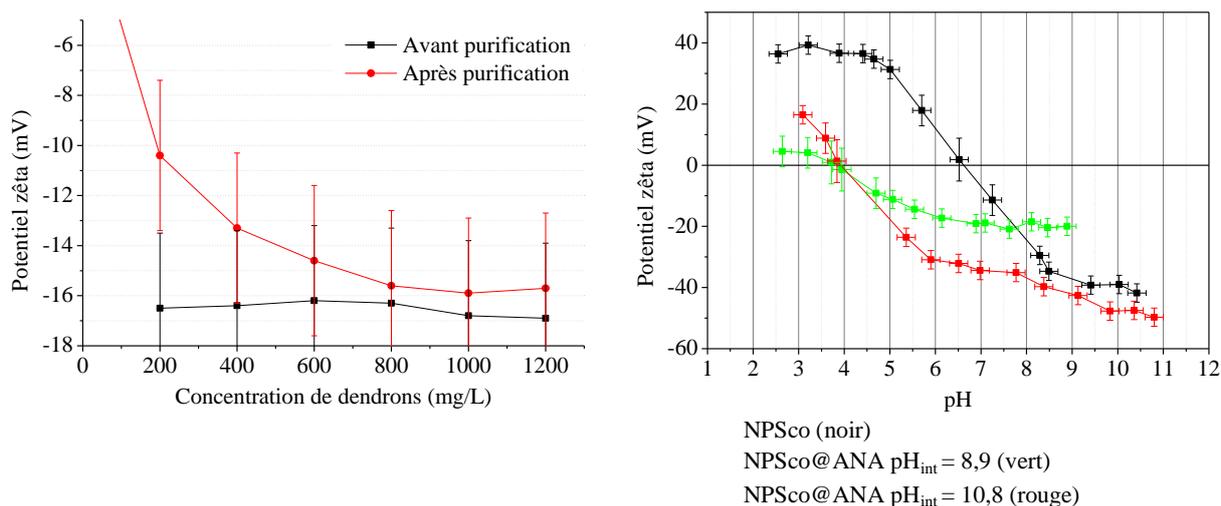


Figure 76 : courbes de potentiel zêta en fonction de la concentration initiale de dendrons ( $\text{pH} = 6,8$ , à gauche) et courbes de potentiel zêta en fonction du pH pour la suspension obtenue avec la concentration initiale de 800 mg/L, à droite).

Les mesures de potentiel zêta à  $\text{pH}$  proche de 6,8 sur les suspensions purifiées montrent que la valeur du potentiel zêta des nanoparticules dendronisées augmente en valeur absolue avec la concentration initiale de dendrons et se stabilise à partir de 800 mg/L. Sachant que le taux de greffage augmente avec la concentration en dendrons jusqu'à la concentration limite de 800 mg/L, la valeur du potentiel zêta augmente donc en valeur absolue avec le taux de greffage et atteint sa valeur maximale ( $-16 \pm 3$  mV) lorsque le taux de greffage est maximal. La charge des nanoparticules dendronisées à  $\text{pH} = 6,8$  est négative, comme dans les expériences précédentes, ce qui prouve que le greffage a fonctionné et permet de stabiliser les nanoparticules par des répulsions électrostatiques et stériques.

Nous voyons que le potentiel zêta avant et après purification n'est pas le même. Avant purification, il est constant ( $-16,5 \pm 3$  mV) pour toutes les suspensions tandis qu'après il évolue. Cette évolution, qui est très marquée pour les faibles concentrations initiales, suggère que de nombreux dendrons restent physisorbés autour des nanoparticules sans être greffés, ils influencent alors la densité de charge des nanoparticules dendronisées. Les étapes de lavage permettent d'extraire ces dendrons pour qu'il ne reste plus que ceux greffés, ceci provoque la diminution de la charge. A partir de 800 mg/L, les couches de dendrons physisorbés n'influencent plus la charge des nanoparticules, car les taux de greffage sont maximums et les lavages ne changent quasiment pas la charge des nanoparticules.

Sur la Figure 76 à droite sont données les courbes de potentiel zêta en fonction du pH des suspensions de nanoparticules avant et après fonctionnalisation par le dendron. Ces mesures ont été effectuées en continu en utilisant le titrateur de l'appareil de mesure de potentiel zêta. Ces courbes montrent un décalage de la courbe de potentiel zêta vers les pH acides après l'étape de fonctionnalisation. Le point isoélectrique des nanoparticules totalement greffées se retrouvent ainsi à  $\text{pH} = 4 \pm 0,2$  au lieu d'un pH proche de celui des milieux physiologiques. Cette valeur est inférieure à celle obtenue dans la méthode A (Figure 57 page 89).

Nous noterons que la valeur du pH de départ ( $\text{pH}_{\text{int}}$ , Figure 76, droite) lors des mesures en continu influence grandement la mesure du potentiel zêta de nanoparticules greffées. C'est un problème de cinétique de la mise à l'équilibre des charges de surface qui n'a pas le temps de se faire lors des mesures. Ainsi, en démarrant à  $\text{pH} = 10,9$ , la charge des nanoparticules dendronisées à  $\text{pH} = 7$  est de l'ordre de  $-30 \pm 3$  mV alors qu'elle est de l'ordre de  $-17 \pm 3$  mV lorsque le pH de départ est égal à 8,9. Cette différence ne change pas cependant la position du PIE. Il est donc préférable de, soit laisser la cinétique de mise à l'équilibre des charges se faire, mais la mesure devient longue (une journée), soit de ne pas démarrer à des  $\text{pH} \geq 9$  pour obtenir des valeurs de charge proches de la réalité.

### Mesures granulométriques

Des mesures de distribution de taille des particules ont été effectuées sur les suspensions de NPSco@ANA après leur purification et l'élimination des gros agrégats sous champ magnétique (Figure 77).

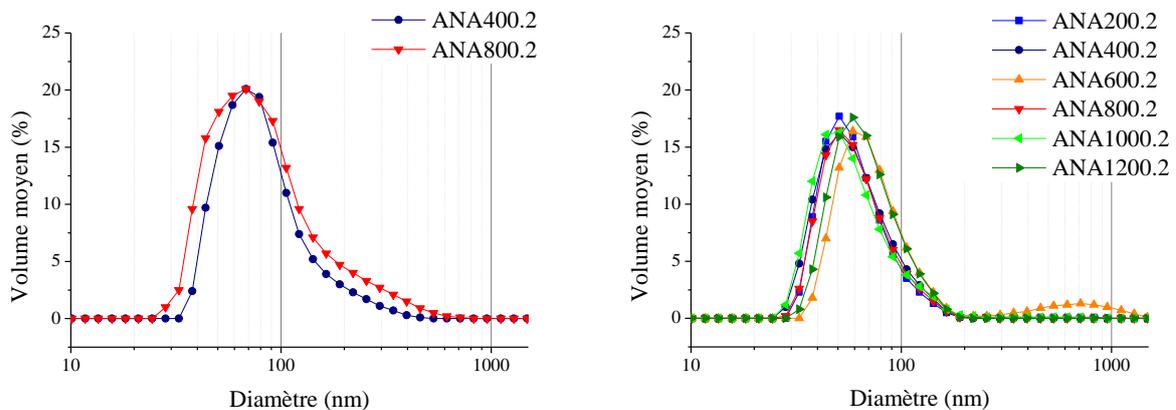


Figure 77 : exemple de distributions de taille des suspensions de NPSco@ANA avant élimination des gros agrégats (à gauche) et distributions de taille des NPSco@ANA après l'élimination des gros agrégats sur un aimant(à droite).

Les mesures granulométriques montrent que les nanoparticules dendronisées en suspension ont globalement des distributions monomodales avec un diamètre hydrodynamique moyen centré entre 50 et 60 nm. Le taux de greffage dans cette étude n'a donc pas un impact réel sur les distributions de taille.

Nous remarquons cependant que ces distributions sont plus étroites et le diamètre moyen plus petit que ceux obtenus dans les précédentes études. Le protocole utilisé ainsi que la séparation des gros agrégats ont donc permis d'améliorer ces distributions qui présentent un diamètre moyen inférieur de 20 nm.

## B. Caractérisation de surface des nanoparticules dendronisées

---

### *MET*

Les micrographies MET des nanoparticules présentant le meilleur taux de recouvrement (800 mg/L de dendrons) ont été réalisées après dépôt des nanoparticules sur des grilles dont les membranes sont percées de trous microscopiques. La présence de ces trous permet de mieux discerner la présence de matière organique autour des nano-objets (Figure 78).

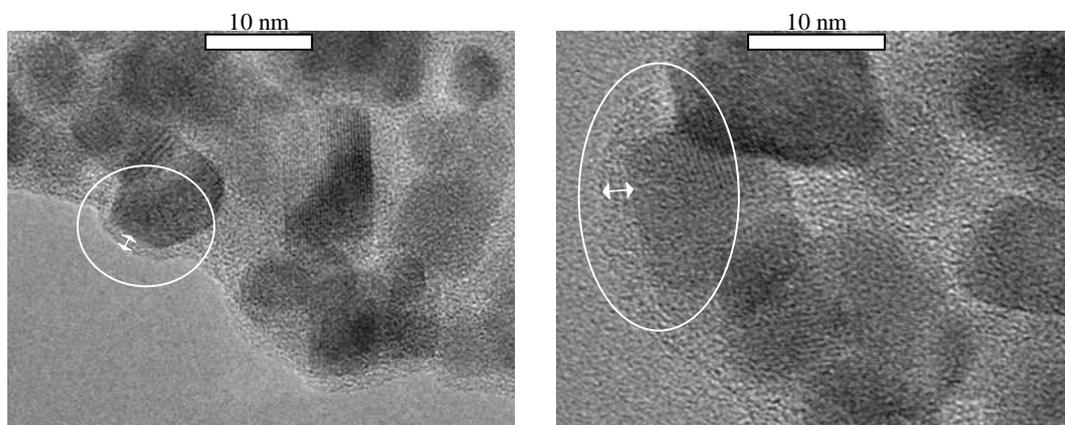


Figure 78 : micrographies MET des NPSco@ANA (échantillon réalisé avec 800 mg/L de dendrons).

Les micrographies des nanoparticules dendronisées montrent la présence d'une couche de très faible densité électronique autour des nanoparticules. L'absence de membrane sur la photo de gauche (la limite de la membrane se distingue sous la nanoparticule dans la zone encerclée en blanc) nous permet de conclure qu'il s'agit d'une couche organique d'une épaisseur de 2-3 nm. Sur la photo de droite, cette couche se distingue par-dessus la membrane des grilles.

Nous remarquons également que les nanoparticules sont relativement agglomérées malgré la présence de cette couche organique. Cette observation rejoint celle déduite des mesures de distribution de taille qui révèlent que les nano-objets en suspension sont composés d'agglomérats de nanoparticules. Les nanoparticules sont cependant toujours bien cristallisées car leurs plans atomiques sont toujours visibles.

### *Spectroscopie infrarouge*

Les spectres IR de toutes les poudres de NPSco@ANA ont été acquis sur des poudres dispersées dans une matrice de KBr (Figure 79).

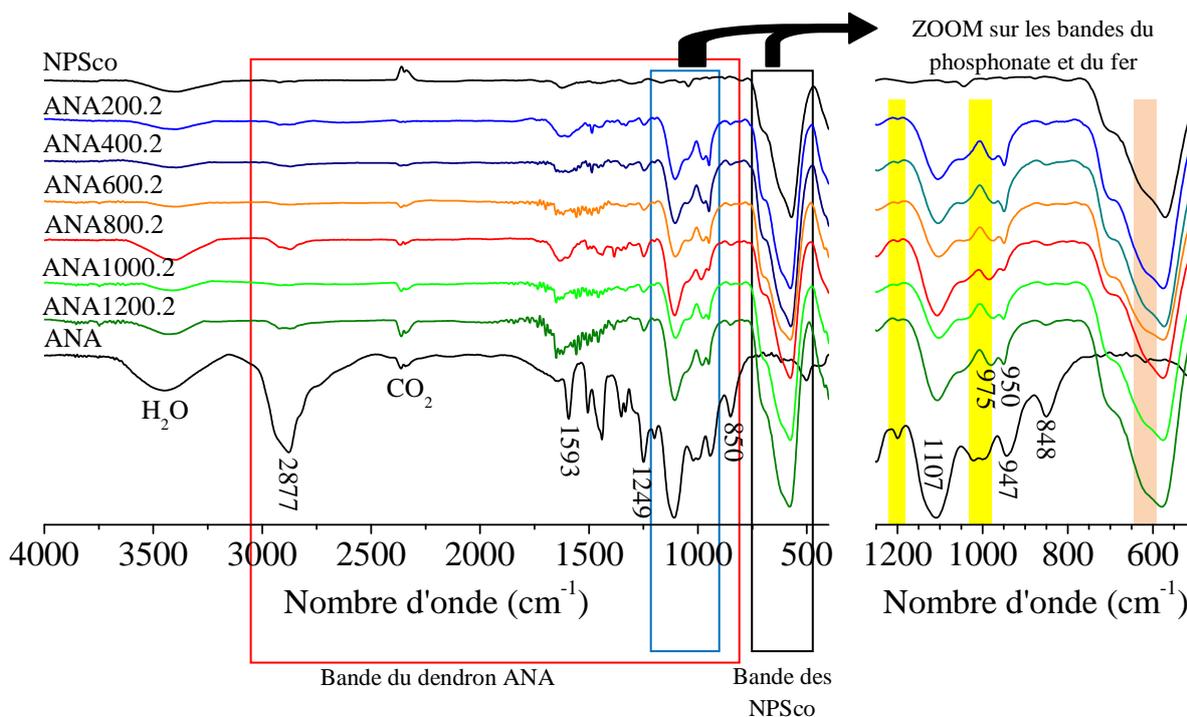


Figure 79 : spectres infrarouges des NPSco@ANA en fonction de la concentration initiale de dendrons.

Les spectres IR des nanoparticules dendronisées présentent dans la zone 850 - 400  $\text{cm}^{-1}$  les bandes caractéristiques des liaisons Fe–O des oxydes de fer (encadré en noir) et des bandes supplémentaires appartenant au dendron ANA (encadré en rouge). Ainsi, des bandes appartenant aux liaisons H–C–H (2877  $\text{cm}^{-1}$ ) des chaînes PEG apparaissent faiblement. Les autres bandes du dendron, plus intenses et encadrées en bleu, sont attribuées aux vibrations du cœur aromatique et du groupement phosphonate.

En zoomant sur ces bandes nous pouvons voir que les bandes appartenant à l'oxyde de fer (entre 750 et 500  $\text{cm}^{-1}$ ) n'ont pas beaucoup évolué. L'allure de ces bandes montre que les nanoparticules ont toujours une structure de magnétite sous-stœchiométrique. Cependant, l'épaulement surligné en orange (entre 650 et 600  $\text{cm}^{-1}$ ), qui marque la présence de la maghémite (voir chapitre I, 1.1.1), est plus prononcé sur les nanoparticules dendronisées ce qui suggère qu'elles se sont légèrement oxydées lors de la réaction du greffage.

Au niveau des bandes caractéristiques du dendron après greffage, nous retrouvons celles appartenant aux cœurs aromatiques (1107 et 848  $\text{cm}^{-1}$ ) et nous voyons disparaître celles appartenant aux liaisons P–OH et P=O du groupement phosphonate (surlignées en jaune). Effectivement, à 1000  $\text{cm}^{-1}$ , un « creux » se forme à la place des deux bandes caractéristiques des liaisons P–OH et P=O et il indique une modification de ces liaisons. Cette modification est souvent liée à un décalage des bandes vers les faibles énergies dû à la formation de la liaison P–O–Fe, car la densité électronique se répartit sur l'ensemble de la liaison (transfert d'électron vers le fer) et diminue sa force<sup>321 322</sup>. Généralement dans la littérature les bandes d'adsorption des liaisons P–O–Fe sont identifiées à des longueurs d'onde inférieures à 1011  $\text{cm}^{-1}$ . La nouvelle bande située à 975  $\text{cm}^{-1}$  doit donc inclure la contribution des liaisons P–O–Fe ou voire être un mode de cette liaison. De plus, l'intensité de cette bande augmente quand le taux de greffage augmente (Tableau 20).

Tableau 20 : rapport de hauteur de la bande à 975  $\text{cm}^{-1}$  sur celle à 950  $\text{cm}^{-1}$ .

Non de l'échantillon	ANA200.2	ANA400.2	ANA600.2	ANA800.2	ANA1000.2	ANA1200.2
Rapport ( $\pm 0,03$ UA)	0,87	0,84	0,94	1,3	0,97	1,02

Vers 1200  $\text{cm}^{-1}$ , la bande appartenant à la double liaison P=O semble disparaître mais, cette bande n'étant pas très intense sur le spectre du dendron, cela peut être une simple diminution d'intensité lié à la quantité de molécule greffée. En effet, nous voyons comparativement que la bande du dendron localisé à 848  $\text{cm}^{-1}$ , qui est plus intense que celle de la liaison P=O, disparaît elle aussi. Si la liaison P=O intervenait dans la formation d'une liaison avec le fer, cela se traduirait par un décalage de sa bande vers les basses énergies. La bande de la nouvelle liaison formée avec le fer serait donc masquée dans celle du cœur aromatique à 1107  $\text{cm}^{-1}$ .

Nous ne pouvons donc pas conclure sur l'implication de la liaison P=O dans la formation du complexe de surface avec l'oxyde de fer. Cependant, la disparition des bandes attribuées aux liaisons P-OH et P-O et le décalage de leur intensité vers 975  $\text{cm}^{-1}$  suggèrent que le complexe de surface ne comporte plus de liaisons P-OH. Le complexe de surface phosphonate serait donc au moins de type bi-nucléaire.

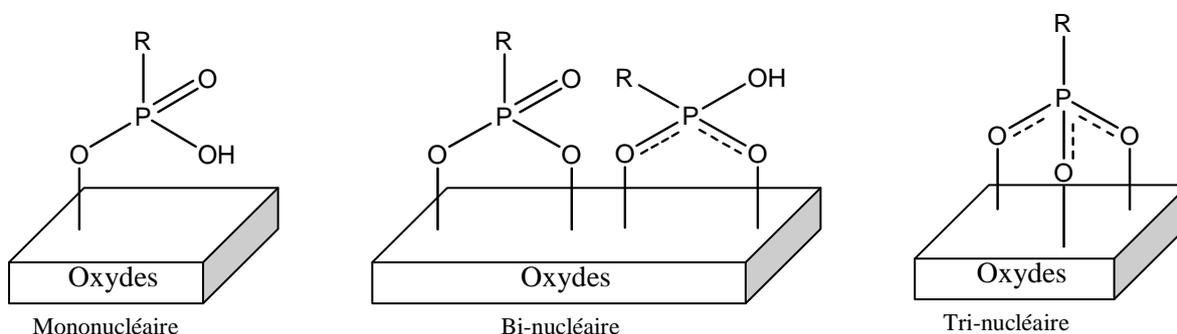


Figure 80 : modes d'interaction des phosphates ou phosphonates avec la surface des oxydes<sup>323</sup>.

### Photoémission X (XPS)

Les NPSco, les NPSco@ANA avec le taux de greffage maximum et le dendron ANA ont été analysés par XPS avec la collaboration d'Hervé Martinez (Professeur – Université de Pau et des Pays de l'Adour) de l'Institut Pluridisciplinaire de Recherche sur l'Environnement et les Matériaux (IPREM - CNRS UMR 5254) localisé à Pau. Les NPSco et les NPSco@ANA étant des poudres, l'analyse XPS s'est effectuée sous vide à température ambiante, avec des conditions d'émission des rayons X de 12 mA, 12 kV et avec neutralisation des charges (3,2 V). Le dendron ANA se présentant sous forme de gel, l'analyse XPS a dû être menée à froid. L'échantillon a ainsi été congelé sur le plot porte-échantillon dans l'azote liquide, puis transféré dans l'appareil XPS, où la chambre d'analyse était régulée à -150°C par un flux d'azote gaz, préalablement refroidi dans de l'azote liquide. Des conditions d'émission des rayons X plus douces (10 mA et 10 kV) ont été choisies afin de ne pas élever la température de l'échantillon, et l'analyse a été effectuée avec neutralisation des charges (3,2 V).

Les principaux spectres et les résultats dans leur ensemble sont présentés ci-après et résumés dans le Tableau 21. Les résultats obtenus sont en concordance avec la plupart des travaux réalisés sur la phosphatation du fer<sup>324 325 326 327 328</sup>. Notons que pour cette étude XPS, le pic de cœur C1s situé à 285

eV (liaisons C–C et C–H) sert de référence pour les trois échantillons analysés. Cette composante est majoritaire pour le dendron ANA, pour les NPSco, et les NPSco@ANA. Néanmoins, deux composantes de faible intensité pour les nanoparticules et les nanoparticules dendronisées apparaissent à plus hautes énergies de liaison et sont caractéristiques d’environnements de type C–O (286,5 eV) et CO<sub>3</sub> (290 eV).

L’analyse du pic de cœur Fe2p 3/2 - 1/2 nécessite au préalable l’étude de composés de références. La Figure 81 présente les spectres du fer métal (analysé après un bombardement aux ions argon sous ultraviolet afin de débarrasser la surface des espèces oxydées), de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> (présence des deux degrés d’oxydation Fe<sup>2+</sup> et Fe<sup>3+</sup>) et de Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (Fe<sup>3+</sup>). Les pics principaux des deux degrés d’oxydation +3 et +2 sont proches au niveau de leur énergie de liaison, la différenciation se faisant essentiellement au niveau de l’écart entre la composante 2p<sub>3/2</sub> et la présence d’un pic satellite comme illustré dans la Figure 81. Nous remarquons que ce pic satellite est bien individualisé lorsque le fer se présente uniquement dans son degré d’oxydation +3 et qu’il apparaît moins nettement lorsque qu’on est en présence simultanée de Fe<sup>2+</sup> et Fe<sup>3+</sup>. Pour la magnétite pure, la littérature reporte l’absence de pic satellite individualisé<sup>329</sup>, en accord avec nos analyses (Figure 81). Le pic satellite du Fe<sup>2+</sup> est localisé au pied du pic principal 2p<sub>3/2</sub> ce qui a tendance à élargir ce pic et conforter sa dissymétrie vers les hautes énergies de liaison. Ces résultats sont en parfait accord avec les travaux de la littérature<sup>330</sup>.

Ainsi, le caractère relativement complexe des pics de cœur Fe2p nous a conduit pour la suite de ce travail à ne pas reporter de dessommation, opération qui peut conduire à des quantifications hasardeuses vis-à-vis des rapports Fe<sup>2+</sup>/Fe<sup>3+</sup>. De plus, le choix d’une ligne de base de même type pour tous les échantillons est nécessaire pour obtenir une quantification comparative. Le choix de cette ligne de base dépend en partie des caractéristiques intrinsèques des composés (densité, propriétés électroniques....) qui déterminent la structuration du fond continu. Ce choix est donc délicat compte tenu des différences observées entre composés de référence et les nanoparticules. Une étude plus approfondie est en cours avec différents échantillons de référence de phosphate de fer afin d’obtenir une véritable quantification de chaque degré d’oxydation.

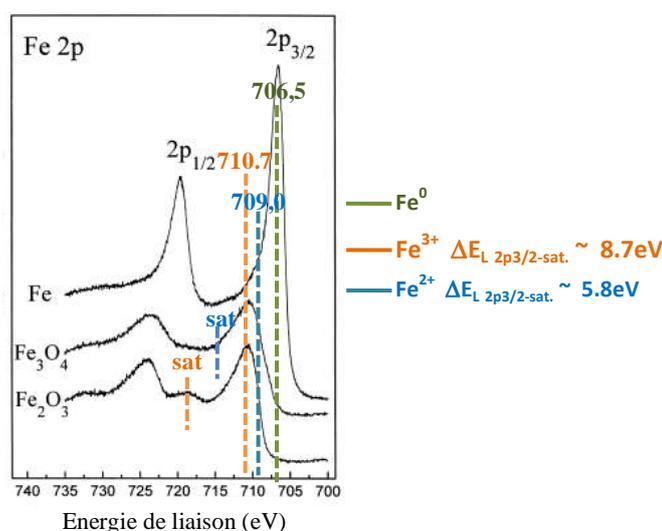


Figure 81 : spectres XPS des pics de cœur Fe2p pour trois composés de références (FeO, Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>).

Les pics de cœur Fe2p pour les NPSco et les NPSco@ANA sont présentés sur la Figure 82 et sont caractéristiques de la présence simultanée des deux degrés d’oxydation +2 et +3. La présence de Fe<sup>3+</sup>

apparaît légèrement plus importante pour les nanoparticules seules que lorsqu'elles sont greffées. Le satellite caractéristique de ce degré d'oxydation apparaît plus individualisé et la dissymétrie du pic des NPSco@ANA vers les hautes énergies de liaison est accentuée, confirmant la présence en plus grande quantité de  $Fe^{2+}$ . Si cette légère différence est difficile à interpréter, nous pouvons toutefois affirmer que le groupement phosphonate limite l'oxydation des nanoparticules après greffage. En effet, lorsque les NPSco et les NPSco@ANA sont stockées en boîte à gants sous atmosphère inerte et que ces analyses sont refaites après un mois, nous observons malgré les précautions prises pour le stockage de ces échantillons, l'oxydation des nanoparticules seules avec une présence en  $Fe^{3+}$  majoritaire alors que le spectre des NPSco@ANA est en tout point semblable à celui présenté sur la Figure 82. Ce résultat a déjà été observé dans la littérature où le processus le plus répandu est la phosphatation des surfaces métalliques, pour assurer la protection des matériaux métalliques ferreux ou non ferreux contre la corrosion oxydante.

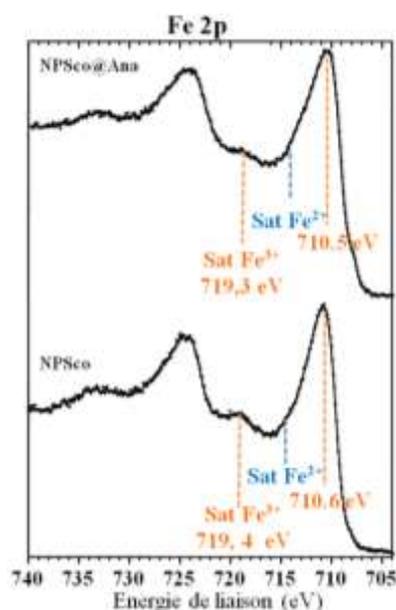


Figure 82 : spectres XPS des pics de cœur Fe2p pour les NPSco et les NPSco@ANA.

Le phosphore n'est détecté qu'en très faible pourcentage atomique (1 à 2%), ce qui paraît cohérent avec le fait que le dendron comme les nanoparticules dendronisées ne sont pas des espèces qui en sont riches ; néanmoins, la présence de phosphore pour les NPSco@ANA confirme le greffage du dendron à la surface des nanoparticules. Les pics 2p<sub>3/2</sub> - 1/2 (Figure 83) présentent une différence d'énergie de liaison entre les composantes 3/2 et 1/2 (dues au couplage spin-orbite) faible, de l'ordre de 0,9 eV, conforme aux résultats de la littérature. Le pic de la molécule ANA est localisé à 133,8 - 134,7 eV et est caractéristique d'un environnement phosphate. Lorsque la molécule est greffée à la surface des nanoparticules, nous observons un déplacement vers les basses énergies de liaison (pic situé à 132,5 - 133,4 eV), caractéristique de la formation de la liaison P-O-Fe<sup>3+</sup>. Ce déplacement significatif (1,3 eV) est cohérent avec un environnement en atomes d'oxygène moins négatifs que pour la molécule seule, ces atomes d'oxygène étant liés non seulement au phosphore, mais également aux atomes de fer des nanoparticules. L'environnement des atomes de phosphore étant moins électronégatif, l'énergie nécessaire pour arracher un électron des niveaux de cœur 2p du phosphore est donc moins importante, ce qui diminue d'autant l'énergie de liaison. Le déplacement chimique significatif observé tend à confirmer l'hypothèse d'une interaction de type bi ou tri-nucléaire évoquée précédemment au niveau des analyses infrarouges.

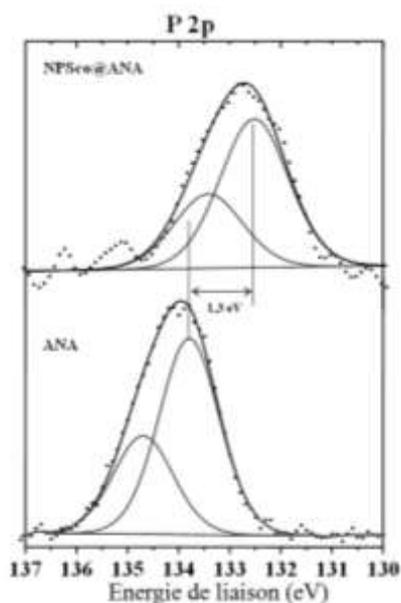


Figure 83 : spectres XPS des pics de cœur P2p pour les NPSco et les NPSco@ANA.

Le pic de cœur O1s des atomes d'oxygène pour le dendron ANA apparaît à 531,9 eV, caractéristique de liaison P=O. Pour les nanoparticules d'oxyde de fer, la composante principale située à 530,2 eV correspond aux liaisons Fe–O telles que l'on peut les rencontrer dans la magnétite. Une autre composante, de faible intensité, apparaît à plus haute énergie de liaison, caractéristique d'un environnement de type OH. Lorsque la molécule est greffée, trois composantes sont à considérer : celle située à basse énergie de liaison est caractéristique des atomes d'oxygène liés aux atomes de fer. La deuxième composante, localisée à 531,5 eV correspond aux contributions des liaisons phosphore-oxygène, soit P=O, P–OH, Fe–O–P, en accord avec les données de la littérature qui situent les énergies de liaison des espèces M–O–P (M = métal) et P=O dans la zone 531,3 - 532,1 eV. Ces valeurs d'énergies de liaison sont en parfait accord avec celles obtenues sur les NPSco@ANA (pic à 531,5 eV). La signature de faible intensité localisée autour de 533,2 eV correspond à des atomes d'oxygène des espèces carbonates, en accord avec le pic du carbone C1s situé à 290 eV comme signalé précédemment.

Tableau 21 : Energie de liaison, largeur à mi-hauteur et % atomique des pics de cœur Fe2p, O1s, C1s et P2p pour les NPSco, le dendron ANA et les NPSco@ANA. (Pour le pic du fer, ne sont reportés que les composantes 3/2 du Fe<sup>3+</sup> et les positions des satellites de Fe<sup>2+</sup> et Fe<sup>3+</sup>; pour la quantification, l'ensemble du spectre (pics principaux + pics satellites) a évidemment été considéré).

	NPSco			ANA			NPSco@ANA		
	E <sub>L</sub> (eV)	Largeur à mi-hauteur	%	E <sub>L</sub> (eV)	Largeur à mi-hauteur	%	E <sub>L</sub> (eV)	Largeur à mi-hauteur	%
<b>Fe<sup>3+</sup>2p 3/2</b>	710,6	2,9-3					710,6		
<b>Sat Fe<sup>3+</sup> 3/2</b>	719,4	4,1-3,5	30				719,4		19,5
<b>Sat Fe<sup>2+</sup> 3/2</b>	714,6	5,2-2,3					714,1		
<b>O 1s</b>	530,2	1,4	43,6	531,9	1,5	30	530,2	1,3	28,8
	531,7	1,6	7,4				531,5	1,2	8,8
							533,2	1,7	14,9
<b>C 1s</b>	285,0	1,6	15,5	283,5	1,2	43,7	285	1,7	21,8
	286,5	1,6	1,6	286,5	1,2	26,3	286,7	1,7	2,6
	290,0	1,6	1,9	–	–	–	289,7	1,7	2,4
<b>P 2p</b>				133,8 - 134,7	1,4	2	132,5	1,6	1,2

Les résultats XPS concordent donc avec les observations faites en analysant les spectres IR : une oxydation des nanoparticules est observée après greffage, mais les nanoparticules dendronisées deviennent moins sensibles à l'oxydation ; le dendron ANA s'est greffé via le groupement phosphonate et a formé avec la surface des nanoparticules un complexe au moins bi-nucléaire.

### C. Analyses structurales des nanoparticules dendronisées

#### *Diffraction des RX*

Le diffractogramme RX des NPSco@ANA préparées avec 800 mg/L de dendrons (ANA800.2), donc présentant un taux de greffage maximal, a été réalisé à température ambiante et est comparé à celui des nanoparticules non greffées dans la Figure 84.

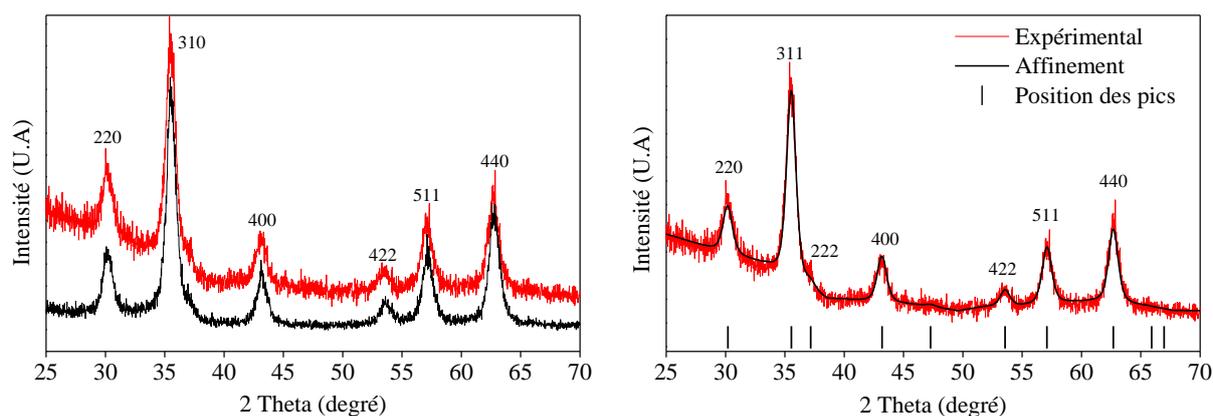


Figure 84 : diffractogrammes RX des NPSco (en noir) et des NPSco@ANA (en rouge) à gauche et affinement des NPSco@ANA à droite.

En comparant le diffractogramme RX des NPSco@ANA à celui des NPSco, nous pouvons constater qu'ils sont similaires. Les pics de diffraction peuvent être attribués à la structure spinelle, indiquant que les échantillons ne contiennent ni de l'hématite ( $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ) ni des hydroxydes de fer. Nous remarquons sur le diffractogramme RX des NPSco@ANA un épaulement aux bas angles typique de la présence de matière organique dans l'échantillon.

Le paramètre de maille des NPSco@ANA a été déterminé à l'aide du programme Fullprof par la méthode de Le Bail. Il est de  $0,8379 \pm 0,0004$  nm ce qui indique que les nanoparticules se sont légèrement oxydées durant la réaction de greffage, car cette valeur est inférieure à celle des NPSco de départ ( $0,8387 \pm 0,0004$  nm). Le paramètre de maille des NPSco@ANA est, comme pour les NPSco compris entre ceux de la maghémite (0,8346 nm) et de la magnétite (0,8396 nm), mais est plus proche de celui de la magnétite. Les nanoparticules dendronisées restent donc avec une structure de magnétite sous-stœchiométrique. Ces résultats rejoignent les observations faites lors de l'analyse des spectres IR et des spectres Mössbauer qui sont présentés dans la suite de cette partie.

#### *Spectrométrie Mössbauer*

Des spectres Mössbauer à 300 et 77K ont été enregistrés sur deux échantillons de NPSco@ANA ayant un taux de recouvrement maximum. Ils sont présentés dans la Figure 85.

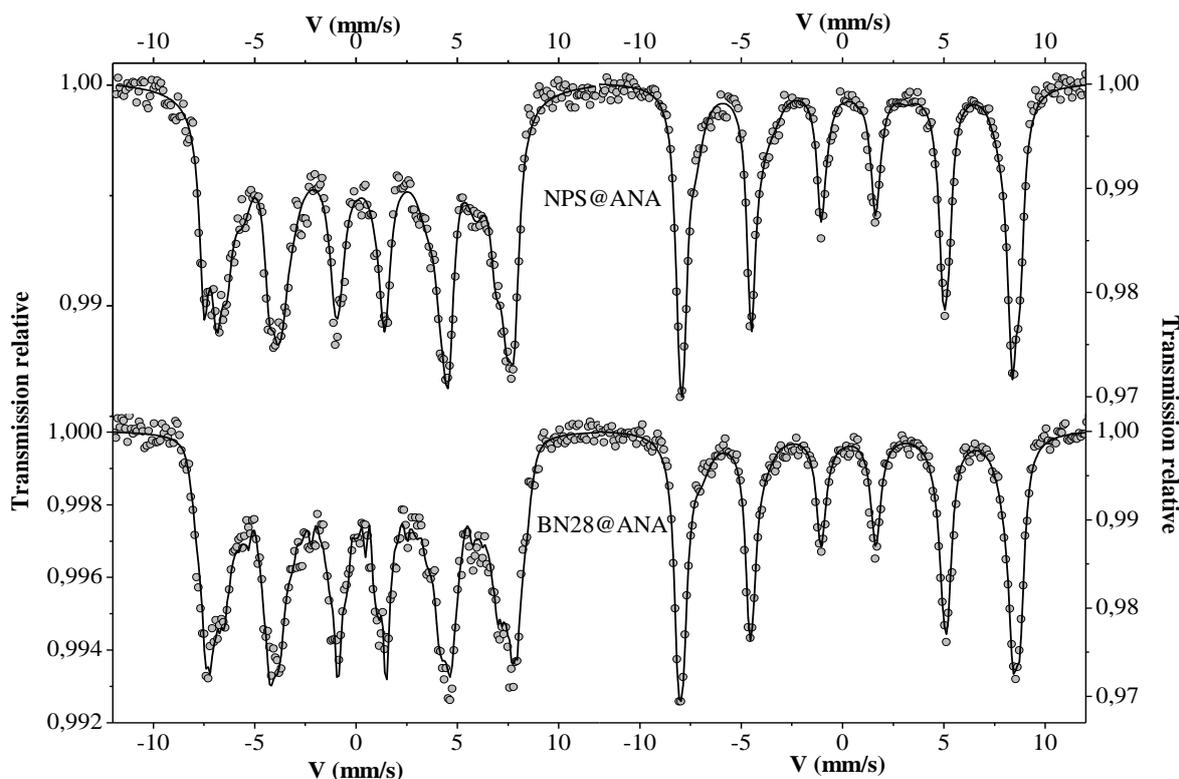


Figure 85 : spectres Mössbauer des NPSco@ANA de 11,7 nm (NPS@ANA, en haut) et de 10 nm en bas (BN28@ANA) réalisés à 300 K (gauche) et 77 K (à droite).

Les structures hyperfines des spectres Mössbauer à 300 et 77K (Figure 85) sont complexes avec des sextuplets présentant des raies larges et fortement asymétriques à 300K et proches de la magnétite à 77K: le profil des raies à 300K suggère la présence de nanoparticules avec une aimantation bloquée alors que l'élargissement interne traduit une réduction du champ hyperfin liée à des effets de relaxation superparamagnétique. Les valeurs de déplacement isomérique estimées à 300K pour les deux échantillons de 11,7 et 10 nm sont respectivement  $0,40$  et  $0,36 \pm 0,01$  mm/s conduisant respectivement à une composition de  $\text{Fe}_{2,77}\text{O}_4$  équivalent à 70 % de maghémite et 30 % de magnétite et  $\text{Fe}_{2,70}\text{O}_4$  équivalent à 90 % de maghémite dans l'hypothèse d'un modèle cœur-coquille (magnétite-maghémite). A 77K, nous trouvons pour les deux échantillons de 11,7 et 10 nm que les valeurs de déplacement isomérique sont  $0,53$  et  $0,48 \pm 0,01$  mm/s conduisant respectivement à une composition  $\text{Fe}_{2,82}\text{O}_4$ , soit une proportion de 55% de maghémite (et 45% de magnétite) et  $\text{Fe}_{2,74}\text{O}_4$ , soit une proportion de 80% de maghémite (et 20 % de magnétite). Nous constatons que plus la taille des nanoparticules est petite, plus l'oxydation est importante avec des épaisseurs de 1,7(3) nm et 2,4(3) nm pour les nanoparticules de 11,7 et 10 nm de diamètre (hypothèse d'un modèle cœur-coquille (magnétite-maghémite)).

Les paramètres issus de l'ajustement des spectres sont donnés dans le Tableau 22.

Tableau 22 : paramètres hyperfins des NPSco@ANA et des NPSco déduits des spectres Mössbauer à 300 K et 77 K.

Echantillon	Température	Déplacement isomérique ( $\text{mms}^{-1}$ )	Séparation quadripolaire ( $\text{mms}^{-1}$ )	Champ hyperfin (T)	Composition
NPS@ANA = 11,7 nm	300 K	$0,40 \pm 0,01$	$0 \pm 0,01$	$35,3 \pm 0,5$	$\text{Fe}_{2,77}\text{O}_4$
	77 K	$0,53 \pm 0,01$	$0,13 \pm 0,01$	$49,1 \pm 0,5$	$\text{Fe}_{2,70}\text{O}_4$
NPS = 11,7 nm	300 K	$0,38 \pm 0,01$	$0 \pm 0,01$	$35,5 \pm 0,5$	$\text{Fe}_{2,74}\text{O}_4$
	77 K	$0,47 \pm 0,01$	$0 \pm 0,01$	$50,2 \pm 0,5$	$\text{Fe}_{2,72}\text{O}_4$
BN28@ANA = 10 nm	300 K	$0,36 \pm 0,01$	$0 \pm 0,01$	$37,7 \pm 0,5$	$\text{Fe}_{2,82}\text{O}_4$
	77 K	$0,48 \pm 0,01$	$0 \pm 0,01$	$50,0 \pm 0,5$	$\text{Fe}_{2,74}\text{O}_4$
BN28 = 10 nm	300 K	$0,38 \pm 0,01$	$0 \pm 0,01$	$35,3 \pm 0,5$	$\text{Fe}_{2,74}\text{O}_4$
	77 K	$0,47 \pm 0,01$	$0 \pm 0,01$	$50,2 \pm 0,5$	$\text{Fe}_{2,72}\text{O}_4$

Ainsi, les nanoparticules de 11,5 nm issues de la co-précipitation présentent une composition  $\text{Fe}_{2,71}\text{O}_4$ , soit une proportion de 90 % de maghémite (et 10 % de magnétite) et une épaisseur de maghémite de 2,5(5) nm. Les nanoparticules dendronisées de taille similaire présentent une composition  $\text{Fe}_{2,82}\text{O}_4$ , soit une proportion de 55% de maghémite (et 45% de magnétite) alors que celles de taille plus petite 10 nm sont plus oxydées avec 80% de maghémite (et 20 % de magnétite). Nous constatons que les nanoparticules après greffage sont « moins » oxydées qu'après leur synthèse : cette différence peut s'expliquer par une oxydation plus rapide des nanoparticules nues par rapport aux nanoparticules dendronisées entre le moment où les synthèses et le greffages ont été réalisés et le moment où les mesures ont été réalisées. La phosphonation de la surface des nanoparticules permettrait de préserver les nanoparticules de l'oxydation.

#### D. Analyse des propriétés magnétiques des nanoparticules dendronisées

##### Cycle d'aimantation

Les propriétés magnétiques des NPSco@ANA ont été caractérisées avec un magnétomètre à échantillon vibrant (Balance Faraday, Foner) à 300 K. Celles de l'échantillon ANA800.2 ont été analysées de plus avec un magnétomètre SQUID à plus basses températures (Figure 86).

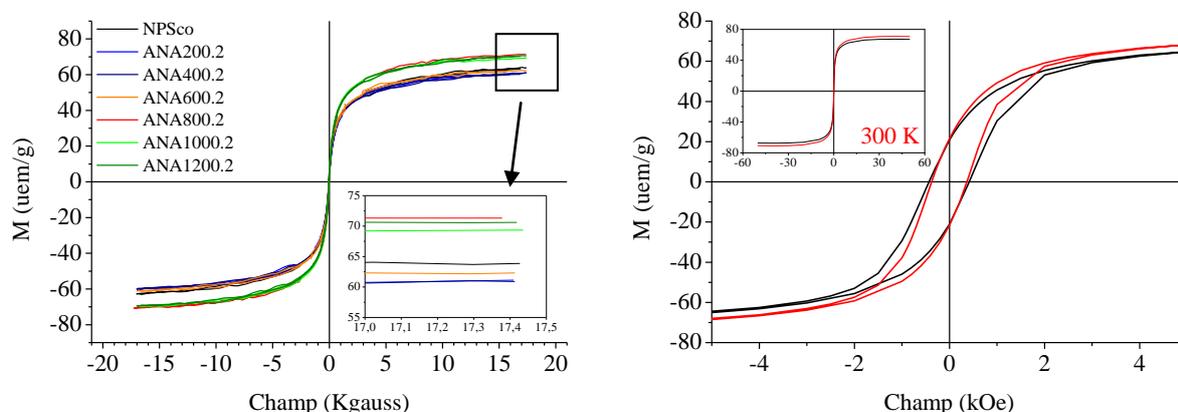


Figure 86 : cycles d'aimantation (à gauche) réalisés à 300 K sur les NPSco@ANA (coloré) et les NPSco (en noir), cycles d'aimantation (à droite) réalisés à 5 K sur les NPSco@ANA (en rouge) et les NPSco (en noir).

Les cycles d'aimantation des nanoparticules dendronisées montrent que les nanoparticules ont conservé leurs propriétés magnétiques aussi bien à 300 qu'à 5 K : elles ont un comportement superparamagnétique à température ambiante et il y a ouverture du cycle à 5 K car le comportement magnétique est devenu ferrimagnétique. Nous avons calculé l'aimantation à saturation des nanoparticules d'oxyde de fer en ôtant la contribution de la partie organique (le pourcentage de matière organique est obtenu à partir des analyses ATG). Nous comparons donc bien ensuite uniquement l'aimantation des nanoparticules d'oxyde de fer (Tableau 23).

Tableau 23 : aimantation à saturation des nanoparticules dendronisées.

Non de l'échantillon	Aimantation à saturation en uem/g
NPSco	65
ANA200.2	60
ANA400.2	61
ANA600.2	62
ANA800.2	69
ANA1000.2	70
ANA1200.2	71

Nous voyons que leur aimantation à saturation évolue avec le taux de greffage. Pour les faibles taux (ANA200, 400 et 600) l'aimantation à saturation est légèrement inférieure à celle des NPSco. Cette diminution peut être attribuée à l'oxydation des NPSco après greffage : nous rappelons que l'aimantation à saturation de la maghémite massive (74 uem/g) est inférieure à celle de la magnétite massive (92 uem/g). Cependant, lorsque les taux de greffage deviennent maximaux (ANA800, 1000 et 1200), l'aimantation à saturation devient supérieure à celle des nanoparticules nues (65 uem/g et 70 uem/g pour les NPSco et les NPSco@ANA respectivement).

Cette augmentation peut être la conséquence d'une augmentation de l'ordre magnétique dans les couches cantées de surface après le greffage. Le groupement phosphonate a en effet déjà été décrit induire ce type de comportement : en réduisant l'épaisseur des couches de spin cantées<sup>162</sup>, il permet ainsi de conserver, voire à améliorer, les propriétés magnétiques de nanoparticules. Afin de vérifier cette hypothèse, des spectres Mössbauer ont été enregistrés sur des NPSco@ANA, avec un taux de recouvrement maximum, à 10 K sous un champ appliqué de 8 T orienté parallèlement à la direction du rayonnement  $\gamma$  (Figure 87).

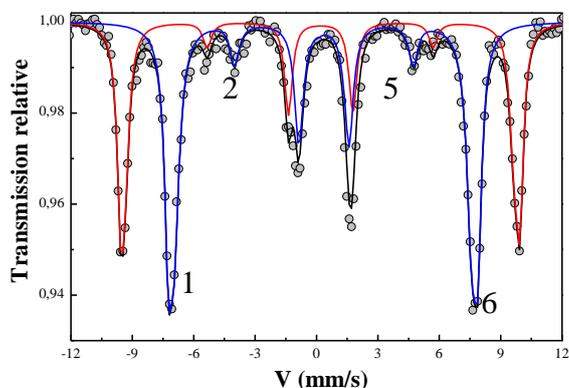


Figure 87 : spectre Mössbauer des NPSco@ANA de 10 nm (BN28@ANA) à 10 K et sous un champ de 8 T.

Dans les spectres de la Figure 87, nous constatons un dédoublement des raies externes (1, 6) et intermédiaires (2, 5) et une diminution des intensités des raies intermédiaires indiquant la présence

d'une couche de surface cantée. Les intensités relatives des raies intermédiaires permettent de mesurer un angle moyen de « canting » des moments de Fe de l'ordre de 22 - 23° spin pour les sites tétraédriques et octaédriques. L'épaisseur de la couche est estimée à 0,36(2) nm soit une couche atomique. Par ailleurs, l'application d'un champ magnétique rend compte de proportions de sites tétraédriques et octaédriques de 39:61 qui, compte-tenu des proportions des phases, est en bon accord avec celle de la phase maghémite, fortement majoritaire.

Dans le cas des nanoparticules non greffées, les angles moyens de *canting* des moments de Fe pour les sites tétraédriques et octaédriques sont de l'ordre de 22-23(5)°, soit une couche magnétiquement cantée de 0.35(5) nm d'épaisseur, équivalente à 1 couche. L'analyse des résultats en terme de proportions sites tétraédriques/octaédriques 38 :62 est en accord avec ceux de la phase maghémite, fortement majoritaire. Nous constatons donc que l'épaisseur de la couche cantée n'a pas évolué après greffage. Par conséquent la valeur plus élevée de l'aimantation à saturation des nanoparticules après greffage peut être attribuée à l'état « moins » oxydé de ces nanoparticules dendronisées.

### *Courbes ZFC/FC*

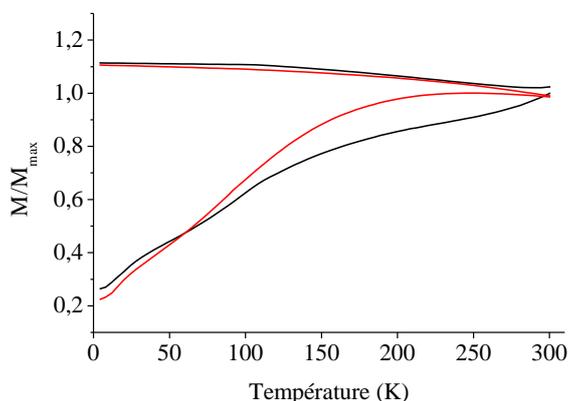


Figure 88 : courbe ZFC/FC des NPSco (en noir) et des NPSco@ANA (en rouge).

Les courbes ZFC/FC des nanoparticules avant et après greffage sont données dans la Figure 88. Les courbes ZFC et FC des nanoparticules non greffées ne se « rejoignent » pas et le maximum de la courbe ZFC, souvent assimilé à la température de blocage  $T_B$  (marquant le passage d'un comportement magnétique superparamagnétique à un comportement ferrimagnétique) n'est pas visible. Ces observations suggèrent que les nanoparticules sont fortement agglomérées et/ou non monodisperses en taille. La température de blocage mesurée à partir de la ZFC de nanoparticules non agglomérées de cette taille se situe généralement en dessous de 150 K<sup>111 114 121</sup>. Quand les nanoparticules s'agglomèrent, elles interagissent entre elles (interactions dipolaires) et cela induit un décalage de  $T_B$  vers les hautes températures<sup>288 289 332</sup>. L'agglomération des poudres explique donc principalement l'allure des courbes ZFC/FC.

Après le greffage, un maximum est observable sur la courbe ZFC. Ce décalage de la  $T_B$  vers de plus basse température par rapport aux nanoparticules non greffées suggère que la couche organique à la surface des nanoparticules limite l'effet des interactions dipolaires entre nanoparticules. Cette  $T_B$  de 250 K est encore grande par rapport à celle des nanoparticules obtenues par décomposition thermique ( $T_B \approx 150$  K) qui sont toutes recouvertes d'acide oléique individuellement. Ceci suggère que dans nos échantillons, des nanoparticules individuelles ont été greffées, mais également des petits agrégats, en accord de plus avec la largeur de la courbe ZFC.

## E. Bilan

---

Les travaux de greffage à pH constant avec la méthode B/pHréa optimisée pour favoriser le greffage et la stabilité des suspensions ont permis de dégager plusieurs résultats importants :

- le taux de greffage augmente lorsque la concentration du milieu réactionnel augmente. Il atteint un maximum, avec un taux de recouvrement compris entre 90 et 100 %, et se stabilise lorsque la concentration initiale de dendrons atteint 800 mg/L ;
- le greffage des dendrons a été validé par les différentes techniques suivantes : ATG, MET, mesures de potentiel zêta, photo émission X, spectroscopie infrarouge et spectrométrie Mössbauer ;
- les suspensions où les nanoparticules ont le meilleur taux de recouvrement sont les plus concentrées et les plus stables sous champ magnétique ;
- l'augmentation du taux greffage conduit à une augmentation de la concentration des nanoparticules en suspension (visible avec l'opacité des suspensions qui augmente), mais elle n'a aucune influence sur leur distribution de taille. La distribution des nanoparticules en suspensions reste centrée sur 50 nm quel que soit le taux de recouvrement ;
- l'analyse de la composition des nanoparticules avant et après greffage montre que les poudres s'oxydent dans le temps et que les nanoparticules dendronisées semblent s'oxyder moins rapidement que les nanoparticules nues. Cela pourrait s'expliquer par le greffage via des groupements phosphonates qui protégeraient l'oxyde de fer de l'oxydation.
- les nanoparticules dendronisées conservent leurs propriétés magnétiques et présentent même une aimantation à saturation légèrement supérieure en raison d'une composition moins « oxydée ».

### 1.2.5 Conclusions sur les meilleures conditions de greffage direct

---

Les études sur le taux de greffage en faisant varier le pH, la température et la concentration initiale de dendrons nous ont permis d'identifier plusieurs paramètres pour obtenir des suspensions de nanoparticules présentant des propriétés intéressantes pour des applications biomédicales (distribution de taille, propriété magnétiques...).

Le premier point important est de favoriser la dispersion des nanoparticules tout au long du processus. Ainsi, il est préférable d'ajuster le pH des suspensions à une valeur éloignée du point isoélectrique des nanoparticules avant et après le greffage. Il est aussi préférable d'éliminer les nanoparticules qui sédimentent après la réaction de greffage pour ne garder que celles qui restent stables en suspension sous champ magnétique.

Le deuxième point important est le pH du milieu réactionnel. Nous avons vu que pour greffer le dendron ANA le pH le plus intéressant (pH = 5) est celui qui favorise au maximum les attractions électrostatiques entre le groupement phosphonate et la surface des nanoparticules. Il faudra tenir compte de cette observation pour le greffage des dendrons ANACOOH et ANANH<sub>2</sub>.

Le troisième point est celui de la concentration initiale de dendrons du milieu réactionnel. Nous avons vu que pour une concentration de nanoparticules de 0,05 mg/L il faut une concentration initiale de dendrons ANA supérieure ou égale à 800 mg/L, soit 1 mM/L pour avoir un taux de recouvrement des nanoparticules supérieur à 90 %.

Enfin, le dernier point important est celui de la purification des suspensions pour éliminer les dendrons non greffés. La méthode d'ultrafiltration est celle qui est la plus intéressante de ce point de vue car elle permet de purifier rapidement les suspensions sans les dénaturer en provoquant une réaggrégation des nanoparticules.

## 1.3 Greffage des dendrons ANACOOH et ANANH2

### 1.3.1 Détermination des conditions de greffage

Les travaux menés avec les dendrons ANA ont permis de développer une méthode fiable de greffage qui est également utilisée pour le greffage des dendrons ANACOOH et ANANH2. Cependant, quelques modifications ont dû être réalisées pour optimiser le greffage de ces deux dendrons. En effet, les premiers travaux de greffage avec ces dendrons ont été réalisés, comme pour le dendron ANA, à pH = 5 pour favoriser au maximum les attractions électrostatiques entre le groupement phosphonate et la surface des nanoparticules, mais la présence du carboxylate et de l'ammonium ont nécessité de modifier le protocole de greffage (Figure 89).

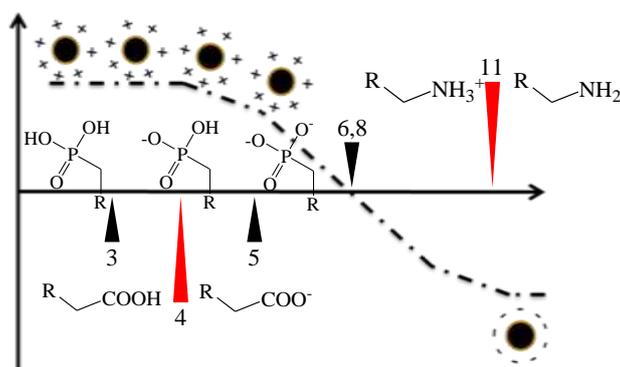


Figure 89 : évolution de la charge de l'agent de couplage phosphonate du dendron ANA, de la charge de surface des nanoparticules en fonction du pH et de la charge des groupements carboxylate et ammonium.

Les premières expériences de greffage à pH = 5, avec la méthode B/pHréa op et une concentration de 1 mM/L (ce qui correspond à la concentration 800 mg/L de dendrons ANA) en dendrons ANACOOH et ANANH2 n'ont pas fonctionné correctement. La stabilité des suspensions après la réaction de greffage était de courte durée (2 à 3 heures) montrant un faible taux de greffage. Nous avons attribué ces faibles taux de greffage aux problèmes d'interactions électrostatiques compétitives générés par la présence des groupements carboxylate ou ammonium chargés à pH = 5.

En effet, le pKa du groupement carboxylate des molécules est proche de 4. En réalisant la réaction de greffage du dendron ANACOOH avec un pH =5, son groupement carboxylate se retrouve chargé négativement. Le groupement carboxylate étant un agent de couplage largement utilisé pour greffer des molécules sur des nanoparticules, il est entré en compétition avec le groupement phosphonate. Ainsi, la réaction de greffage a « mal » fonctionné. Les réactions de greffage du dendron ANACOOH ont été réalisées avec un pH compris entre 3 et 4 (pH = 3,5, Figure 89) où le groupement carboxylate n'est plus chargé et n'entre donc plus en compétition.

Pour le dendron ANANH2 le pKa du groupement ammonium est proche de 11. Ainsi, en dessous de pH =11 ; ce groupement est chargé positivement (NH<sub>3</sub><sup>+</sup>). A pH = 5, la charge positive des nanoparticules et celle du groupement ammonium provoquent des répulsions électrostatiques

suffisantes pour défavoriser la réaction de greffage. Des expériences de greffage ont été faites à un pH > 11. A ce pH le groupement ammonium n'est plus chargé, mais la charge des nanoparticules et celle du groupement phosphonate sont toutes deux négatives. Ces tentatives n'ont pas fonctionné, la forte affinité du groupement phosphonate pour le fer n'a pas suffi. D'autres expériences ont alors été menées avec un pH légèrement inférieur (6,4) à celui du PIE des nanoparticules. A ce pH, les nanoparticules sont très faiblement chargées positivement et cette charge peut permettre le greffage sans entrer en grande répulsion avec celle du groupement ammonium. Ces expériences ont permis de réaliser un greffage du dendron ANANH2.

#### A. Le protocole de greffage des dendrons ANACOOH et ANANH2

La méthode B/pHréa op a été réadaptée pour chaque dendron : le pH du milieu réactionnel est de 3,5 pour le dendron ANACOOH et de 6,5 pour le dendron ANANH2. La concentration initiale de dendrons utilisée pour chaque réaction est de 1 mM/L et le protocole est le suivant :

- 1,5 mL issu du produit de la synthèse par co-précipitation (ce volume correspond à 50 mg de NPSCO) sont prélevés ;
- les nanoparticules contenues dans ce volume sont lavées une dizaine de fois par décantation magnétique avec de l'eau ultrapure (10 mL à chaque lavage) et à pH = 7 pour favoriser leur sédimentation. Elles sont conservées dans un minimum de solvant ;
- en parallèle de l'étape de lavage des nanoparticules, une quantité choisie de dendron est dissoute dans 50 mL d'eau désoxygénée ultrapure. Cette solution sera appelé « S-ANACN » ;
- le petit volume de nanoparticules lavées et non séchées est réajusté avec les 50 mL de la solution S-ANACN ;
- le pH du mélange est mesuré et réajusté (pHréa) à la valeur voulue (Tableau 24) avec une solution diluée (4 fois) d'hydroxyde de tétraméthylammonium qui est la base utilisée pour la synthèse des NPSCO ;
- les flacons sont bien fermés, sous atmosphère inerte, pour éviter toute perte d'eau par évaporation ou tout contact avec l'oxygène de l'air au cours de la fonctionnalisation. Ces flacons sont ensuite plongés dans un bain à ultrasons maintenu à la température de  $35 \pm 2^\circ\text{C}$  pendant 90 minutes ;
- à la fin de la réaction, 25 mL d'eau désoxygénée sont ajoutés au milieu réactionnel et le pH ajusté à environ 7,4 (pHréa/fin). Le flacon est replongé cinq minutes dans le bain à ultrasons.

Tableau 24 : conditions de greffage des dendrons ANACOOH et ANANH2.

Non de l'échantillon	Concentration initiale de dendrons $\pm 5$ mg/L	pH de S-ANACN $\pm 0,1$	pHréa $\pm 0,1$	pH à la fin de l'expérience $\pm 0,1$	pH après l'ajout de 25 mL d'eau $\pm 0,1$	pHréa/fin $\pm 0,1$	Sédimentation
ANACOOH.1	1022	3,2	3,5	3,7	3,8	7,3	Légère
ANANH2.1	950	3,1	6,4	6,5	6,7	7,2	Marqué

Après la réaction de greffage, les suspensions ont été purifiées comme dans l'étude à pH = 5. Les suspensions purifiées sont opaques et stables. Les nanoparticules greffées avec le dendron ANANH2 et le dendron ANACOOH sont nommées NPSCO@ANANH2 et NPSCO@ANACOOH dans la suite de ce manuscrit.

### *Les taux de greffage*

Des analyses élémentaires du fer et du phosphore ont été réalisées pour déterminer les taux de greffage (Tableau 25).

*Tableau 25 : estimation des taux de greffage par dosages du fer et du phosphore.*

Non de l'échantillon	Taux de fer $\pm 4$ mg/Kg	Taux de phosphore $\pm 0,1$ mg/Kg	Masse NPSco $\pm 0,05$ mg	Surface des NPSco en $\text{nm}^2$	Nombre de dendrons greffés	Taux de greffage $\pm 0,1$ Molécule/ $\text{nm}^2$
ANACOOH.2	407	2,6	0,563	$5,58251 \times 10^{19}$	$5,11976 \times 10^{19}$	1,01
ANANH2.2	300	1,7	0,414	$4,10815 \times 10^{19}$	$3,30516 \times 10^{19}$	0,80

Les résultats donnés dans le Tableau 25 montrent que les taux de greffage pour les dendrons ANACOOH et ANANH2 sont plus faibles que ceux obtenus avec le dendron ANA (entre 1,2 et 1,4 molécule/ $\text{nm}^2$ , Tableau 32, page 151). Ces plus faibles taux de greffage peuvent s'expliquer par un encombrement stérique plus important de ces dendrons par rapport au dendron ANA. En effet, la chaîne PEG centrale qui porte le groupement carboxylate ou ammonium est plus longue que celle du dendron ANA. De plus au pH du greffage, le groupement ammonium est chargé positivement et le groupement carboxylate peut être faiblement chargé négativement ce qui induit très certainement des répulsions électrostatiques limitant le greffage.

### **B. Stabilité colloïdale des nanoparticules dendronisées**

---

#### *Mesures de potentiel zêta en fonction du pH*

Les mesures de potentiel zêta à un pH proche de 7 sur les nanoparticules dendronisées montrent que les NPSco@ANACOOH ont un potentiel zêta de  $-17 \pm 3$  mV et les NPSco@ANANH2 un potentiel zêta de +11 mV.

Le potentiel zêta des suspensions de NPSco@ANACOOH n'est pas très élevé comparativement à celui des suspensions de NPSco@ANA ( $-16 \pm 3$  mV quand le taux de greffage est maximum) bien que le dendron ANACOOH soit chargé à pH= 7. Ce résultat est la conséquence directe du taux de greffage moins élevé avec ce dendron. En effet, nous avons vu que le potentiel zêta des suspensions de NPSco@ANA augmente avec le taux de greffage et est maximum lorsque le taux de greffage est supérieur à 1,2 molécules/ $\text{nm}^2$ . Le taux de greffage des NPSco@ANACOOH étant de 1,01 molécules/ $\text{nm}^2$ , leur potentiel zêta devrait être plus faible, mais le groupement carboxylate apportant une charge négative supplémentaire, il compense la diminution du taux de greffage.

Le potentiel zêta NPSco@ANANH2 est positif ce qui est en accord avec la charge positive du dendron ANANH2 à pH = 7. Cette valeur est également faible car elle résulte de la compétition entre la diminution de la charge vers des valeurs négatives due au greffage avec le groupement phosphonate et l'augmentation de la charge vers les valeurs positives due à la présence du groupement ammonium sur le dendron.

Des mesures de potentiel zêta en mode automatique ont été effectuées pour déterminer le point isoélectrique des suspensions de NPSco@ANACOOH. De telles mesures n'ont pas pu être réalisées avec les suspensions de NPSco@ANANH2 en raison de la grande instabilité de ces suspensions quand la force ionique du milieu est modifiée.

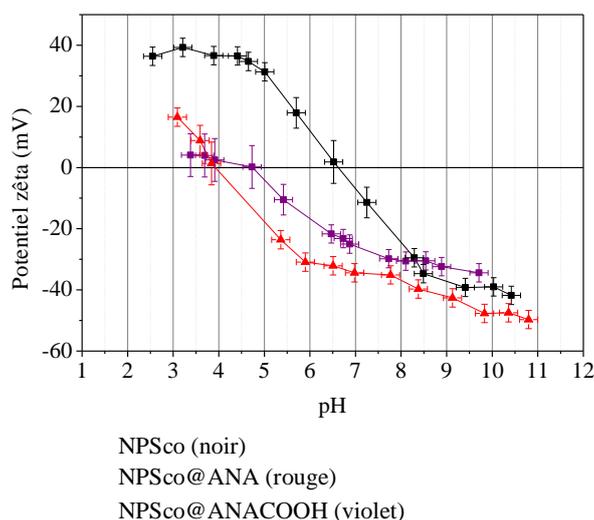


Figure 90 : courbes de potentiel zêta en fonction du pH.

Après greffage avec le dendron ANACOOH, la courbe de potentiel zêta en fonction pH est décalée vers les pH acides comme nous l'avons observé avec le dendron ANA. Cependant, le PIE des NPSco@ANACOOH est supérieur à celui des NPSco@ANA et proche de 4,8. Ce plus faible décalage s'explique par :

- le taux de greffage plus faible de ce dendron par rapport à celui du dendron ANA ;
- la présence du groupement carboxylate avec un pKa proche de 4. Au dessus de ce pH, ce groupement est chargé négativement.

#### Mesures granulométriques.

Les mesures de distribution de taille des suspensions ont été réalisées sur les suspensions de nanoparticules dendronisées après l'élimination des gros agrégats par sédimentation sous un aimant.

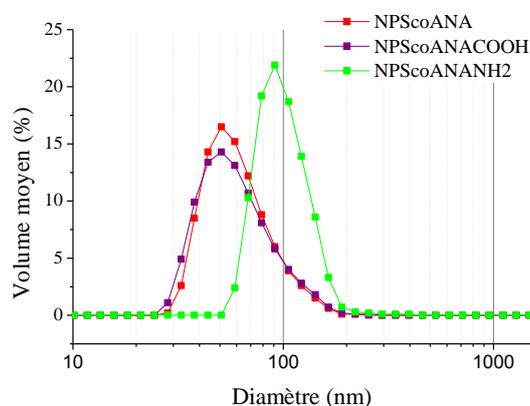


Figure 91 : distributions de taille des NPSco@ANACOOH et NPSco@ANANH2 à pH = 7

Les distributions de taille présentées dans la Figure 91 montrent qu'elles sont toutes monomodales. La distribution de taille des NPSco@ANACOOH est centrée sur 50 nm et est similaire à celle obtenue avec la suspension NPSco@ANA. Le diamètre hydrodynamique moyen des NPSco@ANANH2 est plus grand et la distribution de taille est centrée sur 90 nm. La distribution obtenue les NPSco@ANACOOH est en accord avec les taux de greffage du dendron qui est élevé et la valeur de potentiel zêta de la suspension à pH = 7 qui est très proche de celle de la suspension de NPSco@ANA.

Les suspensions de NPSco@ANACOOH ont donc une stabilité colloïdale similaire à celle des suspensions de NPSco@ANA.

La plus forte agrégation des NPSco@ANANH2 s'explique par le plus faible taux de greffage de ces nanoparticules et la valeur de potentiel zêta qui est plus faible. Le faible taux de greffage et le pH de greffage ne permettent pas une bonne stabilité électrostatique des nanoparticules en suspension.

### C. Spectres infrarouges des nanoparticules dendronisées avec les dendrons ANACOOH et ANANH2

Les spectres IR des nanoparticules greffées avec les dendrons ANACOOH et ANANH2 sont présentés dans les figures suivantes avec ceux des dendrons et des NPSco.

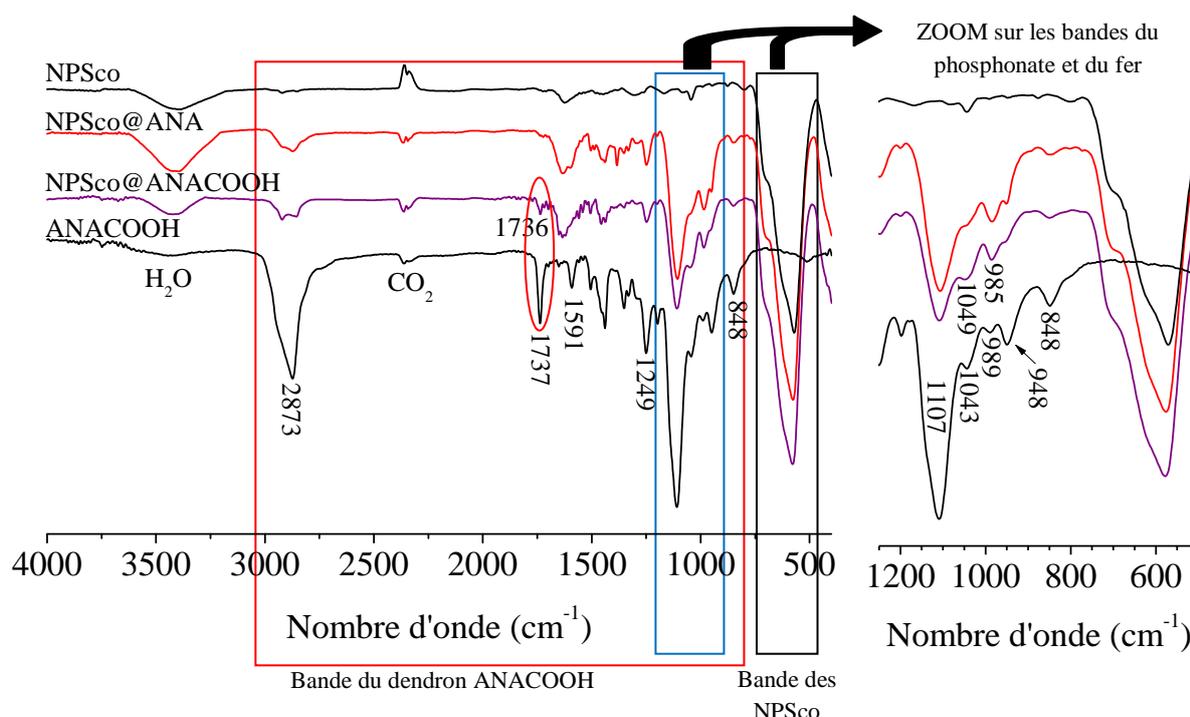


Figure 92 : spectres infrarouges des NPSco, des NPSco@ANA, des NPSco@ANACOOH et du dendron ANACOOH.

Le spectre infrarouge des NPSco@ANACOOH donné dans la Figure 92 montre que le dendron s'est bien greffé sur les nanoparticules. En effet, de nouvelles bandes appartenant au dendron apparaissent sur le spectre des nanoparticules dendronisées et notamment une bande située à  $1737\text{ cm}^{-1}$  (encerclé en rouge) qui montre la présence du groupement carboxylate. La présence de cette bande confirme que le groupement carboxylate n'a pas servi d'agent de couplage.

Le zoom sur les bandes phosphonates montre que les bandes appartenant aux liaisons P=O et P-OH disparaissent. La disparition de la bande P=O ( $1200\text{ cm}^{-1}$ ) peut être attribuée, comme pour les NPSco@ANA à une baisse d'intensité. La disparition des bandes des liaisons P-O et P-OH ( $1043$  et  $989\text{ cm}^{-1}$ ) est plus difficile à percevoir, mais le profil du spectre dans cette zone, qui ressemble fortement à celui des NPSco@ANA, permet de conclure que les liaisons P-OH sont engagées dans une liaison avec le fer. La bande localisée à  $985\text{ cm}^{-1}$  contient sûrement la contribution des liaisons P-O-Fe, identifié vers  $975\text{ cm}^{-1}$  avec les NPSco@ANA.

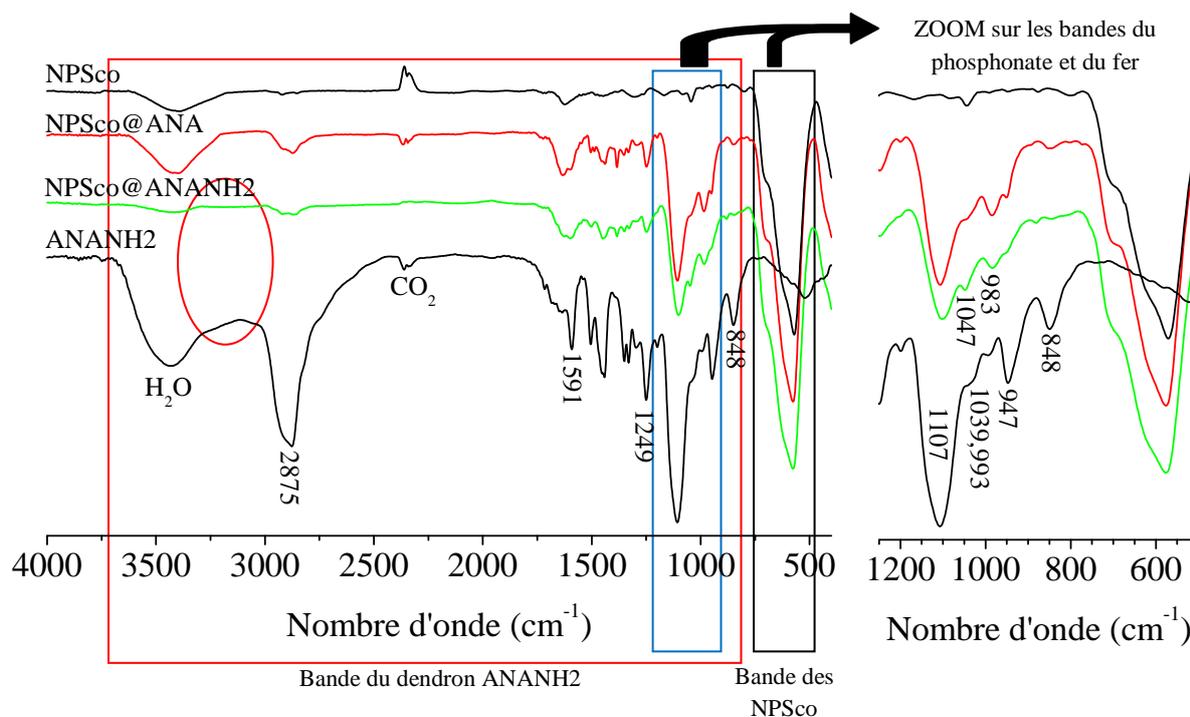


Figure 93 : spectres infrarouges des NPSco, des NPSco@ANA, des NPSco@ANANH2 et du dendron ANANH2.

Le spectre infrarouge des NPSco@ANANH2 montre lui aussi que le dendron s'est greffé à la surface des nanoparticules. Nous retrouvons en effet des bandes caractéristiques du dendron sur les nanoparticules dendronisées. La bande appartenant au groupement ammonium (encerclée en rouge) n'est pas visible sur le spectre des nanoparticules dendronisées sûrement en raison des taux de greffage qui sont plus faibles.

Le zoom sur les bandes phosphonates montre que les bandes des liaisons P=O et P-OH disparaissent. La disparition de la bande P=O n'est, comme pour les précédents greffages, pas vérifiable tandis que celle des liaisons P-OH est plus difficile à percevoir. La bande localisée à 983  $\text{cm}^{-1}$  contient sûrement la contribution des P-O-Fe.

En conclusion, les spectres IR des NPSco@ANACOOH et NPSco@ANANH2 confirment le greffage des dendrons à la surface des nanoparticules. La disparition de la bande de la liaison P=O n'est pas vérifiable, comme nous l'avons noté sur les spectres IR des NPSco@ANA. Cependant, la disparition des bandes des liaisons P-OH est visible. L'analyse des spectres IR de ces nanoparticules dendronisées suggère que le complexe de surface avec le fer est au moins bi-nucléaire.

#### D. Bilan

Le greffage des dendrons ANACOOH et ANANH2 a nécessité une réadaptation du protocole de greffage. Il a fallu tenir compte du pKa des groupes fonctionnels (carboxylate et ammonium) portés par les dendrons. Les analyses élémentaires ont montré que les taux de greffage sont plus faibles avec ces dendrons en raison de la charge du groupe fonctionnel et de la taille plus volumineuse de ces derniers (encombrement stérique). Les mesures de potentiel zêta et les spectres IR confirment le greffage des dendrons à la surface des nanoparticules. Les mesures de distribution de taille montrent que la taille des dendrons n'a pas eu un grand impact sur la dispersion des nanoparticules. Ainsi, les NPSco@ANACOOH ont un diamètre moyen centré sur 50 nm comme les NPSco@ANA. La

distribution des NPSco@ANANH<sub>2</sub> est centrée sur 90 nm en raison principalement du faible taux de greffage et du pH de greffage qui ne permettent pas d'éviter l'agrégation des nanoparticules durant l'expérience.

## 1.4 Conclusion

---

Le greffage des dendrons sur les nanoparticules synthétisées par co-précipitation a nécessité la mise au point d'une méthode de greffage. Ainsi, pour obtenir des suspensions stables, concentrées et avec une bonne distribution de taille, il a été nécessaire de favoriser la dispersion des nanoparticules durant la réaction de greffage tout en favorisant les attractions électrostatiques entre dendrons et nanoparticules. Les expériences ont alors montré qu'il faut éviter d'agréger les nanoparticules en les séchant avant le greffage, qu'une large utilisation des ultrasons est indispensable et que le pH du milieu réactionnel est un paramètre très important.

En adaptant les conditions de greffage en tenant compte des pKa des groupements phosphonate, carboxylate et ammonium, les trois dendrons ont pu être greffés à la surface des nanoparticules, mais le taux de greffage des dendron ANACOOH (1 molécule/nm<sup>2</sup>) est plus faible que celui du dendron ANA (1,2 à 1,4 molécules/nm<sup>2</sup>). Le greffage du dendron ANANH<sub>2</sub> ayant nécessité des conditions de greffage à un pH proche du PIE des nanoparticules nues, et dans des conditions non optimales, le taux de greffage de ce dendron a été plus faible (0,8 molécule/nm<sup>2</sup>). La caractérisation des nanoparticules dendronisées a permis de montrer que la réaction de greffage oxydait légèrement les nanoparticules, mais que la cinétique d'oxydation était plus lente contrairement à celle des nanoparticules non greffées et que leurs propriétés magnétiques sont conservées. Les spectres IR confirment le greffage des dendrons et suggèrent que le complexe de surface entre le fer et le groupement phosphonate est au moins bi-nucléaire.

La distribution de taille des nanoparticules en suspension est centrée sur 50 nm pour les suspensions de NPSco@ANA et NPSco@ANACOOH alors que celle des NPSco@ANANH<sub>2</sub> est centrée 90 nm en raison des conditions de greffage plus délicates. Ces mesures montrent que les nano-objets en suspensions sont composés d'agrégats et/ou agglomérats de nanoparticules.

A la suite de toutes les expériences réalisées, nous pouvons constater que la méthode de greffage a atteint des limites en terme de distribution de taille des nanoparticules dendronisées. En effet, il n'a pas été possible de descendre en dessous d'un diamètre hydrodynamique moyen de 50 nm quelque soit le dendron et le taux de greffage. La cause principale est l'état d'agrégation des NPSco avant le greffage. En effet, à l'état nu à la fin de leur synthèse, il est difficile de les disperser pour réaliser le greffage. Les nanoparticules synthétisées par décomposition thermique ne présentent pas cet inconvénient, c'est pourquoi elles font l'objet du chapitre suivant.

## 2 FONCTIONNALISATION DES NANOPARTICULES SYNTHETISEES PAR DECOMPOSITION THERMIQUE

---

Dans cette partie nous décrivons les études menées pour greffer les trois dendrons à la surface des nanoparticules synthétisées par décomposition thermique (NPStd@OA). Ces nanoparticules étant recouvertes d'acide oléique, la méthode la plus utilisée et la plus simple est l'échange de ligand. Nous détaillerons la mise au point de cette méthode avec le dendron ANA. Nous montrerons les problèmes rencontrés et pourquoi nous nous sommes orientés vers un procédé d'échange de ligands avec transfert de phase. Ces travaux ont été réalisés en tenant compte des paramètres importants qui avaient été dégagés des travaux sur les nanoparticules synthétisées par co-précipitation (pH du milieu réactionnel, concentration initiale de dendrons, ...)

### 2.1 Premiers travaux : échange direct dans le THF des molécules d'acide oléique par les dendrons ANA

---

Pour remplacer les molécules d'acide oléique à la surface des nanoparticules par le dendron ANA, un échange de ligands directement dans le THF a été testé. Cet échange de ligands est basé sur l'équilibre entre adsorption et désorption de molécules au contact d'une surface. En effet, lorsque des molécules A sont placées au contact d'une surface recouverte de molécules B, une fraction d'entre elles est susceptible de s'adsorber à la place de molécules B qui passeront alors en suspension. La force motrice de l'équilibre ainsi formé est la concentration des molécules et l'intensité des liaisons « surface-molécule » mise en jeux.

Par conséquent, lorsque des dendrons ANA vont être introduits dans la suspension de NPStd@OA, une fraction des dendrons va s'échanger avec les molécules d'acide oléique à la surface des NPStd@OA. Les groupements carboxylates de l'acide oléique ont une grande affinité avec le THF et se désorbent assez facilement de la surface des nanoparticules alors que l'affinité du groupement phosphonate des dendrons pour la surface des nanoparticules est grande. Les dendrons ANA devraient donc remplacer les molécules d'acide oléique sur les NPStd@OA.

#### A. Le protocole (méthode EL.THF)

---

Le protocole adopté pour effectuer l'échange de ligands avec le dendron ANA a pour but de favoriser l'équilibre dans le sens de l'adsorption du dendron ANA. Pour cela la concentration en dendrons ANA est ajustée de sorte qu'elle soit toujours supérieure à celle des molécules d'acide oléique. Une méthode a alors été développée (méthode EL.THF) impliquant des étapes d'ultrafiltration, car cette voie de séparation sous pression favorise aussi la désorption des molécules faiblement liées à la surface des nanoparticules comme l'acide oléique.

Les premiers essais ont montré qu'une seule étape d'échange de ligands n'est pas suffisante pour obtenir une suspension stable dans l'eau. C'est pour cela qu'une méthode EL.THF en plusieurs étapes a été mise au point. L'objectif est de soumettre la suspension contenant les dendrons à des traitements de purification qui vont déplacer l'équilibre vers une adsorption maximale de dendrons. Les différentes étapes de cette méthode sont décrites ci-dessous :

- les NPStd@OA sont dispersées dans 50 mL de THF à une concentration de 1 mg/mL ;

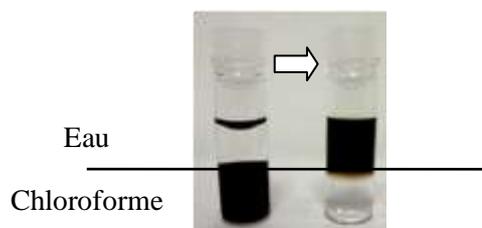
- la suspension obtenue est purifiée deux fois par ultrafiltration (par tranche de 25 mL) pour désorber un maximum de molécules d'acide oléique de la surface des nanoparticules et ainsi diminuer leur concentration (ELP) (tout en évitant d'en désorber trop ce qui conduirait à une réaggrégation des nanoparticules en suspension) ;
- une masse Y de dendrons est ajoutée au mélange. Le flacon est fermé sous argon et est placé 15 minutes dans le bain à ultrasons avant d'être agité mécaniquement pendant deux heures. Le mélange est récupéré et purifié trois fois par ultrafiltration (par tranche de 25 mL) pour éliminer les dendrons non greffés, mais également les molécules d'acide oléique désorbées. C'est le premier échange de ligands (EL1) ;
- une nouvelle masse Y de dendron est ajoutée et le flacon est à nouveau fermé sous argon, est placé 15 minutes dans le bain à ultrasons avant d'être agité mécaniquement pendant deux heures. Le mélange est à nouveau récupéré et purifié trois fois par ultrafiltration (par tranche de 25 mL) pour éliminer les dendrons non greffés, mais également les molécules d'acide oléique désorbées. C'est le second échange de ligands (EL2) ;
- l'étape précédente est répétée encore une fois (EL3) ;
- Enfin, après le troisième échange, le mélange est purifié trois fois (par tranche de 25 mL) pour éliminer toute les molécules non greffées. Les nanoparticules greffées sont conservées dans du THF avant d'être transférées dans l'eau.

Le Tableau 26 donne la concentration initiale de dendrons à chaque étape.

*Tableau 26 : concentration initiale de dendrons.*

Etapes de l'échange	Concentration de dendrons (mg/L)
EL1	1000
EL2	800
EL3	600

Une fois ce protocole réalisé, les nanoparticules greffées sont transférées du THF dans l'eau (TR). Pour effectuer ce transfert, le THF est évaporé et les nanoparticules greffées sont redispersées dans du chloroforme (concentration 1 mg/mL). Un volume donné de la suspension de nanoparticules est introduit dans un bécher puis un volume équivalent d'eau est ajouté. L'eau et le chloroforme n'étant pas miscibles, les nanoparticules sont dans la phase organique en début d'expérience. Le mélange est alors laissé sous agitation magnétique toute une nuit durant laquelle le chloroforme s'évapore et les nanoparticules passent dans l'eau. A la fin de l'expérience, lorsque tout le chloroforme est évaporé, une suspension stable et concentrée de nanoparticules est obtenue dans l'eau. Si du chloroforme est ajouté à cette suspension, les nanoparticules restent dans l'eau (Figure 94).



*Figure 94 : photo des suspensions avant (à gauche) et après transfert (à droite).*

Les photos des suspensions avant et après transfert montrent que l'échange de ligands a fonctionné car des suspensions de NPStd, auparavant hydrophobes (couche d'acide oléique en surface) ont été

obtenues dans l'eau. Après ce transfert, la suspension est purifiée deux fois pour extraire les molécules en excès et le pH est réajusté à une valeur proche de 7. Les NPStd greffées avec le dendron ANA sont nommées NPStd@ANA.

## B. Stabilité colloïdale des nanoparticules dendronisées

Des mesures de distribution de taille ont été effectuées dans le THF sur les suspensions de NPStd@OA, sur les suspensions après les différentes étapes d'échange de ligands (EL1, EL2, EL3) et sur les suspensions de NPStd@ANA après transfert dans l'eau.

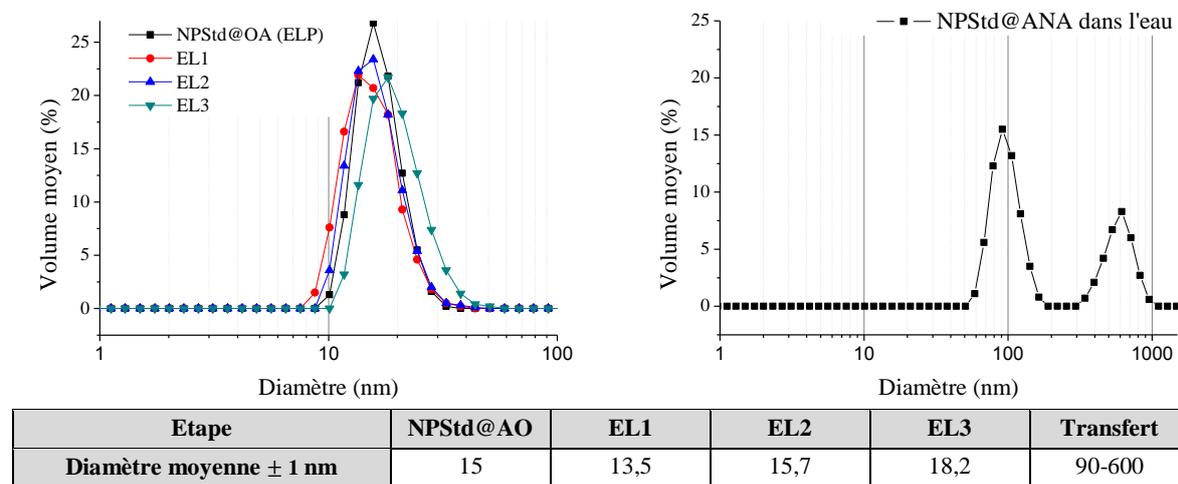


Figure 95 : distributions de taille des nanoparticules avant (à gauche) et après le transfert dans l'eau (à droite).

Les mesures de distribution de taille présentées dans la Figure 95 montrent qu'aucune agglomération n'est observée durant les étapes d'échange de ligands : le diamètre hydrodynamique moyen des nanoparticules en suspensions est resté inférieur à 20 nm. Cette distribution en taille augmente légèrement lors des deux dernières étapes. Après le transfert dans l'eau et la purification, la taille moyenne des nanoparticules en suspensions augmente fortement. Cette agglomération peut avoir différente origine :

- le nombre d'étape d'échange de ligands n'a pas été suffisant pour extraire la totalité des molécules d'acide oléique conduisant à l'instabilité des nanoparticules dans les milieux aqueux ;
- les dernières purifications faites après le transfert ont conduit à une désorption des dendrons et leur quantité à la surface des nanoparticules est suffisante pour maintenir les nanoparticules stables en suspensions dans le THF, mais pas suffisante pour les maintenir stables dans une solution aqueuse ;

Ces deux hypothèses ont pu être vérifiées en analysant les spectres IR des nanoparticules après le troisième échange de ligands (Figure 96).

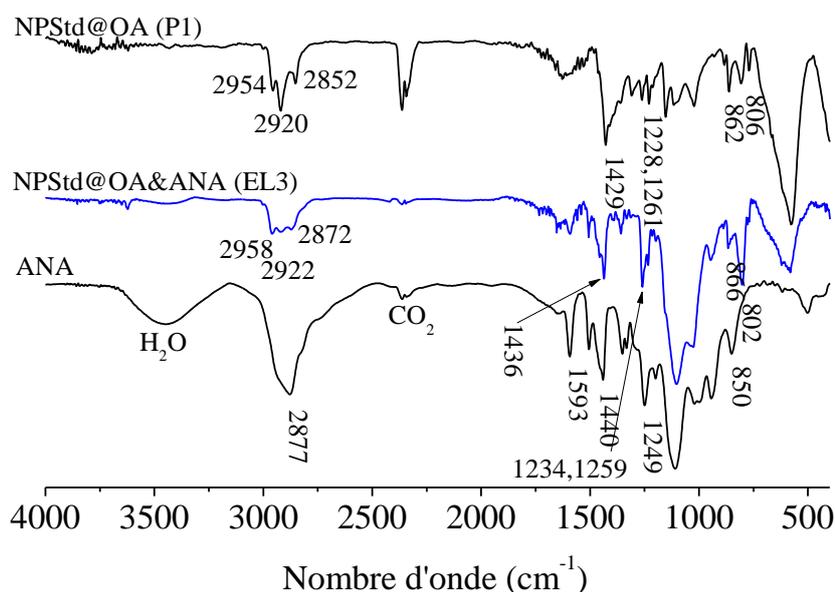


Figure 96 : spectres infrarouges des nanoparticules à différents stades.

Le spectre infrarouge des nanoparticules greffées, par comparaison avec les spectres des NPSStd@AO, de la molécule ANA et du THF, présente des bandes qui appartiennent au dendron ANA et aux molécules d'acide oléique (Figure 96). En effet, les bandes intenses à 802, 866, 1228, 1261 et 2958  $\text{cm}^{-1}$ , sont attribuables aux molécules d'acide oléique tandis que celles localisées entre 850 et 1200, entre 1436 et 2872  $\text{cm}^{-1}$  appartiennent au dendron ANA. Les bandes du dendron ANA, ont une intensité très élevée qui est même supérieure à celle des bandes de l'oxyde de fer (entre 750 et 500  $\text{cm}^{-1}$ ) ; ceci, suggère que la purification n'est pas complète. Comparativement, l'intensité de ces bandes devrait être plus faible comme cela a été observé avec les nanoparticules dendronisées obtenues par co-précipitation NPSco@ANA.

Pour conclure, l'affinité du groupement phosphonate pour le fer n'a pas suffi pour échanger toutes les molécules d'acide oléique et l'intensité des bandes du dendron ANA par comparaison à celles de l'oxyde de fer et celles observées avec les NPSco@ANA suggère que les dendrons ANA sont en excès.

Des analyse élémentaires et analyses thermogravimétriques ont été réalisées et sont présentées dans la Figure 97.

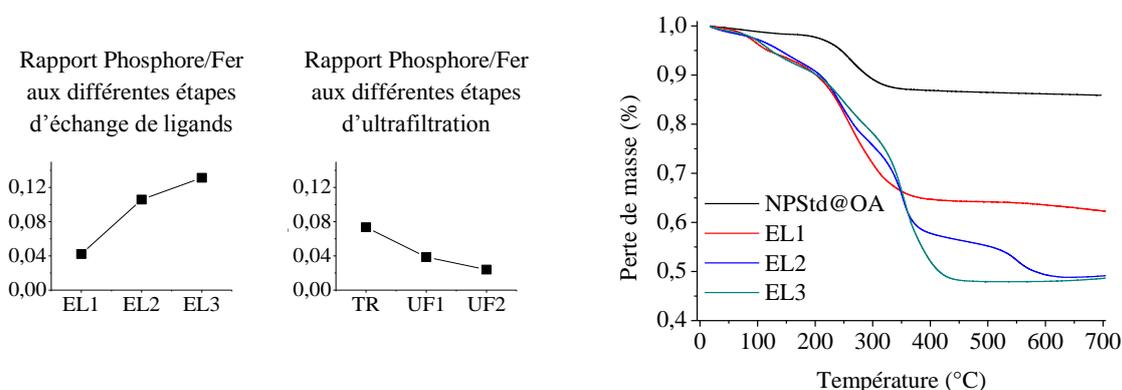


Figure 97 : évolution des rapports phosphore/fer déduit des analyses élémentaires à différents stades (à gauche) et courbes ATG sous air (à droite).

Les analyses élémentaires et les ATG confirment les observations faites sur les spectres IR. L'évolution du rapport phosphore/fer aux différents stades de l'expérience montre que ce rapport augmente avec le nombre d'étapes d'échange (EL1, EL2 et EL3) de ligands ce qui concorde avec l'ajout de dendrons à chaque étape. Les ATG montrent la même tendance. Cependant, le rapport après l'échange de ligands EL3 est très supérieur ( $> 0,12$ ) comparativement à ceux calculés pour les suspensions de NPSc@ANA : après la purification complète des suspensions de NPSc@ANA, le rapport phosphore/fer des suspensions est proche de 0,008 lorsque le taux de greffage est maximum. Cette comparaison montre qu'il y a encore un fort excès de dendrons libres en suspension ou faiblement liés aux nanoparticules. Les ATG montrent également les mêmes résultats avec des pertes de masse calculées supérieures à 30% ce qui est très grand comparativement à celles obtenues sur les NPSc@ANA qui sont inférieures à 15 % et pour lesquelles des taux de greffage proches du taux de greffage théorique maximal ont été obtenus.

Après le transfert de phase (TR), le rapport phosphore/fer des suspensions a diminué avec les étapes d'ultrafiltration (UF1 et UF2). Il y a donc une forte perte de dendrons sûrement parce qu'ils sont faiblement liés aux nanoparticules ou libres en suspension. Le rapport à la fin des étapes d'ultrafiltration reste très élevé ( $> 0,02$ ) comparativement à ceux calculés pour les suspensions de NPSc@ANA.

Nous pouvons donc conclure qu'il y avait un grand nombre de dendrons physisorbés ou libres aux différents stades de l'expérience et que les étapes de purifications n'étaient pas complètes.

### C. Bilan

---

Cette première approche a permis de montrer que l'échange de ligands était réalisable avec nos dendrons puisque des suspensions dans l'eau ont pu être obtenues. Cependant, les suspensions après transfert dans l'eau présentent des distributions de taille avec des tailles moyennes élevées qui ne sont pas adaptées pour une utilisation dans le domaine biomédical.

Des analyses infrarouges, élémentaires et thermogravimétriques ont été réalisées et ont montré que la purification des nanoparticules n'était pas complète. Le transfert et la stabilité des nanoparticules seraient favorisés par la présence d'excès de dendrons. C'est pour cette raison que la stabilité des NPStd@ANA s'est écroulée après les dernières purifications. Les résultats obtenus ont permis de conclure que le greffage de nos dendrons par échange de ligands n'est pas facile, car des molécules d'acide oléique sont encore présentes après la dernière étape d'échange de ligands. L'affinité du groupement phosphonate pour le fer n'a pas suffi à elle seule pour induire un échange de ligands total dans un temps relativement court. Une autre approche a été alors envisagée.

## 2.2 Procédé d'échange de ligands avec transfert de phase

---

La méthode d'échange direct de ligands dans le THF s'étant avérée complexe (plusieurs étapes d'échange de ligands et ensuite un transfert dans l'eau) et n'ayant pas conduit à des suspensions présentant une taille moyenne inférieure à 100 nm, une autre approche a été développée pour fonctionnaliser les NPStd@OA avec les dendrons. L'échange de ligands est mené dans un milieu biphasique par un procédé d'échange de ligands avec transfert de phase<sup>333</sup> : les nanoparticules synthétisées par décomposition thermique sont transférées directement d'une suspension d'hexane vers une suspension aqueuse contenant les dendrons.

Le protocole développé par V. C. Pierre et al.<sup>333</sup> est le suivant :

- les NPStd@OA sont dispersées dans de l'hexane qui est un solvant très apolaire : les molécules d'acide oléique sont très solubles dans ce solvant et donc susceptibles de se désorber facilement ;
- du méthanol est ajouté dans la phase aqueuse pour augmenter la polarité pour améliorer ainsi la solubilité des molécules hydrophiles dans la phase aqueuse et éviter le transfert des molécules d'acide oléique dans la phase aqueuse ;
- le pH de la phase aqueuse est ajusté à 4 ce qui permet d'activer les agents de couplage des molécules tout en limitant le transfert éventuel des molécules d'acide oléique.

La possibilité d'ajuster le pH de la phase aqueuse est très intéressante pour le greffage de nos dendrons car nous avons vu que c'est le paramètre qui conditionne les attractions entre les dendrons chargés et la surface des nanoparticules.

## 2.2.1 Transfert de phase des NPStd@OA avec les trois dendrons

### A. Le protocole (méthode TR)

Le protocole du procédé d'échange de ligands avec transfert de phase que nous avons utilisé est détaillé ci-dessous. Nous avons pu remarquer que le pH de la phase aqueuse contenant les dendrons, a été un paramètre clé pour la réussite des greffages des différentes molécules, comme nous l'avons déjà noté lors de l'étude du greffage des dendrons à la surface des nanoparticules synthétisées par co-précipitation. Le protocole est le suivant :

- 5 mL d'eau ultrapure et 2 mL de méthanol sont mélangés dans un petit flacon ;
- la quantité de dendrons suffisante pour atteindre une concentration supérieure à 1,5 mM/L est dissoute dans le mélange ;
- le pH du mélange est mesuré et réajusté à un pH (pHréa) dont la valeur dépend de la nature du dendron greffé ;
- 10 mL d'une suspension de NPStd@OA dispersées dans l'hexane (concentration de 1 mg de nanoparticules/mL) sont mis en contact avec la suspension aqueuse contenant les dendrons à greffer (photo de gauche, Figure 98) ;
- les deux suspensions sont agitées magnétiquement pendant une durée minimale de quatre heures ;
- lorsque le transfert de phase s'est effectué (photo du centre, Figure 98), le barreau aimanté est retiré puis la phase aqueuse est lavée six fois avec 10 mL d'hexane (cycle extraction → ajout → agitation) ;
- la phase aqueuse contenant les nanoparticules dendronisées est récupérée et lyophilisée durant une nuit ;
- les nanoparticules dendronisées sont redispersées dans 10-20 mL d'eaux ultrapures. La suspension est purifiée 6 fois par ultrafiltration ;
- le pH de la suspension est réajusté à une valeur proche de 7,4 (pHréa/fin).

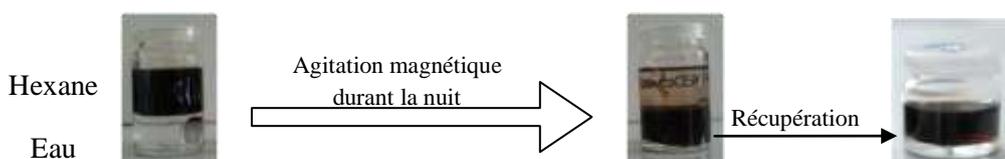


Figure 98 : photos des échantillons au début (à gauche) et à la fin (au centre) du transfert de phase. Photo de la suspension de NPStd@ANA après la lyophilisation et la purification (à droite).

Les suspensions ainsi obtenues sont conservées dans des piluliers sous argon. Les nanoparticules greffées avec les dendrons ANACOOH et ANANH2 sont nommées **NPStd@ANACOOH** et **NPStd@ANANH2** respectivement. Le Tableau 27 récapitule les expériences :

*Tableau 27 : récapitulatif des expériences.*

Non de l'échantillon	Concentration de dendrons dans la phase aqueuse $\pm 0,1$ mM/L	pHréa $\pm 0,1$	pHréa/fin $\pm 0,1$
NPStd@ANA	2,35	5,2	7,6
NPStd@ANACOOH	1,95	3,5	7,4
NPStd@ANANH2	1,95	5,9	7,6

La stabilité et la concentration des suspensions obtenues par transfert de phase sont très bonnes dans le temps et sous champ magnétique pour les NPStd@ANA et les NPStd@ANACOOH, elle est très mauvaise pour les NPStd@ANANH2 pour lesquelles une sédimentation très élevée est observée dans le temps.

### **Taux de greffage**

Des analyses élémentaires ont été réalisées pour évaluer les taux de greffage.

*Tableau 28 : résultats des analyses élémentaires*

Non de l'échantillon	Taux de fer $\pm 4$ mg/Kg	Taux de phosphore $\pm 0,1$ mg/Kg	Masse NPSCO $\pm 0,05$ mg	Surface des NPSCO en $\text{nm}^2$	Nombre de dendrons greffés	Taux de greffage $\pm 0,1$ Molécule/ $\text{nm}^2$
NPStd@ANA	330	3,1	0,457	$4,51896 \times 10^{19}$	$6,02705 \times 10^{19}$	1,33
NPStd@ANACOOH	364	2,7	0,504	$4,98455 \times 10^{19}$	$5,28825 \times 10^{19}$	1,06
NPStd@ANANH2	290	1	0,401	$3,97121 \times 10^{19}$	$1,94421 \times 10^{19}$	0,49

Les taux de greffage des dendrons à la surface des NPStd@ANA et NPStd@ANACOOH sont similaires à ceux obtenus avec les nanoparticules synthétisées par co-précipitation. Un taux de greffage proche du taux de greffage maximal est obtenu avec les dendrons ANA et un taux plus faible avec le dendron ANACOOH qui est légèrement plus volumineux.

Les taux de greffage du dendron ANANH2 est beaucoup trop faible que celui obtenu avec les nanoparticules synthétisées par co-précipitation NPSCO (0,8). Ce résultat explique la forte sédimentation de la suspension. Nous avons vu lors des greffages sur les NPSCO que le greffage des dendrons ANANH2 est plus délicat et demande à être réalisé à des pH qui ne favorisent pas les attractions électrostatiques. Les conditions de greffage de ce dendron ne semblent donc ne pas être réalisables par des méthodes comme le transfert de phase, car les nanoparticules n'étant pas nues, l'adsorption du dendron est difficile. Ainsi, une autre approche devra être développée pour améliorer la qualité des suspensions de NPStd@ANANH2.

Dans la suite de ce manuscrit, seules les caractérisations des nanoparticules dendronisées NPStd@ANA et NPStd@ANACOOH seront présentées.

## **B. Stabilité colloïdale des suspensions de nanoparticules dendronisées NPStd@ANA et NPStd@ANACOOH**

La stabilité des suspensions de NPStd@ANA et NPStd@ANACOOH a été évaluée par des mesures granulométriques dans l'eau et des mesures de potentiel zêta (Figure 99).

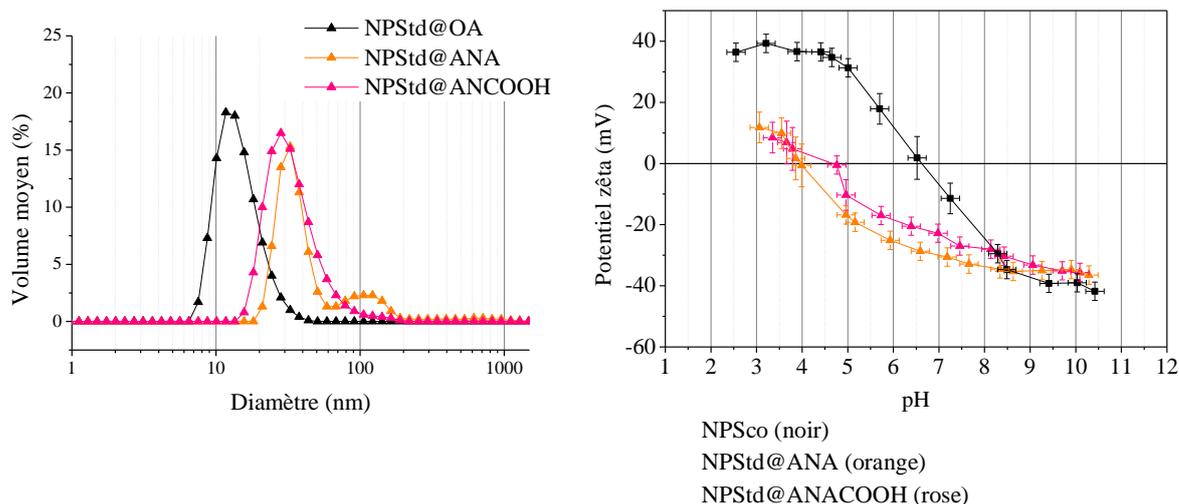


Figure 99 : distributions en taille des suspensions aqueuses de NPS@d@ANA et des NPS@d@ANACOOH à pH = 7 (à gauche) et courbes de l'évolution de leur potentiel zêta en fonction du pH (à droite).

Les mesures de distribution présentées dans la figure 92 montrent que la distribution de taille des suspensions de nanoparticules dendronisées reste quasi monomodale, mais le diamètre hydrodynamique moyen augmente après le transfert de phase. Il est centré sur 30 nm pour les deux suspensions de nanoparticules dendronisées. Le procédé d'échange de ligands avec transfert de phase n'a pas permis de conserver la distribution de taille initiale des NPS@d@OA. Cette observation est souvent faite dans la littérature. En effet, des agrégats peuvent se former durant le transfert lorsque les nanoparticules sont en partie recouvertes de molécules d'acide oléique et de la molécule hydrophile : elles deviennent alors instables dans les deux solvants. Ces distributions de taille sont cependant « meilleures » que celle obtenues avec les suspensions de nanoparticules obtenues par co-précipitation et dendronisées (centrées sur 50 nm). Ces expériences confirment l'importance de la dispersion des nanoparticules avant l'étape de greffage.

Les courbes d'évolution du potentiel zêta en fonction du pH sont similaires à celles obtenues avec les suspensions des nanoparticules synthétisées par co-précipitation et dendronisées NPSco@ANA et NPSco@ANACOOH (Tableau 32, page 151). Ainsi, les points isoélectriques PIE des nanoparticules dendronisées se sont déplacés vers les pH acides, il est à pH = 4 pour les NPS@d@ANA et à pH = 5 pour les NPS@d@ANACOOH.

### C. Caractérisations de surface des nanoparticules dendronisées NPS@d@ANA et NPS@d@ANACOOH

#### *MET*

Des NPS@d@ANA ont été déposées sur des grilles dont les membranes sont percées de trous microscopiques (Figure 100)

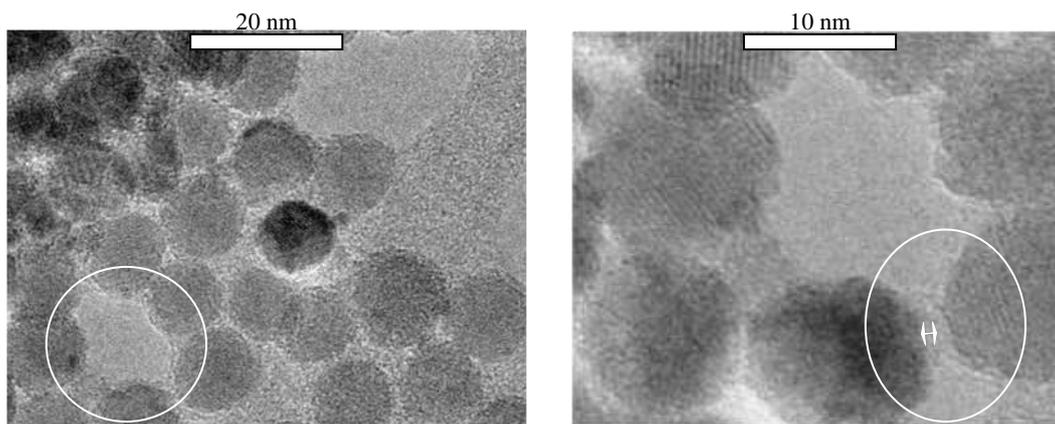


Figure 100 : micrographies MET des NPStd@ANA.

Les micrographies des nanoparticules dendronisées dévoilent la présence d'une couche de très faible densité électronique autour des nanoparticules. L'absence de membrane sous les nanoparticules dans la zone encerclée en blanc nous permet de conclure qu'il s'agit d'une couche organique d'une épaisseur de 2 - 3 nm (présence confirmée par les analyses infrarouges et des ATG).

Nous remarquons également que les nanoparticules sont relativement agglomérées malgré la présence de cette couche organique, mais comparativement, elles sont mieux dispersées que les NPSCO@ANA. Cette observation rejoint celle des mesures de distribution de taille qui révélaient que les nano-objets en suspensions étaient composés de plusieurs nanoparticules. L'épaisseur de la couche organique ne suffit pas donc à disperser individuellement les NPStd. Les nanoparticules sont cependant toujours bien cristallisées car leurs plans atomiques sont toujours visibles.

#### Analyse thermogravimétrique sous air

Des ATG ont été réalisées sur une poudre de NPStd@ANA, elles sont présentées dans la Figure 101.

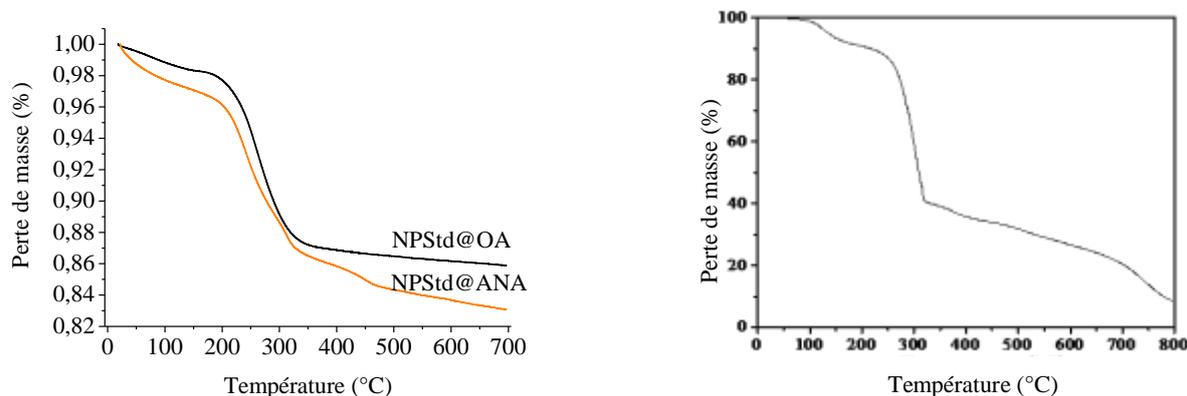


Figure 101 : courbes ATG des NPStd@ANA (à gauche) et du dendron ANA (à droite).

Les courbes ATG des nanoparticules dendronisées confirment la présence du dendrons ANA à la surface des nanoparticules. Les pertes de masses sont beaucoup plus importantes sur les NPStd@ANA (17 %) que sur les NPStd@OA (14 %). Le dendron ANA ayant une masse molaire plus grande (790 g/mol) que celle des molécules d'acide oléique (248 g/mol), l'augmentation de la perte de masse après l'échange de ligands se justifie par le taux de greffage qui est maximum.

L'évolution des courbes montre une perte de masse dès le début de la montée en température, attribuée à l'élimination de l'eau physisorbée. A partir de 180 °C, la perte de masse observée résulte de la décomposition du dendron ANA. Cette décomposition est d'abord rapide, entre 200 °C et 300 °C (perte de masse brusque) puis plus lente entre 300 °C et 700 °C (perte de masse légère). Le dendron après greffage se décompose donc dans la même gamme de température que le dendron seul. La seule différence est que nous n'observons pas la décomposition de la partie phosphonate ce qui confirme son greffage à la surface des nanoparticules.

Nous remarquons cependant que la prise de masse observée sur NPStd@OA, lié à l'oxydation de  $Fe^{2+}$  et marqué sur la courbe par un léger plateau vers 200 °C, n'est pas visible sur les NPStd@ANA (voir chapitre II, 1.2.2). Cette observation suggère que les nanoparticules sont plus oxydées après la réaction de greffage.

### *Spectroscopie infrarouge*

Les spectres IR des nanoparticules greffées avec les dendrons sont donnés dans les figures suivantes.

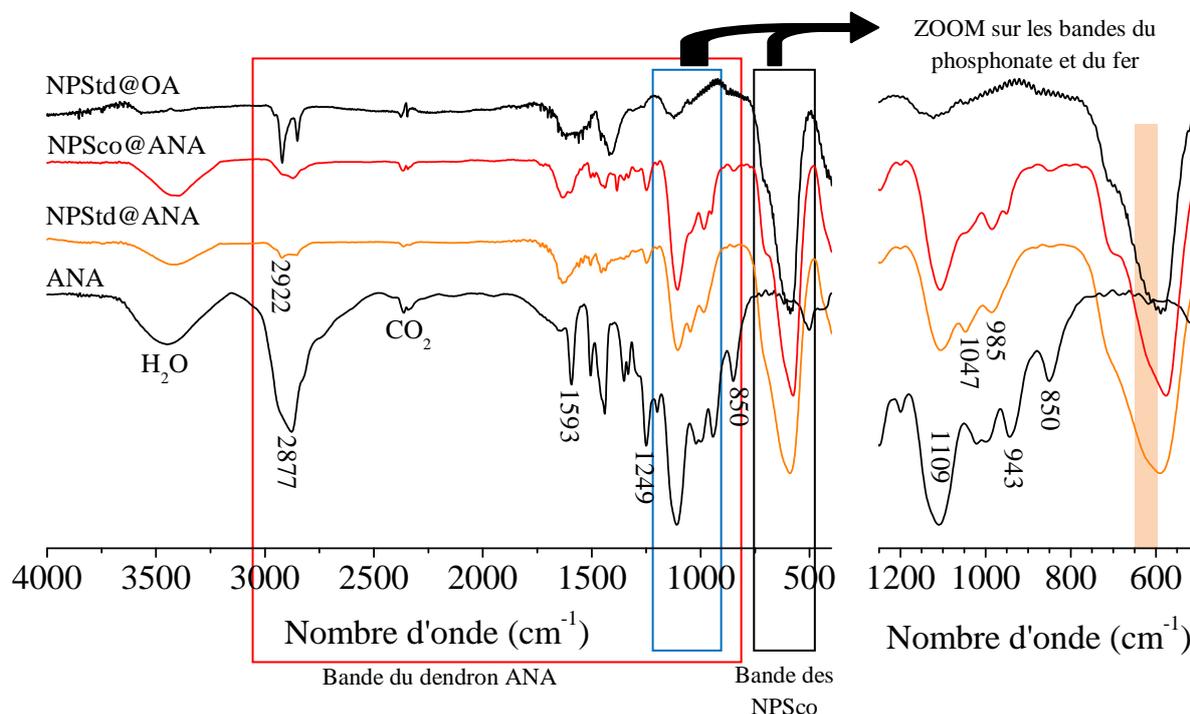


Figure 102 : spectres infrarouges des NPStd@OA, NPStd@ANA, des NPSCO@ANA et du dendron ANA.

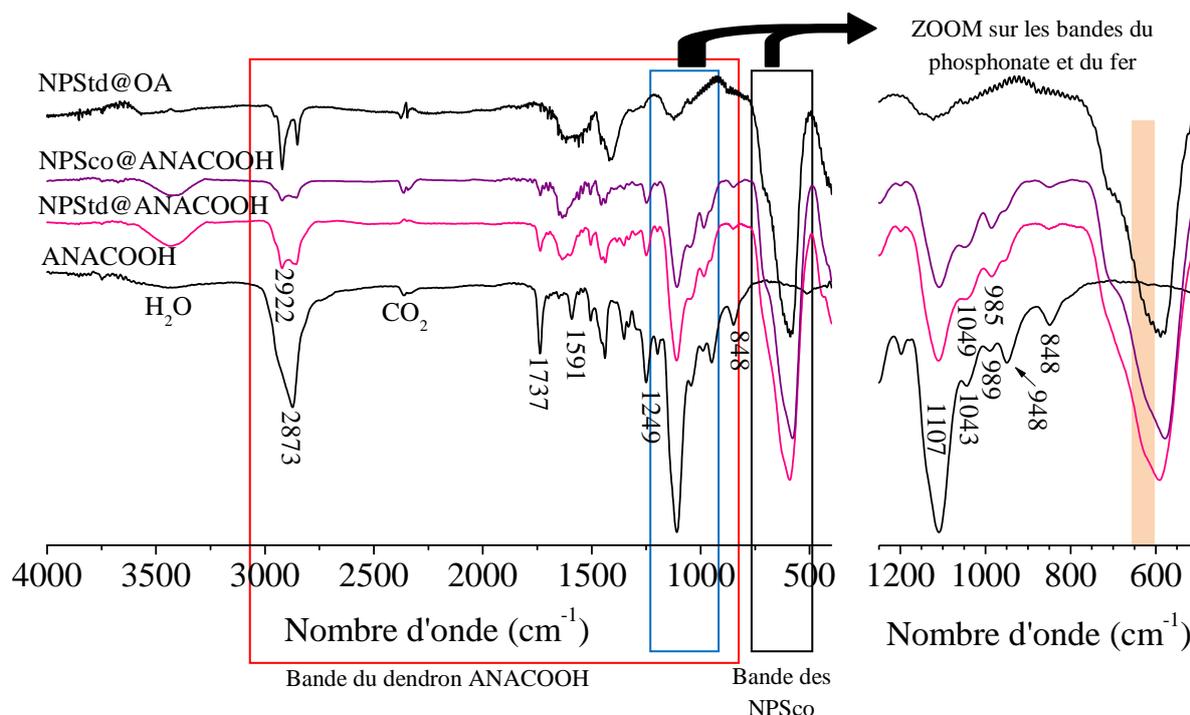


Figure 103 : spectres infrarouges des NPSd@OA, des NPSco@ANACOOH, NPSd@ANACOOH et du dendron ANACOOH.

Les spectres IR des NPSd@ANA et des NPSd@ANACOOH confirment le greffage des deux dendrons à la surface des nanoparticules. Nous retrouvons ainsi les bandes caractéristiques des dendrons et en particulier la bande à  $1737\text{ cm}^{-1}$  marquant la présence du groupement carboxylate pour les NPSd@ANACOOH. Un épaulement à  $2922\text{ cm}^{-1}$  pourrait révéler la présence de trace de molécules d'acide oléique, mais cet épaulement était déjà présent sur les spectres des NPSco@ANA et NPSco@ANACOOH, donc nous pouvons considérer qu'il n'y a pas de molécules d'acide oléique à la surface des nanoparticules.

Sur les zooms des bandes phosphonates, nous voyons que le profil des bandes des NPSd@ANA est différent de celui des NPSco@ANA. En effet, contrairement au spectre des NPSco@ANA, une bande située à  $1047\text{ cm}^{-1}$  est visible et suggère que seule une liaison P–O est engagée dans le complexe de surface avec le fer. Cette observation montrerait que le mode de greffage est différent, mais il faut encore multiplier les expériences pour confirmer cette tendance, car il n'en est pas de même pour les NPSd@ANACOOH. Dans les deux cas, nous observons une disparition de la bande de la liaison P=O comme pour les NPSco dendronisées, sans pouvoir vérifier si elle a été décalée et donc conclure qu'une liaison s'est formée. La disparition de bandes caractéristiques des liaisons P–OH est également observée comme dans le cas des nanoparticules synthétisées par co-précipitation et dendronisées. La bande localisée à  $985\text{ cm}^{-1}$  contient sûrement une contribution des liaisons P–O–Fe.

Sur les zooms des bandes de l'oxyde de fer (entre  $750$  et  $500\text{ cm}^{-1}$ ), nous voyons qu'elles n'ont pas beaucoup évolué. L'allure de ces bandes montre que les nanoparticules ont toujours une structure de magnétite sous-stœchiométrique. Cependant, l'épaulement surligné en orange (entre  $650$  et  $600\text{ cm}^{-1}$ ), qui marque la présence de la maghémite (voir chapitre II, 1.2.2), est plus prononcé sur les nanoparticules dendronisées ce qui suggère qu'elles se sont légèrement oxydées lors de la réaction du greffage. Cet épaulement, qui est très marqué avec les NPSd@ANA, concorde avec les observations faites suite à l'analyse des courbes ATG de ces dernières.

En conclusion, les spectres IR des NPStd@ANA et NPStd@ANACOOH confirment la réussite du greffage des dendrons à la surface des nanoparticules, leurs analyses suggèrent que le complexe de surface avec le fer est au moins bi-nucléaire et qu'elles ont été légèrement oxydées lors du processus de greffage.

### *Photoémission X*

Des analyses XPS ont été réalisées sur les NPStd@OA et NPStd@ANA. Les conditions d'analyses XPS sont identiques à celles présentées précédemment pour les nanoparticules co-précipitées. Les principaux spectres sont présentés sur la Figure 104 et la Figure 105 et l'ensemble des résultats est reporté dans le Tableau 29.

Le spectre C1s des NPStd@OA présente une composante principale à 285 eV caractéristique des liaisons C–C et une composante de très faible intensité à plus haute énergie de liaison caractéristique de liaisons C=O (288,4 eV). Ces environnements du carbone sont cohérents avec la formule de la molécule d'acide oléique qui recouvre les nanoparticules d'oxyde de fer. Le spectre C1s des NPStd@ANA présentent des caractéristiques semblables avec néanmoins une composante supplémentaire localisée à 286,5 eV (liaisons C–O).

Les pics O1s de l'oxygène des NPStd@OA et des NPStd@ANA présentent respectivement deux et trois composantes. Pour les nanoparticules non dendronisées, deux environnements sont détectés correspondant à des atomes d'oxygène liés aux atomes de fer et à des hydroxydes. Pour les nanoparticules dendronisées, les environnements Fe–O (composante localisée à 530,5 eV) et P=O, P–OH, Fe–O–P (composantes à 531,5 et 532,2 eV) sont identifiés.

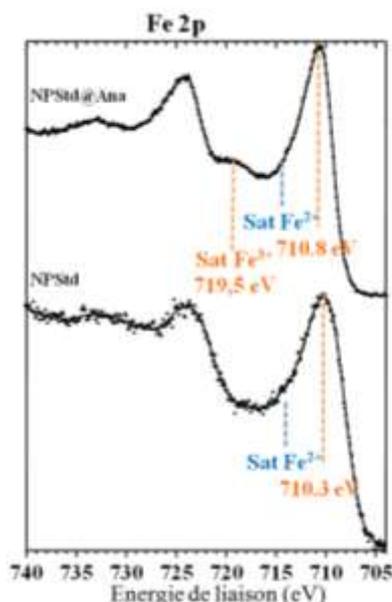


Figure 104 : spectres XPS des pics de cœur Fe2p des NPStd@OA et NPStd@ANA.

Les pics de cœur du fer 2p<sub>3/2</sub> - 1/2 des NPStd@OA et des NPStd@ANA sont présentés sur la Figure 104. Le spectre des NPStd@OA est caractéristique de la magnétite avec la présence simultanée des deux degrés d'oxydation +2 et +3 et l'absence de pic satellite individualisé. Pour les nanoparticules greffées, les deux degrés d'oxydation du fer sont également présents, mais la proportion de Fe<sup>3+</sup> est plus importante que pour NPStd@OA, le satellite correspondant étant

clairement observable. Ainsi, il semble que l'on observe une légère oxydation lors de la réaction du greffage, mais que cette oxydation est stable et n'évolue plus dans le temps, les analyses étant reprises trois semaines après sans modification notable.

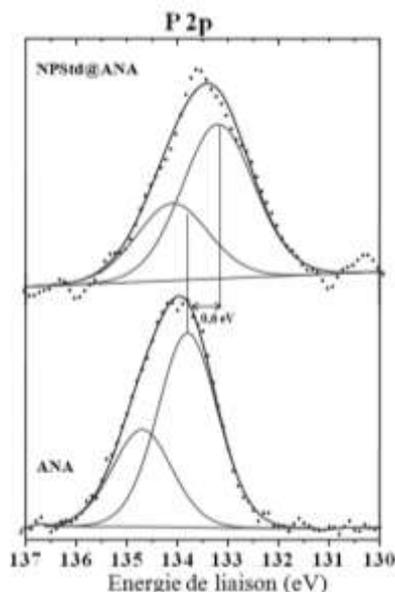


Figure 105 : Spectres XPS des pics de cœur P2p des NPStd@ANA et du dendron ANA.

Les pics de cœur P2p 3/2 - 1/2 de NPStd@ANA et du dendron ANA sont présentés sur la Figure 105. Pour les NPStd@ANA, l'énergie de liaison des deux composantes est de 133,2 - 134,1 eV. Nous observons donc un déplacement vers les basses énergies de liaison du pic de cœur P2p des NPStd@ANA par rapport à la molécule seule (0,6 eV), caractéristique de la formation de liaisons P-O-Fe. Ce déplacement est néanmoins moins important que celui observé pour les NPSCO@ANA (1,3 eV). Si nous devons envisager un mode d'interaction des phosphonates avec les oxydes métalliques, nous pouvons supposer que ces interactions sont du type bi ou tri-nucléaire. Sur la seule base des analyses XPS, les interactions tri-nucléaires seraient plutôt réservées aux nanoparticules synthétisées par co-précipitation et les interactions de type bi-nucléaires aux nanoparticules synthétisées par décomposition thermique.

Tableau 29 : Energie de liaison, largeur à mi-hauteur et % atomique des pics de cœur Fe2p, O1s, C1s et P2p pour les NPStd, le dendron ANA et les NPStd@ANA. (Pour le pic du fer, ne sont reportés que les composantes 3/2 du Fe<sup>3+</sup> et les positions des satellites de Fe<sup>2+</sup> et Fe<sup>3+</sup>; pour la quantification, l'ensemble du spectre (pics principaux + pics satellites) a évidemment été considéré).

	NPStd			ANA			NPStd@ANA					
	E <sub>L</sub> (eV)	Largeur à mi-hauteur	%	E <sub>L</sub> (eV)	Largeur à mi-hauteur	%	E <sub>L</sub> (eV)	Largeur à mi-hauteur	%			
Fe <sup>3+</sup> 2p 3/2	710,3						710,8					
Sat Fe <sup>3+</sup> 3/2			2,1				719,5		10,3			
Sat Fe <sup>2+</sup> 3/2	714,6						714,2					
O 1s	530,2	2	5,5	531,9	1,5	30	530,5	1,8	26,3			
	531,7	2	5,5				531,5	1,8	5,6			
							532,2	1,8	10,0			
C 1s	285,0	2,0	83,0	285,0	1,1	42,7	285	2,0	33,5			
							286,5	1,2	25,3	286,7	2,4	11,5
	288,4	2,0	3,0							28,6	2,1	1,8
P 2p				133,8 - 134,7	1,4	2	133,2 / 134,1	1,7	1			

Les résultats des analyses XPS concordent donc avec les observations faites à partir de l'analyse des spectres IR : une oxydation des nanoparticules est observée après greffage, mais les nanoparticules dendronisées deviennent moins sensibles à l'oxydation dans le temps ; le dendron ANA s'est greffé via le groupement phosphonate et a formé avec la surface des nanoparticules un complexe au moins bi-nucléaire. Cependant, nous remarquerons que ces analyses tendent à montrer, comme les spectres IR, que le complexe de surface des NPStd@ANA serait différent de celui des NPSCO@ANA: il serait plutôt d'ordre bi-nucléaire.

#### D. Analyse structurale des nanoparticules dendronisées

La composition des nanoparticules a été analysée par diffraction des RX et par spectrométrie Mössbauer, en complément des mesures XPS.

##### *Diffraction des RX*

Le diffractogramme RX des NPStd@ANA a été réalisé à température ambiante et est comparé à celui des nanoparticules non greffées dans la Figure 106.

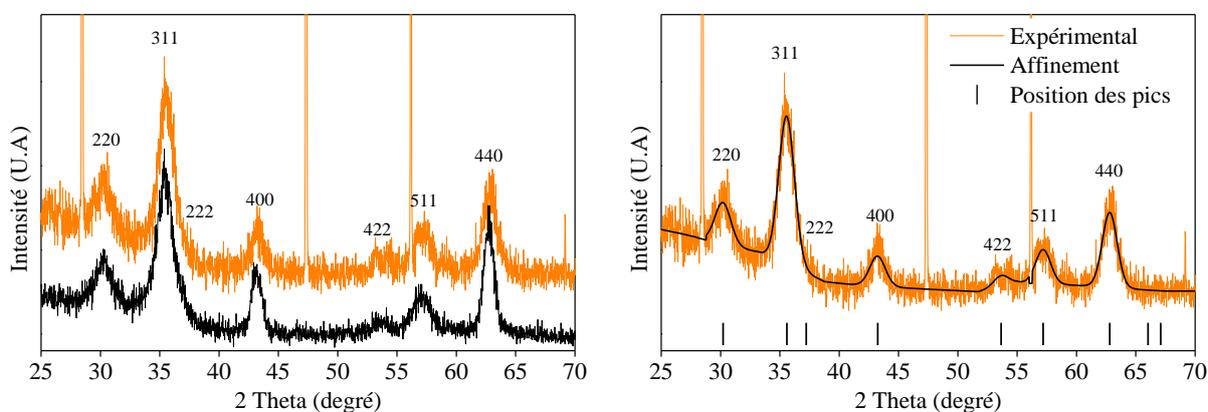


Figure 106 : diffractogrammes RX des NPSCO (en noir) et des NPSCO@ANA (en orange) à gauche et affinement des NPSCO@ANA à droite.

En comparant le diffractogramme RX des NPStd@ANA à celui des NPStd@OA, nous pouvons constater qu'ils sont similaires. Les pics de diffraction peuvent être attribués à la structure spinelle, indiquant que les échantillons ne contiennent ni de l'hématite ( $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ) ni des hydroxydes de fer. Nous remarquons sur le diffractogramme RX des NPSCO@ANA un épaulement au bas angle typique de la présence de matière organique dans l'échantillon.

Le paramètre de maille des NPStd@ANA a été déterminé à l'aide du programme Fullprof par la méthode de Le Bail. Il est de  $0,8367 \pm 0,0004$  nm ce qui indique que les nanoparticules se sont oxydées durant la réaction de greffage, car cette valeur est inférieure à celle des NPStd@OA de départ ( $0,8381 \pm 0,0004$  nm). Cette observation concorde avec les précédentes analyses (spectres IR, XPS, et courbes ATG). Le paramètre de maille des NPStd@ANA est compris entre celui de la maghémite ( $0,8346$  nm) et celui de la magnétite ( $0,8396$  nm). Les nanoparticules dendronisées auraient donc une structure de magnétite sous-stœchiométrique.

##### *Spectrométrie Mössbauer*

Des spectres Mössbauer à 300 et 77K ont été enregistrés sur un échantillon NPStd@ANA (Figure 107).

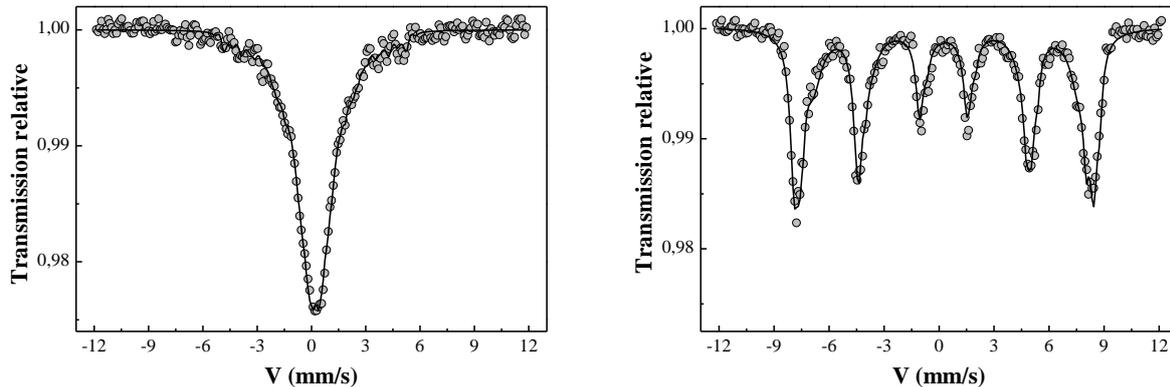


Figure 107 : spectres Mössbauer des NPStd@ANA de 9 nm à 300 K (à gauche) et 77 K (à droite).

Le spectre à 300 K (Figure 107, gauche) présente également comme pour les NPStd@OA une structure hyperfine avec une seule raie large caractéristique de la présence d'effets de relaxation superparamagnétique provenant de nanoparticules sans interactions, donc isolées. Un ajustement à partir d'une lorentzienne (Tableau 30) permet d'estimer la valeur moyenne du déplacement isomérique à  $0,38 \pm 0,01$  mm/s et une composition de  $\text{Fe}_{2,74}\text{O}_4$  équivalent à 80(5) % de maghémite et 20(5) % de magnétite dans l'hypothèse d'un modèle cœur-coquille (magnétite-maghémite) de phases stœchiométriques avec une épaisseur de 1,9(2) nm de maghémite. Ces résultats montrent une oxydation importante des nanoparticules après l'étape de fonctionnalisation.

A partir du spectre à 77 K (Figure 107, droite) les résultats obtenus conduisent à une composition moyenne des NPStd@ANA de  $\text{Fe}_{2,74}\text{O}_4$ , identique à celle estimée à 300K et donc la même épaisseur.

Les paramètres issus de l'ajustement des spectres sont donnés dans le Tableau 30

Tableau 30 : paramètres Mössbauer des NPStd@ANA déduits des spectres Mössbauer à 300 K et 77 K.

Température	Déplacement isomérique ( $\text{mms}^{-1}$ )	Séparation quadripolaire ( $\text{mms}^{-1}$ )	Champ hyperfin (T)	Composition
300 K	$0,38 \pm 0,01$	$0 \pm 0,01$	-	$\text{Fe}_{2,74}\text{O}_4$
77 K	$0,48 \pm 0,01$	$0 \pm 0,01$	$46,8 \pm 0,5$	$\text{Fe}_{2,74}\text{O}_4$

La composition des nanoparticules de 12 nm NPStd@OA déterminée par spectrométrie Mössbauer est  $\text{Fe}_{2,77}\text{O}_4$ , soit une proportion de 70% de maghémite (et 30% de magnétite). Après greffage, la fraction de maghémite au sein des nanoparticules a augmenté (80%) confirmant une fois de plus l'oxydation des nanoparticules après l'étape de greffage.

## E. Analyse des propriétés magnétiques des nanoparticules dendronisées

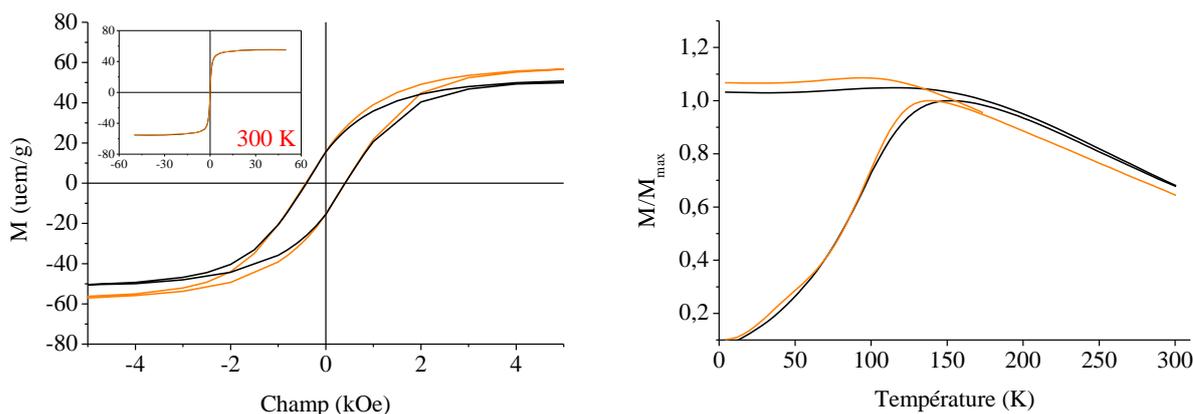


Figure 108 : cycle d'aimantation (à gauche) et courbe ZFC/FC (à droite) des NPStd@OA (en noir) et des NPStd@ANA (en orange).

Les courbes ZFC/FC, présentées dans la Figure 108 sont caractéristiques de nanoparticules superparamagnétiques : la température maximale de la courbe ZFC peut être assimilée à la température de blocage des nanoparticules. Cette température est légèrement décalée vers de plus faible valeur ( $130\text{ K}$ ) après greffage du dendron. Ce décalage peut être attribué à une modification de la constante d'anisotropie magnétocristalline effective des nanoparticules ou à une diminution des interactions dipolaires suite à l'étape de greffage. Des mesures magnétiques complémentaires sont nécessaires pour pouvoir conclure.

La comparaison des cycles d'aimantation des nanoparticules initiales NPStd@OA et des nanoparticules dendronisées NPStd@ANA montre que les nanoparticules ont conservé leurs propriétés magnétiques aussi bien à  $300\text{ K}$  qu'à  $5\text{ K}$  : elles ont un comportement superparamagnétique à température ambiante et il y a ouverture du cycle à  $5\text{ K}$ , car leur comportement ferrimagnétique en dessous de la température de blocage. L'aimantation à saturation à température ambiante des NPStd@ANA est similaire à celle des NPStd@OA à  $300\text{ K}$  ( $54\text{ uem/g}$ ).

Des spectres Mössbauer ont été enregistrés à  $10\text{ K}$  sous un champ appliqué de  $8\text{ T}$  orienté parallèlement à la direction du rayonnement  $\gamma$  (Figure 109).

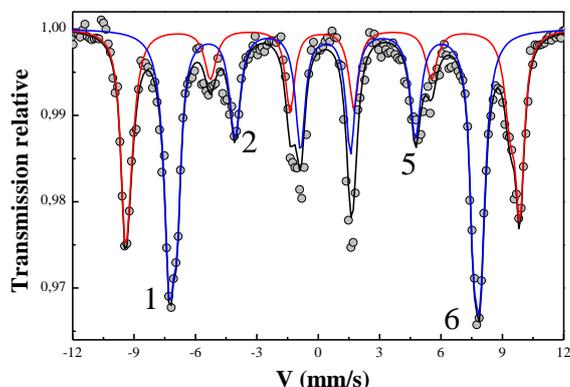


Figure 109 : spectre Mössbauer des NPStd@ANA de  $9\text{ nm}$  à  $10\text{ K}$  et sous un champ de  $8\text{ T}$ .

L'étude sous champ magnétique à  $10\text{ K}$  (Figure 109) conduit à estimer l'angle moyen de « canting » des moments de Fe à  $34(5)$  et  $39(5)^\circ$ , respectivement pour les sites tétraédriques et

octaédriques, soit des épaisseurs de 0,7(1) et 0,9(1) nm et donc une épaisseur moyenne de la couche cantée de 0,8(1) nm. Quant à la répartition en sites tétraédriques/octaédriques, la valeur de 39:61 est en bon accord avec celle de la phase maghémite, fortement majoritaire. Nous rappelons que pour les NPStd@AO de 9 nm, l'angle moyen de « canting » des moments du fer était de l'ordre de 30 - 35° spin pour les sites tétraédriques et octaédriques (épaisseur de la couche cantée de 0,7(1) nm). L'analyse des résultats en terme de proportions sites tétraédriques/octaédriques 41:59 avait montré un léger excès de Fe en site tétraédriques.

Nous pouvons donc constater que l'angle moyen de canting est légèrement plus grand après cette étape de greffage et que la répartition en sites tétraédriques/octaédriques est plus conforme à de la phase maghémite. Ces observations peuvent expliquer l'évolution de l'aimantation à saturation des nanoparticules avant et après greffage. Le greffage de la molécule via le groupement phosphonate n'a donc pas conduit à une diminution de ce « canting » comme cela avait été observé dans des études antérieures sur des nanoparticules issues de la co-précipitation et fonctionnalisées par une molécule via un groupement phosphonate<sup>162</sup>, à moins que l'épaisseur de cette couche cantée n'ait augmentée au cours du greffage.

## F. Bilan

---

Le greffage des dendrons par le procédé d'échange de ligands et transfert de phase a bien fonctionné avec les dendrons ANA et ANACOOH. Les suspensions obtenues sont concentrées et la distribution de taille des nanoparticules dendronisées est centrée sur 30 nm. Ce protocole avec les nanoparticules synthétisées par décomposition thermique a donc permis d'obtenir des suspensions avec des distributions de taille inférieures à celle obtenues avec les nanoparticules synthétisées par co-précipitation et dendronisées (50 nm). Les travaux avec le dendron ANANH2 sont encore en cours car les suspensions obtenues ne sont pas encore exploitables dans le domaine biomédical.

Le greffage des dendrons ANA et ANACOOH a été confirmé par différentes techniques de caractérisation. La concordance des résultats obtenus avec les NPSCO@ANA et avec les NPStd@OA montre que le greffage de ces deux dendrons sur les nanoparticules d'oxyde de fer permet d'atteindre des propriétés reproductibles.

## **2.3 Application de ce protocole d'échange de ligands et transfert de phase aux nanoparticules synthétisées par co-précipitation**

---

Suite aux résultats des travaux précédents, une telle approche a été envisagée pour greffer les dendrons à la surface des nanoparticules synthétisées par co-précipitation NPSCO. En effet, il est possible de recouvrir les NPSCO avec des molécules d'acide oléique et de les redisperser dans un solvant organique pour obtenir des suspensions stables avec une distribution de taille inférieure à 50 nm (NPSCO@OA)<sup>334 335</sup>. Ensuite une procédure d'échange de ligands avec transfert de phase peut être appliquée à ces suspensions et devrait permettre d'obtenir des suspensions avec des distributions en taille inférieures à celles obtenues jusque maintenant.

### 2.3.1 Le protocole

---

#### A. Le greffage des molécules d'acide oléique à la surface des nanoparticules synthétisées par co-précipitation (NPSco)

---

Les NPSco ont donc été recouvertes par des molécules d'acide oléique pour améliorer leur dispersion avant le greffage. Les molécules d'acide oléique sont greffées sur les nanoparticules directement dans le milieu aqueux à des pH très basiques. En effet, l'acide oléique n'est soluble dans l'eau qu'à des pH supérieurs à 10. Lorsque le pH redevient acide, la surface des nanoparticules devient chargée positivement et les groupements carboxylates chargés négativement des molécules d'acide oléique entrent en interaction avec la surface des nanoparticules. Sachant que le pH du milieu réactionnel des NPSco à la fin de leur réaction est supérieur à 10, le protocole développé est le suivant :

- 5 mL des nanoparticules synthétisées par co-précipitation sont introduites dans un tricol contenant 10 mL d'eau ultrapure désoxygénée ;
- le mélange est plongé 30 secondes dans un bain à ultra-sons ;
- le montage est le même que celui employé pour la co-précipitation et est sous flux. Le mélange subit un cycle vide argon avant d'être agité (mécaniquement) vigoureusement ;
- durant l'agitation, 600  $\mu$ L d'acide oléique (en excès) sont ajoutés par tranches de 100  $\mu$ L. L'aspect et le pH du mélange sont surveillés à chaque ajout : le mélange doit rester liquide et le pH supérieur à 10. A la fin des ajouts, le pH se stabilise vers 9,5-10 ;
- le nouveau mélange est laissé 30 minutes sous agitation mécanique sous flux d'argon ;
- au bout de 30 minutes, 50  $\mu$ L d'acide chlorhydrique (HCl 37% dilué 5 fois) est ajouté goutte à goutte pour abaisser le pH à un pH = 4. L'acide oléique en se greffant à la surface des nanoparticules provoque la précipitation des nanoparticules au fond du tricol. Les nanoparticules devenues hydrophobes suite au greffage de l'acide oléique ne sont donc plus solubles dans l'eau ;
- le précipité est lavé 3 fois avec 15 mL d'eau par extraction ajout ;
- le précipité est redispersé dans 35 mL d'éthanol, il est lavé 2 fois avec 35 mL par décantation magnétique ;
- après le dernier lavage, les nanoparticules sont légèrement séchées sous flux d'argon avant d'être redispersées dans de l'hexane à hauteur de 1mg de nanoparticules/mL.

Le greffage des molécules d'acide oléique sur les NPSco est confirmé par spectroscopie infrarouge (Figure 112). La distribution de taille des suspensions des NPSco@OA dans l'hexane est monomodale et centrée sur 30 nm (Figure 111) : la distribution en taille est donc très bonne avant de procéder à l'échange de ligand. Les micrographies MET des NPSco@OA montrent également que celles-ci sont recouvertes d'une couche organique (Figure 110, centre) et sont mieux dispersées que les NPSco (Figure 110, droite).

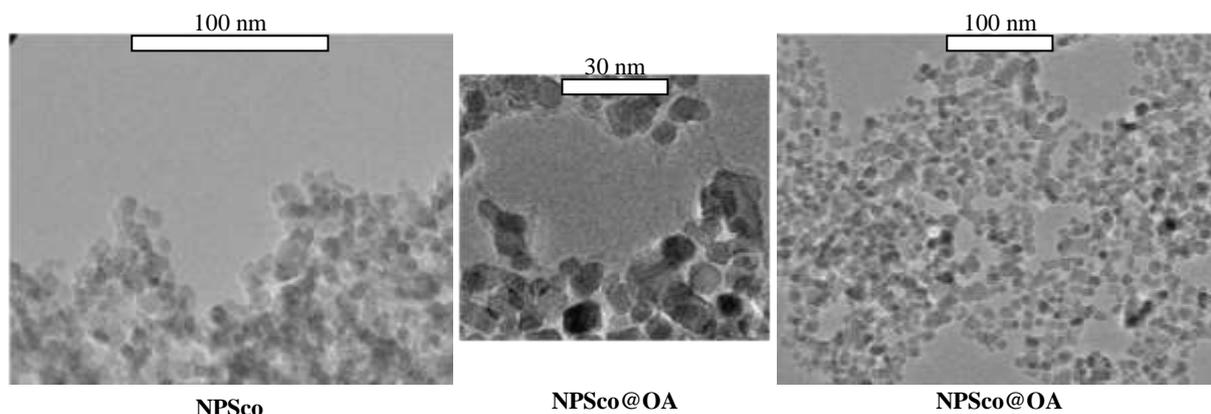
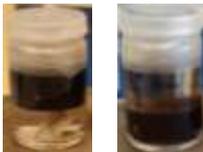


Figure 110 : micrographies MET à basse résolution des NPSco (à gauche) et des NPSco@OA (au centre et à droite).

### B. Le transfert de phase (méthode TR)

Le protocole d'échange de ligands et de transfert de phase est le même que celui appliqué sur les NPStd@OA. Seuls les dendrons ANA ont été greffés par cette méthode, les NPSco greffées par ce protocole sont nommées NPSco@ANA (EL). Le tableau suivant récapitule les conditions expérimentales.

Tableau 31 : récapitulatif des conditions expérimentales et photos de la suspension au début (à gauche) et à la fin du transfert à droite).

Non de l'échantillon	Concentration de dendrons dans la phase aqueuse $\pm 0,1$ mM/L	pHréa $\pm 0,1$	pHréa/fin $\pm 0,1$	
NPSco@ANA (EL)	2,9	5,1	7,4	

La suspension des NPSco@ANA (EL) est très stable et concentrée. Les analyses élémentaires ont montré que le taux de greffage est de  $1,25$  molécule/nm<sup>2</sup> ce qui est en accord avec les résultats précédents obtenus (Tableau 32, page 151). Les NPSco greffées par cette méthode ont donc un taux de recouvrement supérieur à 90 %.

### 2.3.2 Caractérisation des nanoparticules dendronisées

Des mesures de distribution de taille, de potentiel zêta et des analyses infrarouges ont été réalisées pour caractériser et comparer les résultats obtenus avec les précédentes expériences.

#### A. Stabilité colloïdale des nanoparticules dendronisées

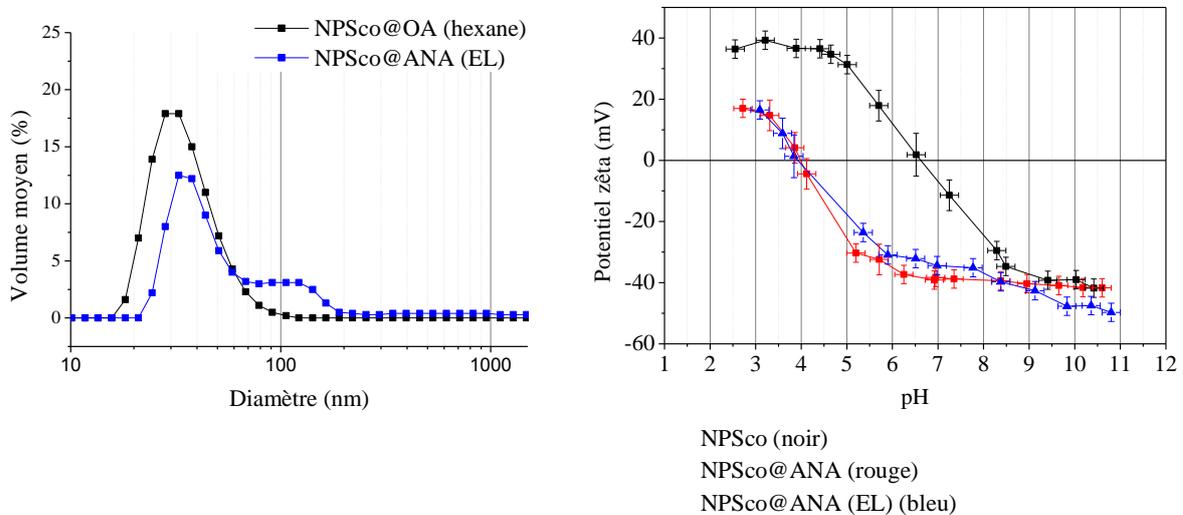


Figure 111 : distributions de taille des NPSco@ANA (EL) à pH = 7 (à gauche) et courbes de l'évolution de leur potentiel zêta en fonction du pH (à droite).

La distribution de taille des NPSco@ANA (EL) centrée sur 30 nm est « meilleure » que celle des NPSco@ANA obtenues par greffage direct. La méthode de transfert de phase appliquée au NPSco a donc permis de réduire la distribution de taille des nanoparticules et cela s'explique par la meilleure qualité des suspensions de NPSco@OA avant l'étape de greffage : Leur distribution de taille dans l'hexane est en effet centrée sur 30 nm contrairement à celle des suspensions de NPSco dans l'eau qui présentent une distribution supérieure à 100 nm.

L'évolution des courbes de potentiel zêta est identique à celles des suspensions aqueuses des NPSco@ANA et les NPStd@ANA. Le PIE des NPStd@ANA (EL) s'est déplacé vers le pH = 4.

## B. Spectre Infrarouge des NPSco@ANA (EL)

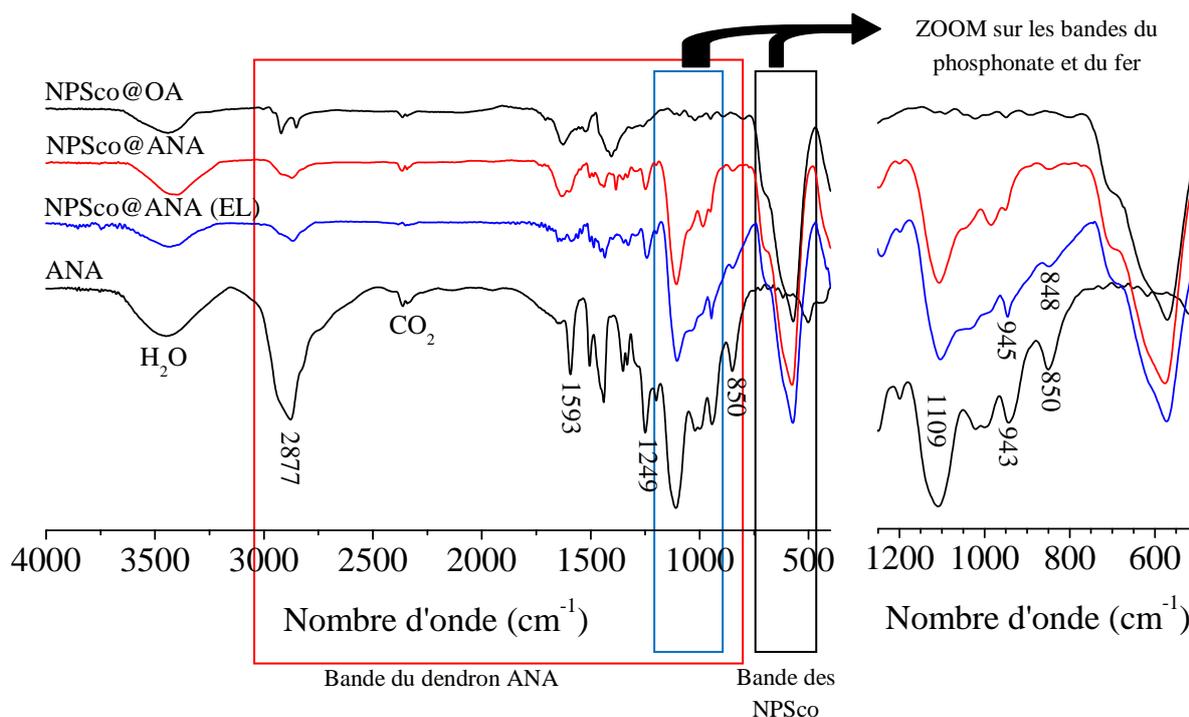


Figure 112 : spectres infrarouges des NPSco@OA, des NPSco@ANA, des NPSco@ANA(EL) et du dendron ANA.

Les spectres IR des NPSco@ANA (EL) confirment le greffage des dendrons à la surface des nanoparticules. Sur les zooms des bandes phosphonates, nous voyons que le profil des bandes des NPSco@ANA (EL) est différent de celui des NPSco@ANA. Cette observation suggère que le mode de greffage est différent, mais il faut, comme pour les NPSco@ANA, effectuer des expériences complémentaires pour confirmer cette observation. Nous observons une disparition de la bande de la liaison P=O qui, comme dans les expériences précédentes, est difficilement attribuable à formation d'une liaison avec le fer. La disparition des bandes des liaisons P-OH est difficile à interpréter, mais suggère que le complexe de surface entre le groupement phosphonate et le fer est au moins binucléaire.

### 2.3.3 Bilan

Le greffage de dendrons ANA par transfert de phase sur les NPSco@OA a été un succès car il a permis d'obtenir des suspensions stables et concentrées de nanoparticules tout en réduisant leur distribution de taille. Les analyses infrarouges et les mesures de potentiel zêta confirment le greffage du dendron à la surface des nanoparticules.

## 2.4 Conclusion

Le greffage des dendrons à la surface des nanoparticules synthétisées par décomposition thermique a été réalisé par transfert de phase. Contrairement aux premiers essais de greffage direct dans le THF où le passage de la phase organique à la phase aqueuse déstabilisait les suspensions, le protocole d'échange de ligands avec transfert de phase a permis d'obtenir des suspensions de NPSco dendronisées concentrées et stables dans le temps.

L'étude réalisée à partir des suspensions de NPStd@OA et NPSCO@OA a montré que la dispersion des nanoparticules avant le greffage a un impact important sur la distribution finale des nanoparticules greffées par les dendrons. Ainsi, le diamètre moyen des nanoparticules dendronisées en suspensions a été réduit à 30 nm au lieu de 50 nm, valeur obtenue lors des expériences de greffage direct sur les NPSCO. Ces résultats permettront d'évaluer l'impact de la taille moyenne des nanoparticules pour leurs applications dans le domaine biomédical.

Les résultats des caractérisations des nanoparticules dendronisées par échange de ligands et transfert de phase sont identiques à ceux obtenus dans les expériences de greffage direct. Ainsi, les taux de greffage, les PIE, les analyses XPS, les analyses Mössbauer et les analyses des propriétés magnétiques convergent vers les mêmes observations. Cette reproductibilité dans les résultats, aussi bien avec les NPSCO qu'avec les NPStd, conforte leurs interprétations. Les spectres IR de certaines nanoparticules dendronisées (NPStd@ANA et NPSCO@ANA (EL)) et les analyses XPS (des NPStd@ANA) suggèrent que le mode de greffage par transfert de phase est différent de celui par greffage direct, mais des expériences complémentaires sont nécessaires pour conforter cette hypothèse.

Enfin, il n'a pas été possible d'obtenir des suspensions stables de NPStd@ANANH<sub>2</sub> car nous avons vu que les conditions de greffage du dendron ANANH<sub>2</sub> rendent difficile leur adsorption par transfert de phase (mauvaise attraction électrostatique entre NPStd@OA et dendron et présence des acides oléiques). D'autres voies de greffage doivent être envisagées.

### 3 TABLEAU RECAPITULATIF DES PROPRIETES DES NANOPARTICULES AVANT ET APRES GREFFAGE DES DENDRONS ET SELON LEUR METHODE DE SYNTHESE

Le Tableau 32 récapitule les propriétés des nanoparticules obtenues avant et après greffage des dendrons. Seules les meilleures expériences, où les taux de recouvrement sont maximums, sont présentées.

Tableau 32 : bilan sur les nanoparticules avant et après greffage.

Echantillon	NPSco	NPSco@ANA	NPSco@ANA (EL)	NPSco@ANACOOH	NPSco@ANANH2	NPStd@OA	NPStd@ANA	NPStd@ANACOOH
Taux de greffage (molécule/nm <sup>2</sup> )	0	1,30	1,25	1,01	0,80		1,33	1,06
Diamètre moyen MET (nm)	11,6	11,6	11,6	11,6	11,6	11,3	11,3	11,3
Diamètre hydrodynamique moyen DLS (nm)	> 200	50	30	50	90	14	30	30
Perte de masse ATG (%)	3	12				14	17	
PIE	6,8	4	4	5			4	5
<b>IR</b>								
Surface	Nue	ANA	ANA	ANACOOH	ANANH2	OA	ANA	ANACOOH
Oxydation	oui	oui, ↑	oui, ↑	oui, ↑	oui, ↑	oui	oui, ↑	oui, ↑
<b>XPS</b>								
Surface	Nue	ANA				OA	ANA	
Oxydation	oui	oui, ↑				oui	oui, ↑	
Paramètre de maille (nm)	0,8387	0,8379				0,8381	0,8367	
<b>Mössbauer</b>								
Taille des NPS analysées par spectrométrie Mössbauer	11,7 nm	10 nm				12 nm	9 nm	
Composition	300	Fe <sub>2,74</sub> O <sub>4</sub>	Fe <sub>2,82</sub> O <sub>4</sub>			Fe <sub>2,79</sub> O <sub>4</sub>	Fe <sub>2,74</sub> O <sub>4</sub>	
	77	Fe <sub>2,72</sub> O <sub>4</sub>	Fe <sub>2,74</sub> O <sub>4</sub>			Fe <sub>2,77</sub> O <sub>4</sub>	Fe <sub>2,74</sub> O <sub>4</sub>	
Epaisseur de la couche cantée (nm)	0,35	0,36				0,7	0,8	
<b>Propriétés magnétiques des NPS de taille ≈ 11,5 nm</b>								
Aimantation à saturation (uem/g)	65	70				55	54	
Température de blocage (K)	> 300	250				150	130	

Les deux méthodes de synthèses, la co-précipitation et la décomposition thermique, ont permis d'obtenir des nanoparticules présentant des tailles similaires. L'ensemble des analyses effectuées converge vers une même composition de magnétite sous-stœchiométrique avec un état d'oxydation similaire. Les spectres Mössbauer ont montré que les nanoparticules synthétisées par décomposition thermique présentent des couches cantées de spin plus épaisses (1 couche et 2 couches atomiques pour les NPSco et les NPStd@OA respectivement). Ceci peut être attribué à une interaction des groupements carboxylates des molécules d'acide oléique avec la surface des nanoparticules<sup>162</sup>. Les NPStd@OA ont ainsi une aimantation à saturation plus faible que celle des NPSco. Cependant, grâce à

leur faible état d'agrégation qui limite les interactions dipolaires, elles ont une température de blocage nettement inférieure aux NPScO.

Après la réaction de greffage, les nanoparticules dendronisées se sont légèrement oxydées, mais leur cinétique d'oxydation à long terme devient plus lente. Cela est attribué à la présence du groupement phosphonate à leur surface qui les préserve de l'oxydation. Les analyses infrarouges et XPS ont montré que le complexe de surface formé est au moins bi-nucléaire.

Les mesures de distribution de taille en suspension ont montré que les NPScO dendronisées ont un diamètre hydrodynamique moyen supérieur à celui des NPStd@OA dendronisées. C'est la conséquence directe de leur état d'agrégation avant la réaction de greffage : les NPScO sont nues et agrégées tandis que les NPStd@OA sont recouvertes d'acide oléique et bien dispersées. Nous avons vu cependant qu'il est possible d'atteindre des distributions de taille avec les NPScO@ANA (NPScO@ANA (EL)) similaires à celles des NPStd@ANA en appliquant un protocole de greffage plus complexe : greffage de molécules d'acide oléique sur les NPScO puis échange de ligands.

Les mesures de potentiel zêta ont montré que le point isoélectrique des nanoparticules se décale vers les pH acide après le greffage des dendrons. Ce décalage dépend du dendron greffé et reste le même, à dendron identique, quelle que soit la nature des nanoparticules.

Les greffages des dendrons via l'agent de couplage phosphonate a permis de ne pas modifier l'aimantation à saturation des nanoparticules : les nanoparticules dendronisées, bien que légèrement oxydées après la réaction de greffage, ont une aimantation à saturation identique voire supérieure. La température de blocage des nanoparticules dendronisées diminue ce qui peut se traduire par une diminution des interactions dipolaires. Cette hypothèse est valable pour les NPScO@ANA car les NPScO sont nues avant greffage et sont fortement agrégées. Pour les NPStd@ANA, qui présentent un état d'agrégation légèrement supérieur après la réaction de greffage, cette hypothèse n'est pas plausible. La diminution de la température de blocage des NPStd@ANA pourrait être attribuée à la présence du groupement phosphonate à leur surface, qui induirait une modification de l'anisotropie magnétocristalline effective des nanoparticules (présence du complexe de surface).

Enfin, les analyses élémentaires et les dosages UV-visible montrent que les taux de greffage sont similaires avec le même dendron aussi bien sur les NPStd dendronisées que les NPScO dendronisées.

Pour conclure sur ces expériences et ces analyses, il faut noter que malgré un stockage sous argon des échantillons pour limiter leur oxydation, ils s'oxydent. La qualité des mesures dépend donc du temps. Les analyses, comme celles par spectrométrie Mössbauer, qui ne peuvent pas être réalisées immédiatement après la préparation des échantillons montrent alors une composition de nos nanoparticules plus proche de la maghémite que de la magnétite. Ces analyses confortent cependant la diminution de la cinétique d'oxydation des nanoparticules lorsqu'elles ont été dendronisées.





**CHAPITRE IV :  
APPLICATIONS  
POTENTIELLES DANS LE  
DOMAINE BIOMEDICAL**



Dans ce chapitre nous allons présenter les divers tests effectués pour évaluer le potentiel de nos suspensions pour des applications dans le domaine biomédical. Les premières expériences *in vitro* ont eu pour but d'étudier la stabilité de nos suspensions dans les milieux physiologiques et d'évaluer leur potentiel en tant qu'agent de contraste par des mesures de relaxométrie. Leur toxicité au contact de deux lignées cellulaires a été testée ainsi que leur internalisation cellulaire. Ensuite nous sommes allés plus loin dans notre investigation en injectant les suspensions les plus stables en milieu osmolaire dans des souris et des rats pour évaluer leur biodistribution et en réalisant les premières images IRM sur des petits animaux.

Les suspensions sélectionnées pour ces tests sont issues des « meilleures » expériences de greffage que nous avons réalisées et sont listées ci-dessous :

Non de l'échantillon	Type de nanoparticule	Dendron greffée	Type de greffage	Diamètre hydrodynamique moyen en nm
NPSco@ANACOOH	Co-précipitation	ANACOOH	Direct	50
NPSco@ANA		ANA		
NPSco@ANA (EL)	Transfert de phase		30	
NPStd@ANA				Décomposition thermique
NPStd@ANACOOH		ANACOOH		

## 1 LES MESURES DE RELAXIVITE ET LES FANTÔMES

---

Les mesures de temps de relaxation ont été effectuées en collaboration avec le Professeur Pascal Perriat du groupe d'Etude de Métallurgie Physique et de Physique des Matériaux (INSA de Lyon) sur un relaxomètre (NMR Analyser : minispec Bruker mq 60) fonctionnant à 60 MHz avec un champ proche de 1,5 T (1,41 T précisément) à 37 °C.

D'autres mesures ont également été réalisées lors des acquisitions des images fantômes de nos suspensions avec un appareil IRM pour petit animal fonctionnant sous champ de 7T à température ambiante. Ces mesures ont été faites en collaboration avec le Dr Claire Billotey et Jacqueline Taleb du Laboratoire CREATIS-LRMN à Lyon.

Ainsi, les mesures de relaxivité ont été centrées sur les échantillons NPSco@ANA, NPSco@ANA (EL), NPStd@ANA, NPSco@ANACOOH et NPStd@ANACOOH. Des mesures ont également été effectuées sur un produit commercial, l'Endorem (Laboratoire GUERBET, particules de 80 à 120 nm)<sup>232</sup> afin de pouvoir comparer nos résultats à un produit commercial.

La relaxivité des NPSco@ANANH2 n'a pas pu être évaluée car les suspensions se sont révélées très instables sous un champ de 1,5 T et 7 T en raison d'un taux de greffage faible du dendron et de leur distribution de taille plus grande.

### 1.1 Les mesures de temps de relaxation à 1,5 T

---

#### *Le protocole*

Pour mesurer la relaxivité d'une suspension de nanoparticules, il faut mesurer les temps de relaxation  $T_1$  et  $T_2$  de cette suspension à différentes concentrations. Ensuite les inverses de ces temps

de relaxation sont tracées en fonction de la concentration en fer (en millimol de fer). La pente de la droite ainsi obtenue donne alors la relaxivité  $r_1$  ou  $r_2$  de la suspension.

Les mesures ont, dans un premier temps, été effectuées sur plusieurs dilutions dans l'eau distillée de nos suspensions sans tenir compte du pH : le pH donc est celui de l'eau distillée proche de 5,5. Puis des mesures ont été réalisées en ajustant le pH à une valeur proche de 7.

### 1.1.1 Les mesures de relaxivité

Les résultats des mesures réalisées sur les différentes suspensions des nanoparticules dendronisées sont donnés dans les figures suivantes. Les courbes sont tracées en soustrayant à chaque valeur de relaxivité mesurée la valeur de la relaxivité de l'eau pure. Pour l'échantillon NPSco@ANA, des mesures ont été effectuées sur trois suspensions différentes :

- NPSco@ANA (69) qui est une suspension issue d'une de nos premières expériences de greffage avec la méthode B/pHréa à pH= 5 (taux de greffage maximum < 90 %) ;
- NPSco@ANA (84) et NPSco@ANA (100) sont des suspensions issues de nos expériences de greffage avec la méthode B/pHréa op à pH= 5 (taux de greffage maximum > 90 %).

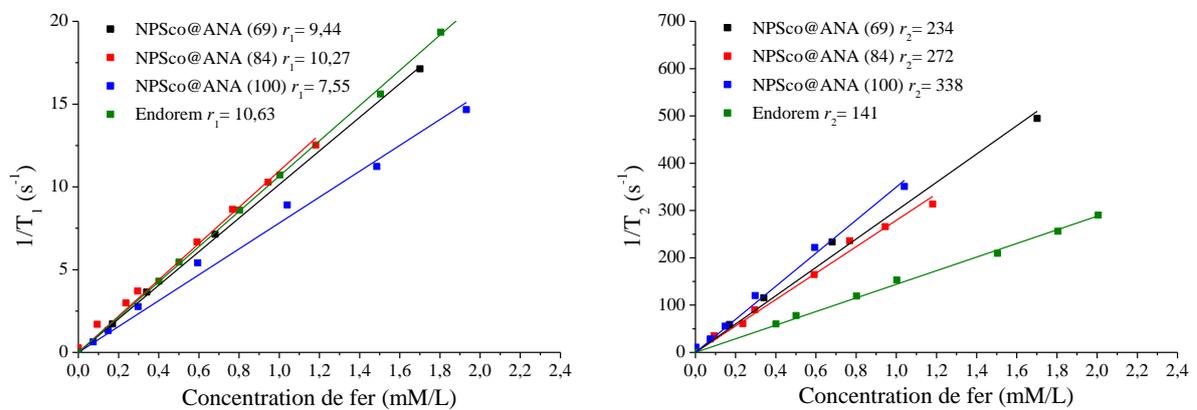


Figure 113 : courbes permettant d'accéder aux mesures de relaxivité  $r_1$  (à gauche) et  $r_2$  (à droite) obtenues avec des suspensions de NPSco@ANA et l'Endorem au pH de l'eau distillée.

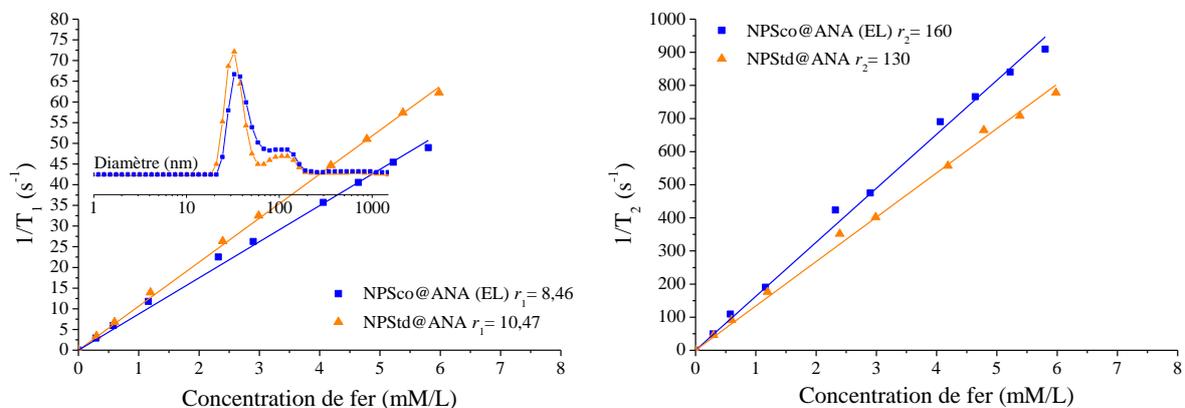


Figure 114 : courbes permettant d'accéder aux mesures de relaxivité  $r_1$  (à gauche) et  $r_2$  (à droite) obtenues avec des suspensions de NPStd@ANA et de NPSco@ANA (EL) à pH = 7. Les distributions de taille sont rappelées dans l'encart en haut gauche.

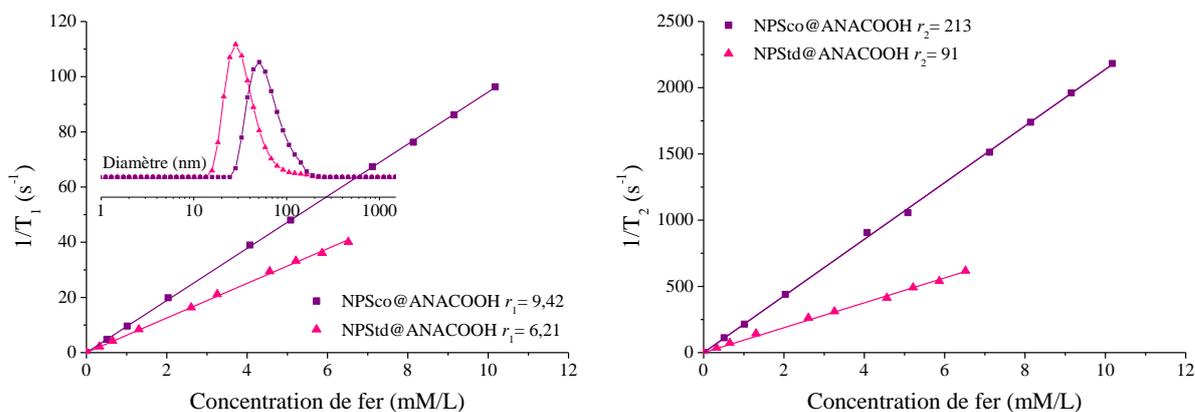


Figure 115 : courbes permettant d'accéder aux mesures de relaxivité  $r_1$  (à gauche) et  $r_2$  (à droite) obtenues sur des suspensions de NPSco@ANACOOH et de NPSStd@ANACOOH à pH = 7. Les distributions de taille sont rappelées dans l'encart en haut gauche.

Les résultats obtenus sur les divers échantillons montrent globalement que les mesures suivent bien une corrélation linéaire avec la concentration en fer des échantillons. La mesure de la pente de la droite obtenue donne la relaxivité moyenne des échantillons. Le tableau suivant résume les mesures de relaxation  $r_2$  obtenues et rapporte des valeurs de  $r_2$  d'agents de contraste commerciaux données dans la littérature.

Tableau 33 : récapitulatif des mesures de  $r_2$  obtenues sous 1,5 T à 37 °C<sup>192 169 259</sup>.

Nom	Type/nature du cœur	Enrobage	$D_H$ (nm)	Champ (T)	$r_2$ (mM <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	$r_2/r_1$
Nos mesures						
<b>Endorem</b>	SPIO	Dextran T10	120-180	1,5	141	13,2
<b>NPSco@ANA (69)</b>	Co-précipitation	ANA	50		234	24,9
<b>NPSco@ANA (84)</b>					272	26,4
<b>NPSco@ANA (100)</b>					338	45,1
<b>NPSco@ANACOOH</b>					213	22,6
<b>NPSco@ANA (EL)</b>		ANA	30		160	18,5
<b>NPSStd@ANA</b>	Décomposition thermique	ANACOOH	30		130	12,5
<b>NPSStd@ANACOOH</b>					91	14,7
Exemple de la littérature						
	MION	Liposome	170-300	0,47	130	
<b>AMI-25 (Feridex ; Endorem)</b>	SPIO	Dextran T10	120-180	1,5	120	11,9
				0,47	100	
<b>SHU 555A (Resovist)</b>	SPIO	Carboxidextran	60	1,5	188	19,5
				0,47	151	
<b>Magnetoliposome</b>	USPIO	PEG-liposomes	40	1,5	240	
<b>Ferumoxytol</b>	USPIO	Carboxymethyl-dextran T10	30	1,5	89	5,9
<b>AMI 227 (Sinerem/Combindex)</b>	USPIO	Dextran T10, T1	15-30	1,5	65	6,7
				0,47	53	
<b>MION-46L</b>	MION	Dextran	18-24	0,47	35	
<b>Supravist</b>	USPIO	Carboxydextran	21	1,5	38	3,6
<b>Magnetoferritin</b>	USPIO	Ferritine	12	1,5/25°C	218	
<b>Abdoscan</b>	VSOP	Citrate	7	1,5	33,4	2,4

### 1.1.2 Interprétation des résultats

Si nous comparons les mesures de relaxivité de nos suspensions en fonction du diamètre hydrodynamique des particules (Figure 116), nous constatons que la relaxivité  $r_2$  de nos nano-objets en suspension diminue avec le diamètre hydrodynamique moyen des nano-objets. L'effet de l'état d'agrégation des nanoparticules sur la mesure de  $r_2$  a déjà été mis en évidence dans la littérature (voir chapitre I, 3.3.2.E)<sup>192 169 259</sup>.

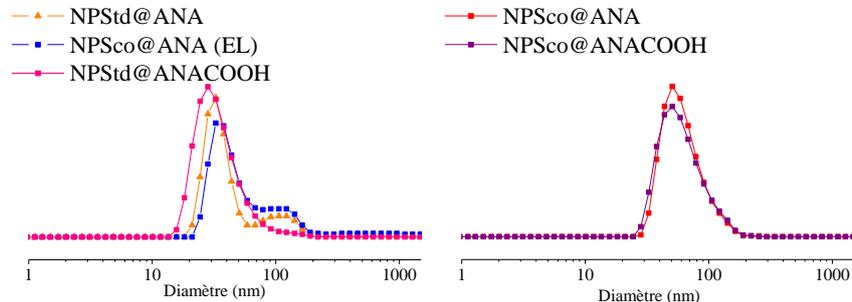


Figure 116 : distribution de taille des nanoparticules dendronisées des suspensions étudiées.

Par contre à diamètre hydrodynamique moyen similaire, les valeurs de relaxivité  $r_2$  de nos nano-objets en suspensions sont supérieures à la plupart de celles citées de la littérature. Nous pouvons voir ainsi que, pour un même diamètre hydrodynamique moyen (zone orange et jaune) et pour un même champ magnétique appliqué, nos nano-objets en suspension ont des relaxivités  $r_2$  jusqu'à 30 % supérieures pour les suspensions avec un diamètre moyen de particules de 50 nm et 40 % supérieures pour les suspensions avec un diamètre moyen de 30 nm.

La relaxivité  $r_2$  des NPSco greffées par transfert de phase (NPSco@ANA (EL)), qui ont un diamètre hydrodynamique moyen inférieur à celui des nanoparticules dendronisées directement (NPSco@ANA), est similaire et légèrement supérieure à celle des NPSco@ANA (qui présente le même diamètre hydrodynamique moyen, Figure 116). Cette valeur plus élevée de la relaxivité des NPSco@ANA (EL) s'expliquerait par les propriétés magnétiques des nanoparticules synthétisées par co-précipitation. En effet, l'aimantation à saturation des NPSco est de 65 uem/g tandis que celle des NPSco est de 55 uem/g.

### 1.1.3 Bilan

Les mesures de relaxivité  $r_2$  sur nos suspensions nous ont permis de voir que nos nanoparticules greffées avec des dendrons via un groupement phosphonate avaient un très bon potentiel en tant qu'agent de contraste. Nous avons pu voir en effet que la relaxivité de nos nano-objets en suspensions, mesurée à 1,5 T, est supérieure de plus de 30 % par comparaison avec la relaxivité d'autres agents de contraste cités dans la littérature.

Ces valeurs plus élevées de relaxivité de nos suspensions confortent l'intérêt des nanoparticules d'oxyde de fer sur lesquelles sont greffées des dendrons via un groupement phosphonate comme agent de couplage. La supériorité de nos valeurs de relaxivité s'expliquerait par : les propriétés magnétiques de nos cœurs qui sont préservées et même exaltées par le greffage avec le groupement phosphonate ; la faible épaisseur et densité de la couche organique constituée par les dendrons.

## 1.2 Les fantômes et les temps de relaxation à 7 T

---

Les images des fantômes de nos suspensions ont été acquises avec la collaboration du Dr C. Billotey du Laboratoire CREATIS-LRMN à Lyon. Ces images ont été réalisées avec un appareil IRM pour petit animal fonctionnant avec un champ de 7T à température ambiante sur les NPSco@ANA, les NPSco@ANACOOH, les NPStd@ANA, les NPStd@ANACOOH et l'Endorem. Ces mesures, en plus de donner un aperçu visuel de la baisse du contraste engendré, permettent d'évaluer la baisse du signal et de remonter à la relaxivité des échantillons.

### *Protocole*

Le protocole pour réaliser ces images est le même que celui utilisé pour les mesures de relaxivité. Les mesures sont donc effectuées sur des dilutions de nos suspensions dans l'eau distillée.

### 1.2.1 Les mesures

---

Plusieurs séries de mesures ont été réalisées : les premières mesures ont été réalisées sur les suspensions de NPSco@ANA et l'Endorem à concentration en mM de fer égale pour chaque dilution, les mesures suivantes sur les suspensions de NPSco@ANACOOH, de NPStd@ANA et de NPStd@ANACOOH. La séquence de mesure est une séquence écho de spin pondéré en  $T_1$  ou  $T_2$  avec un temps de répétition  $T_R = 2000$  ms et un temps d'écho  $T_E = 70$  ms. La Figure 117 montre les images pondérées en  $T_2$  obtenues au cours de nos études.

Facteur de dilution des suspensions	5	15	25	50	75	100	200	300	500	$\infty$		
Concentration de fer $\pm$ 0,001 mM/L	0,800	0,280	0,164	0,082	0,055	0,041	0,020	0,014	0,008	0		
<b>Endorem</b>	Plus visible											
<b>EHC<sub>Eau</sub> en %</b>			-86,4	-63,2	-47,9	-48,6	-27,4	-16,4	-8,4	0		
<b>NPSco@ANA (101)</b>												
<b>EHC<sub>Eau</sub> en %</b>	-38,9	-50,9	-96,0	-89,3	-77,2	-78,8	-52,3	-47,6	-21,4	0		
<b>EHC<sub>En</sub> en %</b>			-70,6	-70,8	-56,4	-58,8	-34,4	-37,4	-17,5	0		
Facteur de dilution des suspensions	1	2	4	15	30	40	70	150	300	$\infty$		
Concentration de fer $\pm$ 0,001 mM/L	6,9	3,45	1,915	0,483	0,242	0,173	0,098	0,046	0,023	0		
<b>NPSco@ANACOOH</b>	Plus visible											
<b>EHC<sub>Eau</sub> en %</b>			-99,2	-99,1	-98,5	-95,7	-88,0	-71,8	-61,1	0		
Concentration de fer $\pm$ 0,001 mM/L	3,45	2,95	2,100	0,525	0,263	0,188	0,107	0,052	0,025	0		
<b>NPStd@ANA</b>	Plus visible											
<b>EHC<sub>Eau</sub> en %</b>			-99,1	-93,7	-91,9	-91,5	-85,3	-77,1	-56,8	0		
Facteur de dilution des suspensions			1	2	10	100	$10^3$	$10^4$	$10^5$	$\infty$		
Concentration de fer $\pm$ 0,001 mM/L			2,5	1,25	0,25	$2,5 \times 10^{-2}$	$2,5 \times 10^{-3}$	$2,5 \times 10^{-4}$	$2,5 \times 10^{-5}$	0		
<b>NPStd@ANACOOH</b>			Plus visible									
<b>EHC<sub>Eau</sub> en %</b>				-98,6	-97,5	-13,0	-9,3	-3,25	0	0		

Figure 117 : images des fantômes de nos suspensions en fonction de leur concentration en fer.

## 1.2.2 Interprétation des résultats

Les images fantômes de nos suspensions montrent une augmentation du contraste noir lorsque la concentration en fer, donc en nanoparticules, augmente. La présence de contraste confirme que les nanoparticules sont restées stables sous un champ de 7T ce qui est très encourageant. Le calcul des rapports d'amélioration de contraste (EHC : Enhancement Contrast ratio) permet de mieux apprécier et de comparer l'extinction du signal mesuré entre deux échantillons. Les EHC ont ainsi été calculés par rapport au signal de l'eau ( $EHC_{Eau}$ ) et par rapport à celui de l'Endorem. Les formules sont les suivantes :

$$EHC_{Eau} = \frac{S_{éch} - S_{Eau}}{S_{Eau}} \times 100$$

$$EHC_{En} = \frac{S_{éch} - S_{En}}{S_{En}} \times 100$$

où  $S_{eau}$ ,  $S_{éch}$ ,  $S_{En}$  sont l'intensité du signal mesuré respectivement pour l'eau, l'échantillon considéré et l'Endorem.

Les valeurs des EHC sont données dans la Figure 117 tandis que l'évolution des  $EHC_{Eau}$  en fonction de la concentration est tracée dans la Figure 118.

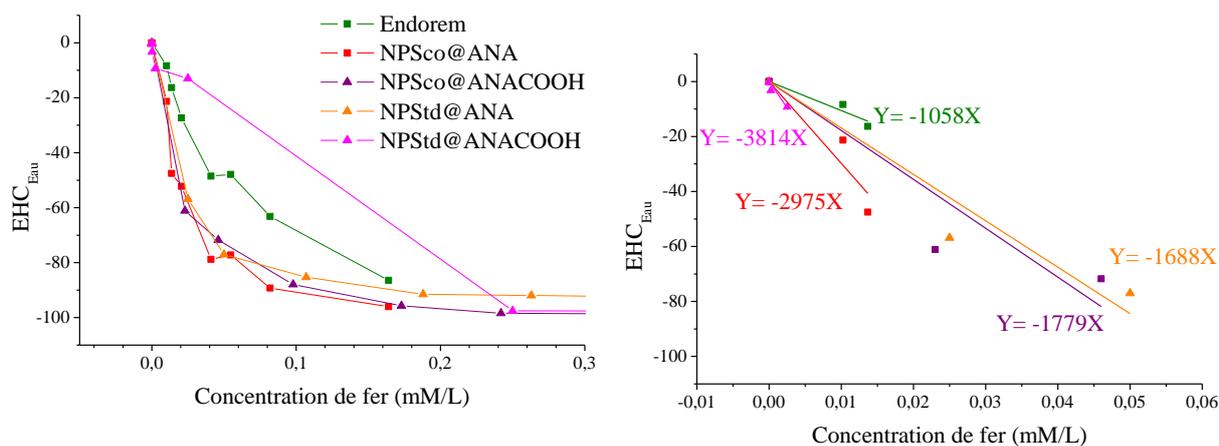


Figure 118 : évolution des  $EHC_{Eau}$  en fonction de la concentration (à gauche) et pente des droites à faibles concentrations (à droite).

La comparaison des  $EHC_{eau}$  à des concentrations identiques, révèle que l’extinction du signal est plus rapide (illustration par la pente des courbes aux faibles concentrations, Figure 118, droite) pour les nanoparticules dendronisées que pour l’échantillon commercial « Endorem ».

Les  $EHC_{En}$  calculés (Figure 117) pour les suspensions de NPSco@ANA confirment non seulement l’observation sur les images fantômes de l’extinction du signal à de faibles concentrations, mais également les valeurs de relaxivité plus élevées des nanoparticules dendronisées, tout cela par comparaison à l’Endorem.

Nous constatons aussi que l’extinction du signal est plus rapide pour les NPSco greffées que pour les NPStd (Les  $EHC$  des NPStd@ANACOOH ne sont pas prises en compte dans les observations, car compte tenu du nombre de mesures à faible concentration, il n’est pas possible de donner une évaluation claire). Cette extinction est de plus, plus rapide pour les NPSco@ANA que pour les NPSco@ANACOOH. Ces observations concordent avec les précédentes mesures de relaxivité, mais la rapidité d’extinction des signaux reste beaucoup moins marquée que celle qu’il aurait été possible d’envisager à partir de ces mesures : les mesures de  $r_2$  à 1,5 T montrent de plus grandes différences de relaxivité entre les NPSco@ANA ( $r_2 = 265 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$  en moyenne), les NPSco@ANACOOH ( $r_2 = 213 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ ) et les NPStd@ANA ( $r_2 = 130 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ ). Le champ de 7 T de l’appareil d’IRM pourrait être en cause. En effet, nous rappelons que la recherche en IRM actuelle vise à augmenter le nombre de diagnostics sous champ de 7 T où la relaxivité des agents de contraste, s’ils restent stables, est plus grande. Au dessus de 0,1 mM/L, les NPSco produisent beaucoup plus de contraste que les NPStd. Cela peut être attribué à la meilleure aimantation à saturation des nanoparticules issues de la co-précipitation et cela suggérerait que la taille moyenne de particules en suspension est un critère moins important à ce stade (entre 30 et 50 nm).

Les NPSco@ANA présentent un phénomène « d’hypersignal » à partir d’une concentration proche de 0,2 mM/L. Le phénomène d’hypersignal, qui dépend de la nature des nano-objets étudiés, se produit lorsque la concentration des nanoparticules devient trop importante et sature la relaxivité. Il se traduit par une inversion du contraste apparent des images qui redevient blanc. Le signal mesuré passe alors par un minimum avant de croître (Figure 119).

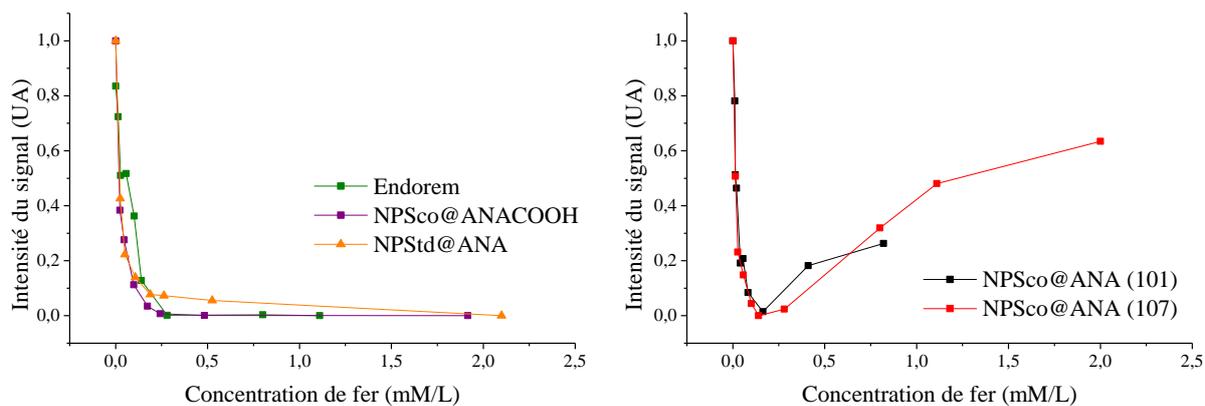


Figure 119 : intensité du signal en fonction de la concentration.

Le phénomène d'hypersignal n'est pas observé avec les NPStd@ANA et les NPSco@ANACOOH. La relaxivité de ces nanoparticules dendronisées ( $r_2 = 213$  et  $130 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$  pour les NPSco@ANACOOH et les NPStd@ANA respectivement) est moins importante que celle des NPSco@ANA ( $r_2 = 265 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$  en moyenne) et le signal sature donc moins rapidement.

### 1.2.3 Mesure de relaxation à 7 T *in vitro*

Les relaxivités  $r_1$  et  $r_2$  de l'Endorem et de nos suspensions de NPSco@ANA ont pu être évaluées à 7 T lors de l'acquisition de leurs images fantômes par des séquences permettant la mesure du  $T_1$  (FISP) et  $T_2$  (MSME). La relaxivité a été évaluée aux faibles concentrations où elle suit une loi linéaire avant la disparition des signaux ou l'apparition des hypersignaux (Figure 120).

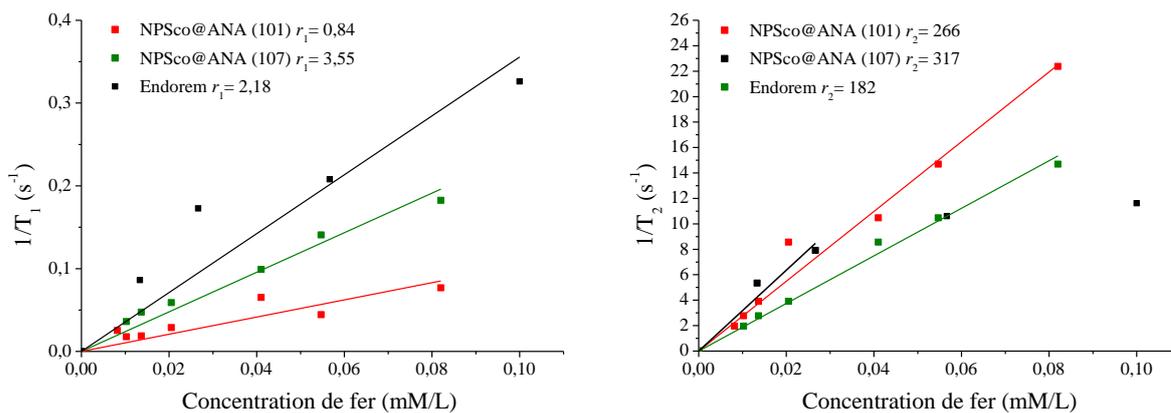


Figure 120 : mesure de relaxation  $r_1$  (à gauche) et  $r_2$  (à droite) effectuées sur des suspensions de NPSco@ANA et L'Endorem.

Les mesures de relaxivité à 7 T montrent que les résultats obtenus sur les divers échantillons ont une évolution linéaire avec la concentration en fer des échantillons. Les suspensions conservent donc de bonnes propriétés relaxantes avec des valeurs de  $r_2$  grandes, mais qui n'ont pas beaucoup augmenté par comparaison avec les valeurs obtenues à 1,5 T. En effet, la relaxivité des suspensions de NPSco@ANA à 7 T reste du même ordre que celle à 1,5 T et est toujours supérieure à celle de l'Endorem. Ces résultats concordent donc avec les précédentes mesures à 1,5 T.

## 1.3 Conclusion

Les mesures de relaxivité  $r_2$  à 1,5 T et à 7 T ont montré que les nanoparticules dendronisées représentent un concept intéressant pour développer des agents de contraste négatifs. Les valeurs de relaxivité mesurées sont supérieures à celles de nombreux autres agents de contraste référencés dans la littérature. Nous avons pu confirmer que ces relaxivités diminuent avec la taille des particules en suspension. Ainsi, les nanoparticules greffées par transfert de phase, aussi bien les NPScO que les NPStd, ont des relaxivités plus faibles en raison de leur distribution de taille plus petite et centrée sur 30 nm confirmant l'influence de l'état d'agrégation sur les valeurs de relaxivité. Néanmoins, les valeurs des relaxivités plus élevées par comparaison à des échantillons commerciaux sont attribuées aux propriétés magnétiques du cœur inorganique qui sont préservées par le mode de greffage des dendrons en utilisant un agent de couplage de type acide phosphonique.

Les images fantômes des suspensions obtenues sous champ de 7 T ont confirmé les résultats des premières études de la relaxivité. Ces expériences ont montré que nos suspensions restent stables sous un champ très intense et que leur relaxivité ne « s'écroule » pas sous son influence. Nous avons pu constater que l'intensité du signal mesuré décroît plus rapidement avec nos suspensions comparativement à l'Endorem. Cependant, les différences observées lors des mesures de relaxivité à 1,5 T sont moins visibles à 7 T. Le pouvoir contrastant des nanoparticules dendronisées et leur relaxivité tendent à être les mêmes à 7 T.

## 2 STABILITE DANS LES MILIEUX PHYSIOLOGIQUES ET TESTS *IN VIVO*

---

Les mesures de relaxivité dans l'eau de nos différents lots de nanoparticules dendronisées ayant été encourageantes, nos travaux se sont orientés vers la stabilité de nos nanoparticules dendronisées dans des milieux physiologiques ou isotones (pH = 7,4, osmolarité de 300 mOsmol/L). Cette étape est primordiale pour pouvoir tester l'effet des nano-objets sur le vivant sans provoquer de décès prématurés par la formation d'agrégats, d'agglomérats etc. Les nanoparticules doivent de plus, non seulement rester stables dans le temps, mais également pouvoir être filtrées à travers un filtre de 0,2 µm afin d'éliminer les bactéries et travailler dans des conditions stériles. A la suite de ces tests de stabilité, les nanoparticules dendronisées ont pu être testées en toxicité et *in vivo* avec l'acquisition de premières images IRM. Les expériences ont été réalisées dans le laboratoire CREATIS-LRMN en collaboration avec le Dr C. Billotey.

### 2.1 Stabilité dans les milieux physiologiques

---

Les tests de stabilité colloïdale dans les milieux physiologiques ou isotones ont été effectués afin de disposer de suspensions injectables *in vivo* ou pouvant être utilisées dans des milieux de culture cellulaire. La stabilité des nanoparticules dendronisées dans les milieux physiologiques est directement visualisable à l'œil nu, et/ou par microscopie optique avec l'observation de la formation d'agrégats dans le temps ou d'une sédimentation. La formation d'agrégats peut aussi être détectée macroscopiquement par filtration (à travers les filtres de 0,2 µm) et en comparant la couleur du filtrat et du filtre : un filtrat très limpide et un filtre très marron signifient que la solution est constituée de gros agrégats, et qu'elle ne peut pas être injectée *in vivo*.

#### 2.1.1 Les premières expériences avec les suspensions de NPSCO@ANA

---

Les premières expériences de stabilité ont été menées avec des suspensions de NPSCO@ANA (NPSCO@ANA (105)). Ces expériences ont été réalisées à des concentrations de 1 et 5 mM/L de fer pour chaque milieu physiologique.

##### *Protocole*

Les suspensions de nanoparticules dendronisées sont, après ajustement du pH à 7,4 et mise à l'isoosmolarité, diluées dans divers milieux physiologiques de culture cellulaire. La mise à l'isoosmolarité consiste à équilibrer, en fonction de la concentration de fer, la force ionique du milieu de sorte qu'elle soit égale à celle des milieux physiologiques. L'équilibre a été réalisé via l'ajout de sel (NaCl) pour atteindre une osmolarité finale de 300 mOsmol/L.

L'osmolarité de nos suspensions étant très faible (< 10 mOsmol/L) devant celle à atteindre (300 mOsmol/L), elle a été négligée et la mise à l'isoosmolarité a été réalisée suivant ce protocole : 27 mg de NaCl ont été dissouts dans 3 mL de notre suspension pour avoir la concentration de 9 g/L de NaCl requise pour l'isoosmolarité (solution ISO.NA) ;

La solution ISO.NA a ensuite été diluée dans les milieux physiologiques pour atteindre des concentrations en fer de 1 et 2 mM/L dans un volume final de 250 µL. La suspension de

NPSco@ANA (105) dont nous disposions avait une concentration en fer de 7 mM/L. Les dilutions ont été effectuées comme suit :

- pour obtenir une concentration de 1 mM/L de fer, 178,4 µL de ISO.NA sont dilués dans 71,6 µL du milieu physiologique considéré ;
- pour obtenir une concentration de 5 mM/L de fer, 214 µL de ISO.NA sont dilués dans 36 µL du milieu physiologique considéré ;

Les milieux physiologiques testés sont des solutions salines équilibrées pour être utilisées dans une large variété d'applications de culture de tissus :

- RPMI = Roswell Park Memorial Institute medium ;
- McCoy
- PBS = Phosphate Buffered Saline ;
- HBSS = Hank's Buffered Salt Solution ;
- DMEM = Dulbecco's Modified Eagle Medium ;
- NPMA = 5 mL d'Hepes 1M + 3,1 g CaCl<sub>2</sub> + 0,43 g NaCl + 45 mL eau ppi (eau pour préparation injectable qui est stérile et exempte de pyrogènes) ;
- un milieu uniquement à base de sucrose a été essayé en dissolvant 103 mg de sucrose dans 1 mL de notre suspension de NPSco@ANA pour atteindre une concentration de 103g/L.

La solution ISO.NA (témoin) a été diluée 7 et 1,4 fois dans de l'eau pour atteindre les concentrations étudiées.

### *Les expériences*

La stabilité des suspensions de nanoparticules dendronisées a été suivie durant une heure. La qualité de la suspension est évaluée dans le tableau 25 : un signe -, signifie qu'aucun agglomérat ne s'est formé, le signe +++ traduit une agglomération totale avec une forte sédimentation.

*Tableau 34 : récapitulatif des observations faites sur l'évolution de la stabilité des suspensions au cours du temps.*

Milieu	RPMI		McCOY		PBS		HBSS		DMEM		NPMA		ISO.NA		Sucrose	
Concentration de fer (mM/L)	1	5	1	5	1	5	1	5	1	5	1	5	1	5	1	5
Temps écoulé	Formation d'agrégats/agglomérats															
1 minute	-	-	+	++	-	+	-	-	++	+++	-	-	-	+	-	-
5 minutes	-	+	++	+++	+	++	+	++	+++	+++	-	+	+	++	-	-
30 minutes	+	+++	+++	+++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+	++	+++	+++	-	-
60 minutes	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+++	+++	+++	-	-

Les résultats obtenus montrent que la stabilité des NPSco@ANA est très mauvaise dans un grand nombre de milieux physiologiques comme en milieu isotone. En effet, l'agglomération et la sédimentation des nanoparticules dendronisées sont très rapides dans le HBS, le DMEM, le PBS, le McCoY et dans la solution isotone à base de NaCl (Figure 121).

La floculation des NPSco@ANA est d'autant plus rapide que leur concentration est élevée. Seuls les milieux NPMA, RPMI et celui uniquement à base de sucrose présentent très peu ou pas

d'agglomérats trente minutes après le début des expériences (Figure 121). Au-delà, les mêmes observations d'agglomération et sédimentation sont faites dans ces milieux.

Ce problème de stabilité des suspensions de nanoparticules d'oxyde de fer en milieux physiologiques est courant et est rapporté dans la littérature<sup>169 336 337 338</sup> : la stabilité des nanoparticules dendronisées est perturbée par les ions présents, ceux-ci peuvent s'adsorber sur la surface restée libre des nanoparticules ou simplement pénétrer la couche fonctionnelle et changer l'équilibre des forces qui stabilise les nano-objets (Figure 122).

Le milieu uniquement à base de sucrose est le seul à ne pas présenter d'agglomération au bout d'une heure. La stabilité des NPSco@ANA dans ce milieu peut s'expliquer par le fait que le sucrose est une grosse molécule qui ne pénètre pas facilement la couche de dendrons ANA en surface des nanoparticules. Ces molécules ne peuvent donc pas perturber la stabilité des NPSco@ANA comme le font les ions sodium ou chlorure.

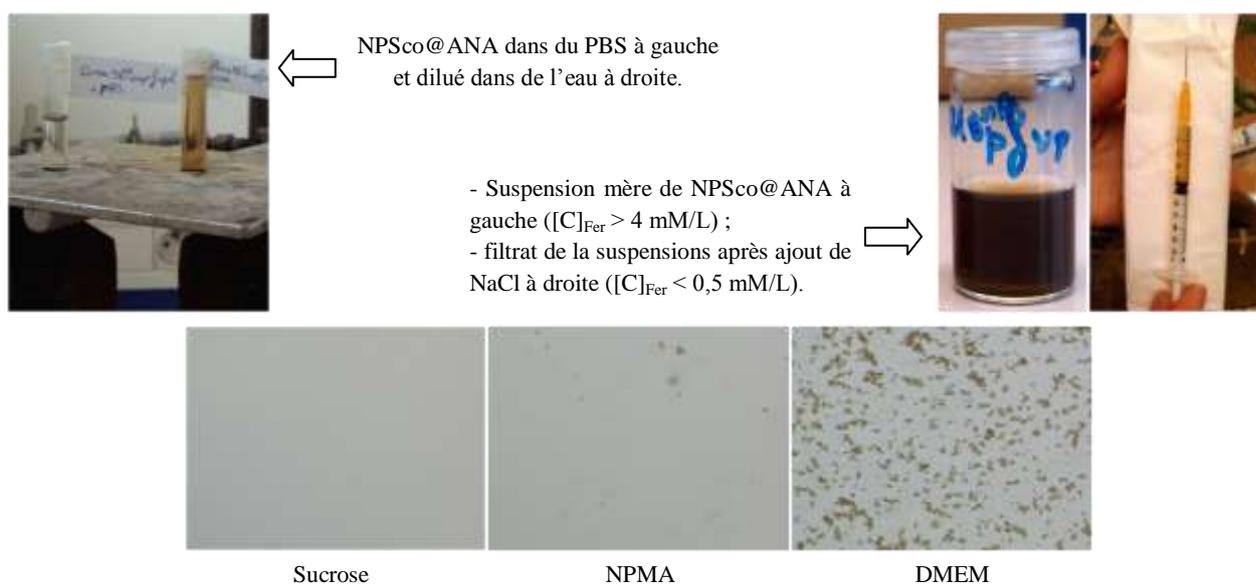


Figure 121 : - micrographie optique des agglomérats formés dans différents milieux physiologiques à  $t = 30$  minutes (en bas) ;  
- photos de suspensions sous champ magnétique après 5 minutes (0,34 T, en haut à gauche) ;  
- photos de la suspension avant et après filtration en milieu isotone (en haut à droite).

La filtration des suspensions mères de NPSco@ANA cinq minutes après la mise à l'isoosmolarité avec du NaCl conduit à des filtrats très limpides et clairs comparativement à la suspension initiale. L'injection *in vivo* de tels filtrats, trop peu concentrés en nanoparticules dendronisées (concentration en fer  $< 0,5 \text{ mM/L}$ ), ne peut donc pas permettre d'évaluer de manière fiable leur toxicité, sauf si le décès est observé rapidement (juste après injection), et d'observer une variation significative du contraste en IRM.

Le milieu NPMA et le milieu uniquement à base du sucrose ont été retenus pour les expériences suivantes *in vivo*. Le milieu isotone à base de NaCl n'a pas été exclu des futures expériences car l'utilisation de NaCl est actuellement le moyen le plus utilisé pour équilibrer l'osmolarité d'une suspension sans la rendre toxique.

## 2.1.2 La deuxième série de tests sur une plus large gamme de suspensions de nanoparticules dendronisées

Une deuxième série de tests a été réalisée avec des suspensions de NPSco@ANA, NPStd@ANA, NPSco@ANACOOH et de NPStd@ANACOOH. La stabilité des suspensions n'a été évaluée qu'après la mise à l'isoosmolarité avec du NaCl en observant la floculation ou non des suspensions avant et après filtration. Ces suspensions n'ont, en effet, pas pu être testées dans divers milieux physiologiques en raison des faibles quantités produites. Cependant, la mise à l'isoosmolarité étant un passage indispensable pour faire les expériences *in vivo*, il fallait connaître la stabilité de nos suspensions en présence de NaCl.

Les résultats obtenus sont donnés dans le tableau suivant.

Tableau 35 : récapitulatif des observations faites.

	NPSco@ANA	NPSco@ANACOOH	NPStd@ANA	NPStd@ANACOOH
pH / aspect de la solution mère	7 / homogène	7,4 / homogène	7,2 / homogène	7 / homogène
Temps écoulé	Formation d'agrégats/agglomérats			
0 minutes (mise à l'isoosmolarité)	-	-	-	-
10 minutes	+	-	-	-
60 minutes	+++	+	+	-
Filtration 1 minute après mise à l'isoosmolarité	Filtrat limpide et incolore, filtre noir	Filtrat légèrement brun, filtre marron	Filtrat limpide et incolore, filtre noir	Filtrat légèrement brun, filtre marron
Possibilité d'injection	Non injectable	Injectable	Non injectable	Injectable

Les observations faites après la mise à l'isoosmolarité des différentes suspensions montrent que les nanoparticules greffées avec le dendron ANACOOH présentent la meilleure stabilité (Figure 122). Les nanoparticules greffées avec le dendron ANA sont plus instables, comme cela avait été observé précédemment avec NPSco@ANA, et forment rapidement des floculats qui ne passent pas l'étape de filtration. Comme cette floculation est également observée avec les nanoparticules issues de la décomposition thermique, nous pouvons en conclure que la meilleure stabilité en milieu isoosmolaire à base de NaCl des NPS@ANACOOH est due à la nature des dendrons greffés. La longueur et la charge du dendron ANACOOH contribue à améliorer la stabilité des nanoparticules dans les milieux isotones à base de NaCl. Cette hypothèse a été confirmée par des mesures DLS et des mesures de potentiel zêta ( la distribution de taille des nanoparticules en suspension et leur potentiel zêta ont été mesurés avant et après mise à l'isoosmolarité puis trente minutes après cette mise à osmolarité (Figure 122).

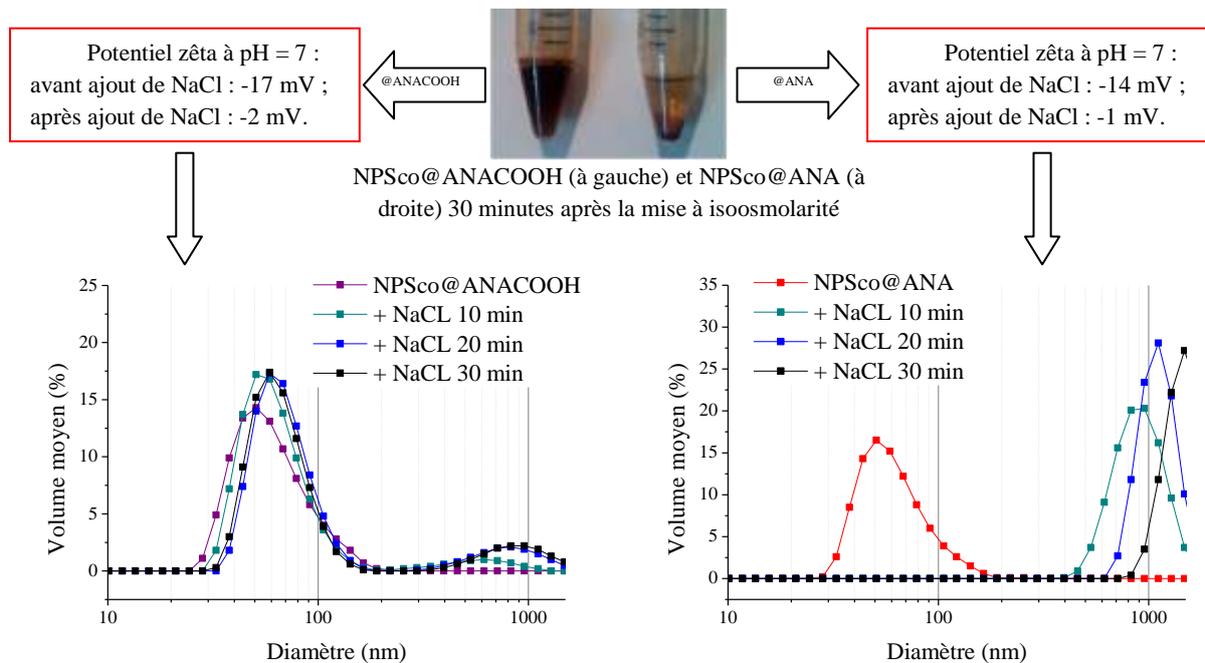


Figure 122 : évolutions de la valeur du potentiel zêta et de la distribution de taille des NPSco@ANA et des NPSco@ANACOOH après ajout de NaCl.

Les mesures après la mise à l'isoosmolarité révèlent que le potentiel zêta des NPSco@ANA et des NPSco@ANACOOH chute fortement après l'ajout de NaCl. La charge devient quasi nulle à pH = 7 ce qui résulte sûrement de l'adsorption de sodium  $\text{Na}^+$  à la surface des nanoparticules greffées. La stabilisation par répulsion électrostatique ne fait donc plus effet. Cet effet provoque la déstabilisation des nanoparticules dendronisées NPSco@ANA pour lesquelles nous observons une augmentation rapide de la distribution de taille : les nanoparticules dendronisées flocculent et sédimentent en formant de gros objets de taille supérieure à 900 nm de diamètre.

Par contre dans les cas des NPSco@ANACOOH, la distribution de taille augmente légèrement (de 50 à 60 nm), mais reste ensuite stable malgré cette chute du potentiel zêta. La taille du dendron ANACOOH permet donc de maintenir la stabilité des suspensions de NPSco@ANACOOH et des NPStd@ANACOOH dans les milieux isotones d'un point de vue stérique. Ces mesures de distribution de taille en suspension et de potentiel zêta confirment les observations faites sur la stabilité des suspensions dans les milieux physiologiques.

Nous remarquerons cependant que les suspensions à base de nanoparticules synthétisées par décomposition thermique semblent plus stables (Tableau 35, stabilité à 60 minutes) que celles à base de nanoparticules synthétisées par co-précipitation. Cela peut être attribué à la distribution en taille des suspensions de nanoparticules issues de la décomposition thermique : NPStd@ANA et NPStd@ANACOOH (centrées sur 30 nm), qui est plus « petite » que celle des suspensions des nanoparticules issues de la co-précipitation : NPSco@ANA et NPSco@ANACOOH (centrées sur 50 nm). Ainsi, les nanoparticules greffées avec le dendron ANACOOH ont pu être filtrées et des suspensions suffisamment concentrées et injectables ont ainsi été obtenues pour pouvoir mener des tests *in vivo*.

### 2.1.3 Bilan

Les tests de stabilité dans les milieux physiologiques ou isotone ont montré que les nanoparticules greffées avec le dendrons ANA ne sont pas stables. La modification de la force ionique induit leur

rapide floculation et sédimentation dans les milieux contenant des sels. Cette déstabilisation est attribuée à la diminution de leur potentiel zêta après adsorption des ions présents dans les milieux.

Nous avons pu cependant constater que les suspensions issues de nanoparticules synthétisées par décomposition thermique et dendronisées sont plus stables dans le temps et cela est attribué à leur distribution de taille en suspension plus faible que celles des nanoparticules issues de la co-précipitation. Enfin les nanoparticules greffées avec le dendron ANACOOH sont les plus stables dans les milieux contenant des sels, car leur stabilité est conservée malgré la chute du potentiel zêta grâce à la taille du dendron qui maintient une stabilité stérique. Les nanoparticules synthétisées par décomposition thermique et les dendrons ANACOOH présentent donc de nombreux points positifs pour obtenir des suspensions stables dans les milieux physiologiques.

## **2.2 Les tests de toxicité et les premières images IRM**

---

### **2.2.1 Les tests de toxicité et d'internalisation cellulaire**

---

La toxicité des nanoparticules dendronisées a été testée sur deux lignées de cellules humaines et animales. Elle a de plus été validée lors des essais d'injection de nos suspensions dans des petits animaux tels que des rats et des souris.

#### **A. Les premiers essais sur des cellules de rats avec les suspensions de NPSCO@ANA.**

---

Les premiers essais de toxicité ont été menés suite à nos premiers travaux sur la stabilité des NPSCO@ANA dans les milieux physiologiques : les suspensions de NPSCO@ANA sont très stables dans le milieu physiologique uniquement à base de sucrose et le NPMA. Des filtrats suffisamment concentrés avaient pu être ainsi obtenus. Deux lignées de cellules animales ont alors été testées : des DHD/K12 qui sont des cellules cancéreuses coliques du rat faciles à cultiver et à produire, des leucocytes T2 (LT2) qui sont des lymphocytes humains.

#### ***Protocole***

La toxicité des NPSCO@ANA a été testée à plusieurs concentrations par dilution de la suspension mère et des cellules dans du NPMA :

- du sucrose est dissout dans la suspension de NPSCO@ANA (106) (mélange NPS.SU). La concentration en fer de NPSCO@ANA (106) était de 5 mM/L, 514 mg de sucrose ont donc été dissouts dans 5 mL de notre suspension. Le mélange est filtré et conservé dans des conditions stériles avant de réaliser les incubations ;
- plusieurs dilutions de la solution NPS.SU sont préparées dans du NPMA pour atteindre les concentrations en fer suivantes : 0 (témoin) ; 0,5 ; 1 ; et 2,5 mM/L (milieu d'incubation). La solution NPS.SU a donc été diluée 2, 5 et 10 fois dans du NPMA ;
- les cellules DHD/K12 et LT2 sont extraites de leurs milieux de culture par centrifugation. Elles sont lavées une fois avec du NPMA par centrifugation ;
- les cellules sont ajoutées dans les différents milieux d'incubation et laissées incubées à 37°C pendant une heure (mise en contact) ;
- des images des milieux d'incubations sont prises par microscope optique pour évaluer le taux de mortalité cellulaire et savoir si l'expérience peut être poursuivie où non ;

- les cellules sont extraites des milieux d'incubation par centrifugation et replongées dans leur milieu de culture de départ ;
- elles y restent incubées pendant trois heures (temps de chasse).

A la fin de l'incubation, des images des cellules sont prises par microscope optique sur un support spécialement adapté pour leur comptage. Tous ces travaux sont effectués dans des conditions stériles.

### Les comptes

Les cellules sont marquées avec du bleu trypan qui est un colorant qui ne pénètre que les cellules mortes car leur membrane cellulaire s'est déchirée (Figure 123).

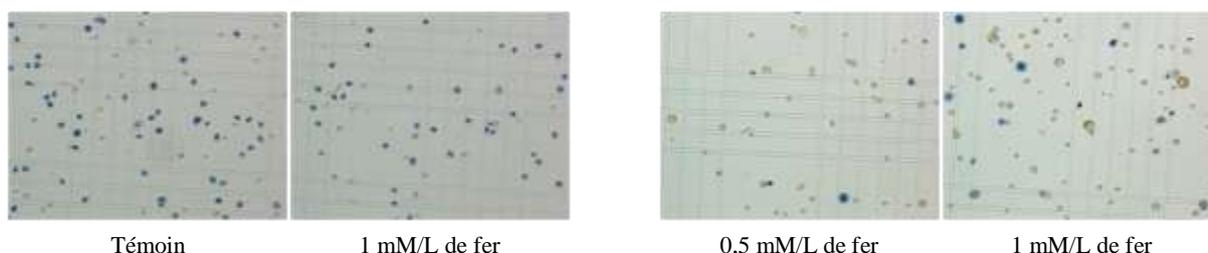


Figure 123 : images prises pour comptage par microscopie optique des cellules LT2 (à gauche) et DHD/K12 (à droite) après le temps de chasse.

Les tests effectués avec les leucocytes T2 n'ont pas pu aboutir car l'échantillon témoin présentait déjà une mortalité cellulaire supérieure à 90%. La forte concentration de sucrose ajoutée dans les milieux d'incubation a été mise en cause dans cette mortalité (Figure 123).

Les cellules DHD/K12, qui sont issues d'une lignée tumorale sont plus résistantes et ont donc mieux résisté à la forte concentration de sucrose. La mortalité de l'échantillon témoin étant très faible, les comptages ont pu être réalisés et sont donnés dans le Tableau 36.

Tableau 36 : récapitulatif des comptes effectués.

Concentration de fer en mM/L	Nombre de cellules vivantes / %	Nombre de cellules mortes / %		Nombre totale de cellules × facteur
		Réelle	Imputable aux NPSco@ANA en %	
0 (témoin)	633 / 89,3 %	633 / 10,7 %	0 %	$709 \times 10^3 \times 20$
0,5	591 / 87,9 %	633 / 12,1 %	2,1 %	$673 \times 10^3 \times 20$
1	602 / 81 %	633 / 19 %	9 %	$743 \times 10^3 \times 20$
2,5	605 / 77,9 %	633 / 22,1 %	12,1 %	$777 \times 10^3 \times 20$

Les tests de toxicité montrent que les NPSco@ANA ont une toxicité faible sur les cellules DHD/K12 jusqu'à une concentration en fer de 1mMol/L environ. Ensuite la toxicité augmente avec la concentration de nanoparticules dendronisées dans le milieu d'incubation. Ces résultats, bien qu'obtenus sur des lignées de cellules cancéreuses, sont encourageants.

### B. Les autres essais sur des cellules d'origine humaine avec des suspensions de NPSco@ANA, NPSco@ANACOOH, NPStd@ANA et NPStd@ANACOOH

Une deuxième série de tests de toxicité sur des cellules issues d'une lignée tumorale (cellules de glioblastome humain lignée U87) a été menée. Le protocole utilisé est le même sauf que la suspension a été mise à isoosmolarité avec du NaCl pour éviter le sucrose démontré précédemment comme étant

toxique. La mise à l'isoosmolarité et la filtration ont été faites dans un temps très bref pour limiter la perte de nanoparticules dans les filtres. Le fer a été dosé par ICP (Inductively Coupled Plasma) pour déduire la charge moyenne de fer par cellule.

Ces tests de toxicité ont été réalisés avec les NPSco@ANA, NPSco@ANACOOH, NPStd@ANA et les NPStd@ANACOOH. Les nanoparticules greffées avec le dendrons ANANH2 n'ont pas encore pu être testées. Les résultats obtenus sont récapitulés dans le Tableau 37.

Tableau 37 : récapitulatif des expériences et comptes effectués.

Suspensions mères (S <sub>p</sub> M)	NPSco@ANA	NPSco@ANA COOH	NPStd@ANA	NPStd@ANAC OOH	
Composition du milieu d'incubation	S <sub>p</sub> M dilué 2 fois dans du NPMA	S <sub>p</sub> M dilué 20 fois dans du NPMA			
Concentration en fer des milieux d'incubations en mM/L	< 1,5	< 0,15	< 0,25	< 0,25	< 0,125
% de cellules mortes dans l'échantillon témoin	4 %	1,5 %	2,9 %	6 %	3 %
% de cellules mortes	7 %	4,5 %	5,9 %	9 %	6 %
% de cellules mortes imputables aux nanoparticules dendronisées	3 %	3 %	3 %	3 %	3 %
Masse de fer moyenne par cellule en pg	57,2	4,54	5,2	Non fait	5,2

Les tests menés avec nos nanoparticules dendronisées montrent une faible toxicité cellulaire avec un excès de mortalité très faible (3 %). Nous remarquons aussi que, à faible concentration en nanoparticules, la concentration moyenne en fer par cellule est faible, de l'ordre de 5 pg/cellule, sans différence entre les différentes suspensions. Les nanoparticules, quel que soit le type de dendron greffé, chargé ou non, ne semblent donc pas être internalisées par les cellules lorsqu'elles sont en faible concentration dans le milieu d'incubation. Cependant, le test réalisé avec les NPSco@ANA à plus forte concentration (colonne orange) montre que la concentration moyenne en fer par cellule est 10 fois plus élevée sans augmentation de la mortalité cellulaire.

Les tests de toxicité sur des cellules d'origine humaine sont eux aussi très encourageants, mais cette étude est encore à approfondir en menant des expériences avec de plus forte concentration en nanoparticules dendronisées. En effet, la mise à l'isoosmolarité avec du NaCl suivie de l'étape de filtration n'ont pas permis d'obtenir de plus fortes concentrations.

### C. Autres observations *in vivo*

Certaines des « meilleures » suspensions ont été injectées pour réaliser des images en IRM sur des petits animaux. Les premiers essais ont été réalisés avec nos suspensions filtrées après ajout de NaCl pour la mise à niveau de l'osmolarité. Les filtrats de nos suspensions, qui sont très limpides comparativement aux suspensions mères (Figure 124, concentration en fer < 0,5 mM/L), ont été injectés à deux reprises par doses de 200 µL à intervalle de 30 minutes.



Figure 124 : exemple de filtrat injecté pour faire les premières images IRM (NPSco@ANACOOH).

L'injection de nos suspensions (NPSco@ANA, NPSco@ANACOOH, NPStd@ANA et NPStd@ANACOOH) à de telles concentrations n'a causé aucun décès aussi bien chez les souris que chez les rats. Ces résultats sont encourageants et montrent que les suspensions injectées après filtration ne contiennent pas d'agrégats, cause de décès. Cependant, la faible concentration des suspensions injectées ne peut pas permettre de tirer une conclusion sur la toxicité *in vivo* de nos nanoparticules dendronisées.

D'autres injections ont été faites à plus fortes concentrations en optimisant la filtration des suspensions. En effet, nos nanoparticules dendronisées passent très bien à travers les filtres de 0,2µm avant l'ajout de NaCl. Des injections ont alors été menées en filtrant les nanoparticules dans des conditions stériles avant l'ajout de sel. La dose de sel nécessaire a ensuite été ajoutée pour atteindre l'équilibre osmotique à partir d'une solution saline adaptée et stérile. Des injections ont été réalisées sur des rats avec des doses de 1 mL. Elles ont été réalisées rapidement après l'ajout de NaCl et après vérification qu'aucune floculation n'est observée. Les résultats des injections sont donnés dans le Tableau 38.

Tableau 38 : injections des suspensions mères dans trois rats.

Suspension	NPSco@ANA	NPSco@ANACOOH	NPStd@ANA
			
Concentration de fer en mM/L	> 4	> 6	> 6
Décès	Non	Premier rat : non Deuxième rat : non Troisième rat : décès	Non

Les résultats de ces injections apportent un argument supplémentaire sur la faible toxicité des nanoparticules dendronisées.

Durant ces expériences, un fait intéressant a été mis en évidence : à savoir que nos nanoparticules dendronisées supportent mieux l'ajout de sel sous forme de solution saline plutôt que par dissolution directe de cristaux de NaCl. Ces suspensions restent stables plus longtemps et sont de suffisamment bonne qualité pour être injectées.

#### D. Bilan

Les tests de toxicité se sont révélés très prometteurs. Nos nanoparticules dendronisées ont présenté une très faible toxicité sur des cellules tumorales de rats et d'humains, mais aussi après injection sur des petits animaux. Ces études doivent être approfondies en améliorant d'un côté les concentrations utilisées lors des tests et de l'autre en utilisant d'autres types de cellules.

## 2.2.2 Les premières images IRM

Des images IRM ont été acquises après les injections réalisées dans le cadre de tests *in vivo* sur des rats pour connaître l'impact de nos nanoparticules sur le contraste d'organe. L'étude a ciblé l'observation du foie, des reins, de la vessie qui sont des organes dans lesquels les nanoparticules sont susceptibles d'être rapidement captées ou éliminées. Les acquisitions ont été faites durant 90 minutes pendant lesquelles le rat est sous anesthésie générale.

Ces images ont été réalisées avec les séquences IRM suivantes : pour les images pondérées T1 il s'agit d'une séquence MSME avec TR/TE = 400/10,24); pour les images pondérées T2 c'est une séquence MSME TR/TE = 2000/70).

Les premières acquisitions ont été réalisées lors des injections de nos suspensions à forte concentration (NPSCO@ANA, NPSCO@ANACOOH et NPSTD@ANA, Tableau 38). Aucun changement de contraste n'a été observé sur les organes ciblés avec les NPSCO@ANA et les NPSCO@ANACOOH.

Une hypothèse est que les nanoparticules ont été rapidement éliminées dans les urines. Cette hypothèse est renforcée par l'observation avec les NPSTD@ANA d'une baisse du signal dans la zone pyélocalicielle (entrée d'un rein) au bout de trois minutes (Figure 125).

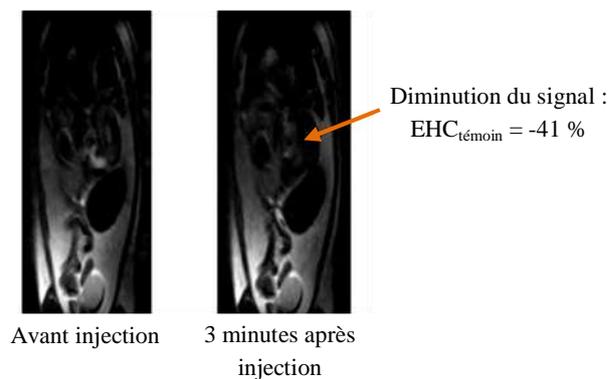
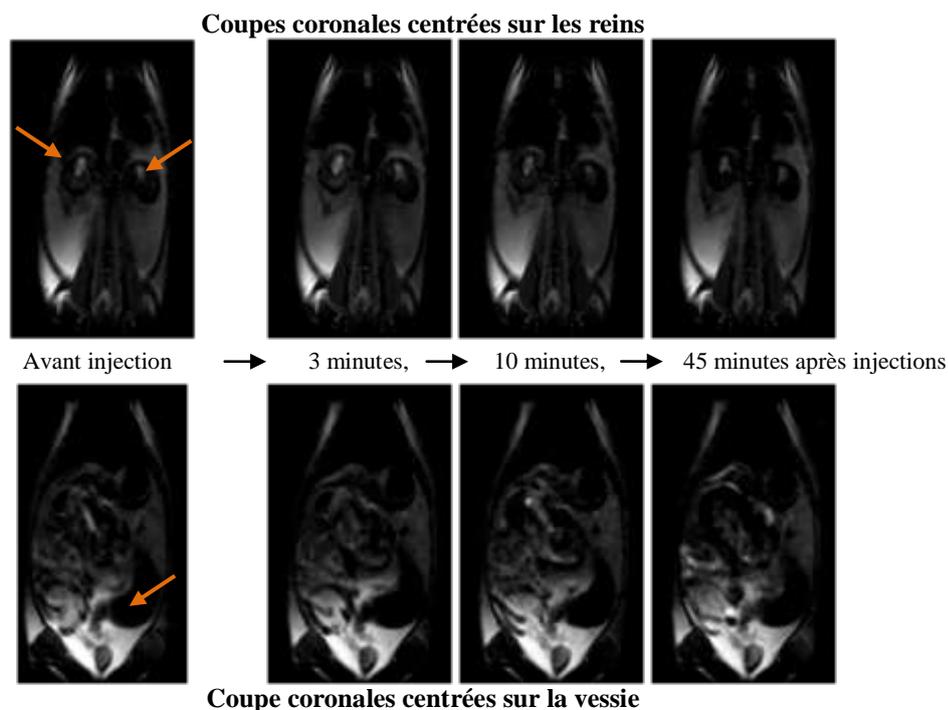


Figure 125 : image de la zone pyélocalicielle d'un rat avant et après injection de NPSTD@ANA (EHC calculé par rapport à l'image témoin avant injection).

Une deuxième série d'acquisition a été réalisée avec des suspensions moins concentrées (Figure 124, concentration en fer < 0,5 mM/L) de NPSTD@ANACOOH, de NPSTD@ANA, de NPSCO@ANA et de NPSCO@ANACOOH. Aucune variation du contraste n'a été observée avec les NPSCO@ANA, les NPSCO@ANACOOH et les NPSTD@ANA. Ceci peut être la conséquence de la faible concentration en fer des suspensions injectées.

Seules les NPSTD@ANACOOH ont conduit à l'observation d'une augmentation d'un contraste noir visible après leur injection. La diminution du signal a été observée au niveau des reins avec une baisse qui semble maximale vers la dixième minute après injection (Figure 126). Aucune modification de contraste n'a été observée au niveau de la vessie. Des problèmes de synchronisation d'appareil de mesure avec la respiration du rat a rendu impossible une analyse quantitative de la variation du contraste.



*Figure 126 : image des reins (au dessus) et de la vessie (au dessous) d'un rat avant et après injection de NPStd@ANACOOH.*

Ces images IRM apportent un argument supplémentaire sur l'hypothèse que nos nanoparticules dendronisées sont rapidement éliminées vers le système urinaire (rein vessie). Cette hypothèse semble correcte pour les NPStd dendronisées, mais reste à vérifier pour les NPSco dendronisées. En effet, comme aucune variation du contraste n'a été observée, et ce même dans la vessie, il est probable, compte tenu de leur distribution de taille plus grande (centrée 50 nm), qu'elles ont été captées par des cellules du foie. L'IRM ayant un champ limité d'exploration, cette dernière hypothèse n'a pas pu être encore vérifiée. L'évaluation de la biodistribution de nanoparticules dendronisées est donc difficile et devra donc être reconduite en imageant plus d'organes et/ou en utilisant des nanoparticules couplées à un fluorophore pour les suivre par imagerie optique. Des essais préliminaires avec des nanoparticules NPStd@ANACOOH sur lesquelles nous avons couplé un fluorophore via la fonction COOH montrent que très peu de nanoparticules sont observées dans les reins mais que des signaux sont observés dans le foie. Ces études doivent être approfondies.

## 2.3 Conclusion

---

Les nanoparticules dendronisées ont donné des résultats très encourageants pour leurs applications dans le domaine biomédical. Les mesures de relaxivité  $r_2$  à 1,5 T et à 7 T ont montré que les nanoparticules dendronisées représentent un concept intéressant pour développer des agents de contraste négatifs. Les valeurs de relaxivité mesurées sont supérieures à celles de nombreux autres agents de contraste référencés dans la littérature et nous avons pu voir que l'état d'agrégation des nanoparticules a un grand impact sur la relaxivité : les relaxivités diminuent avec la taille des nano-objets en suspensions. Les images fantômes de nos suspensions obtenues sous champ de 7 T ont confirmé les résultats des premières études sur la relaxivité. Ces expériences ont montré que nos suspensions restent stables sous un champ très intense et que leur relaxivité ne « s'écroule » pas sous son influence. Cependant, les différences observées lors des mesures de relaxivité à 1,5 T sont moins visibles à 7 T.

Les tests de stabilité dans les milieux physiologiques ou isotones ont montré que les nanoparticules greffées avec le dendrons ANA ne sont pas stables. Cette déstabilisation est attribuée à la diminution de leur potentiel zêta après adsorption des ions présents dans les milieux. Nous avons pu cependant constater que les nanoparticules synthétisées par décomposition thermique et fonctionnalisées avec les dendrons ANACOOH présentent de nombreux points positifs pour obtenir des suspensions stables dans les milieux physiologiques : stabilité dans le temps, distribution de taille, etc.

Enfin, les nanoparticules dendronisées ont présenté une très faible toxicité sur des cellules tumorales de rats et d'humains et aussi après injection dans des petits animaux. Ces premiers tests de toxicité sont encourageants cependant, ces études doivent être approfondies car les concentrations utilisées lors des tests étaient faibles et ont limité le champ des études.

Les premières images IRM n'ont pas permis de conclure sur la biodistribution des nanoparticules dendronisées après leur injection. Une baisse du signal a été observée dans la zone pelvienne et les reins après injection des suspensions de NPStd@ANA et NPStd@ANACOOH respectivement. Ceci montre que les nanoparticules sont éliminées au bout d'un certains temps ce qui est encourageant du point de vue de la toxicité. La biodistribution des NPSc@ANA et NPSc@ANACOOH n'a pas encore été établie. Des travaux complémentaires d'imagerie optique, après greffage d'un fluorophore, et éventuellement la scintigraphie, après marquage radioactif, sont à réaliser pour évaluer la biodistribution.





# CONCLUSION GENERALE



L'objectif des travaux de cette thèse consistait à concevoir des suspensions stables et concentrées de nanoparticules « dendronisées » et de tester leur utilité dans le domaine de l'imagerie biomédicale et plus particulièrement en tant qu'agent de contraste négatif pour l'IRM. Nous avons montré dans ce manuscrit que la conception d'un agent de contraste négatif compétitif n'est pas simple car elle concerne tout aussi bien des problématiques liées à la chimie, qu'à la physique et la biologie. Il faut prendre en compte de nombreux paramètres pour respecter le cahier des charges imposé par le domaine biomédical et dans ce contexte, nous avons remarqué que l'association des dendrons avec les nanoparticules magnétiques, encore peu étudiée, peut conduire à des nano-objets à très fort potentiel. Les principaux résultats obtenus dans le cadre de cette thèse sont résumés ci-dessous.

### ***Résultats sur la caractérisation des nanoparticules d'oxyde de fer et des dendrons***

Deux méthodes de synthèse ont été employées pour obtenir des nanoparticules de petites tailles : la co-précipitation et la décomposition thermique. Ces deux méthodes de synthèse ont permis d'obtenir des nanoparticules présentant des tailles similaires comprises entre 10 et 12 nm. L'ensemble des analyses effectuées converge vers une même composition de magnétite sous-stœchiométrique avec un état d'oxydation similaire. Les analyses Mössbauer ont montré que les nanoparticules synthétisées par décomposition thermique présentent une couche de surface cantée de spin plus épaisse que celle des nanoparticules synthétisées par co-précipitation. La présence de cette couche cantée serait à l'origine de la plus faible aimantation à saturation de ces nanoparticules. Une origine possible de cette forte couche cantée serait la présence du groupement carboxylate des molécules d'acide oléique qui les enrobent. Des molécules dendritiques avec différentes charges ont été synthétisées et caractérisées. Une caractérisation des molécules à différentes étapes de synthèse a permis d'identifier les bandes infrarouges des groupements phosphonates et a donc ouvert la possibilité d'identifier les types de complexes de surface après greffage.

### ***Mise au point d'une stratégie de greffage suivant le type de nanoparticules et la charge du dendron***

Le greffage des dendrons sur les nanoparticules synthétisées par co-précipitation a nécessité la mise au point d'une méthode spécifique de greffage. Ainsi, pour obtenir des suspensions stables, concentrées et avec une bonne distribution de taille, il a été nécessaire de favoriser la dispersion des nanoparticules durant la réaction de greffage tout en favorisant les attractions électrostatiques entre dendrons et nanoparticules. En adaptant les conditions de greffage et en tenant compte des pKas des groupements phosphonate, carboxylate et ammonium présents dans les dendrons synthétisés, ces derniers dendrons ont pu être greffés à la surface des nanoparticules.

Les greffages des dendrons sur les nanoparticules synthétisées par décomposition thermiques ont été optimisés et les meilleurs résultats ont été obtenus en utilisant un protocole de fonctionnalisation par échange de ligands et transfert de phase en tenant compte, comme pour le greffage direct sur les NPSCO, des pKas des trois dendrons.

Des suspensions concentrées et stables dans le temps de nanoparticules synthétisées par co-précipitation et par décomposition thermiques et dendronisées ont été obtenues avec les dendrons ANA et ANACOOH. Il n'a pas été possible d'obtenir des suspensions stables avec le dendron portant un groupement ammonium : les conditions de greffage du dendron ANANH<sub>2</sub> rendent le greffage par transfert de phase difficile.

Des analyses élémentaires et les dosages UV-visible, qui ont permis d'évaluer les taux de greffage, montrent que ceux-ci sont similaires pour un même dendron quelle que soit la méthode de synthèse

des nanoparticules. Nous avons pu voir, en étudiant plus précisément le greffage avec le dendron ANA, que les taux de greffage augmentent lorsque la concentration du milieu réactionnel augmente. Il atteint un maximum, avec un taux de recouvrement compris entre 90 et 100 %, et se stabilise lorsque la concentration initiale en dendron atteint 800 mg/L. Nous avons montré que le potentiel zêta des nanoparticules dendronisées augmente à pH= 7 avec le taux de greffage confirmant une stabilisation électrostatique à ce pH et que des suspensions concentrées en nanoparticules ont pu être obtenues. Cependant, la valeur du potentiel zêta inférieure à -30 mV ne justifie pas la stabilité en suspension observée pour les nanoparticules dendronisées ; en fait le greffage des dendrons ne permet pas qu'une stabilisation électrostatique.

### ***Conservation des propriétés des nano-objets magnétiques après greffage et étude des interactions dendron-surface des nanoparticules***

Après la réaction de greffage, les nanoparticules dendronisées se sont légèrement oxydées, mais leur cinétique d'oxydation devient plus lente. Cela est attribué à la présence du groupement phosphonate à leur surface qui les préserve de l'oxydation. Les analyses infrarouges et XPS ont montré que le complexe de surface formé est au moins bi-nucléaire. Les mesures de distribution de taille en suspension ont montré que les nanoparticules synthétisées par co-précipitation et dendronisées ont un diamètre hydrodynamique moyen supérieur (50 nm) à celui des nanoparticules synthétisées par décomposition thermique et dendronisées (30 nm). Ceci est la conséquence directe de leur état d'agrégation avant la réaction de greffage : les nanoparticules synthétisées par co-précipitation NPScO sont nues et agrégées tandis que les nanoparticules synthétisées par décomposition thermique NPStd@OA sont recouvertes d'acide oléique et bien dispersées. Nous avons vu cependant qu'il est possible d'atteindre des distributions de taille avec les suspensions de NPScO@ANA (NPScO@ANA (EL)) similaires à celles des suspensions de NPStd@ANA en appliquant un protocole de greffage plus complexe : greffage de molécules d'acide oléique sur les NPScO puis échange de ligands. L'étude réalisée sur les NPStd@OA et NPScO@OA a ainsi confirmé que la dispersion des nanoparticules avant le greffage a un impact important sur la distribution finale des nanoparticules dendronisées. Ainsi, le diamètre moyen des NPScO dendronisées par greffage indirect a été réduit à 30 nm au lieu de 50 nm dans les expériences de greffage direct.

Les greffages des dendrons via l'agent de couplage phosphonate ont permis de ne pas modifier l'aimantation à saturation des nanoparticules : les nanoparticules dendronisées, présentent une aimantation à saturation identique voire supérieure aux nanoparticules nues. La température de blocage des nanoparticules dendronisées diminue ce qui peut se traduire par une diminution des interactions dipolaires induite par le greffage de la molécule. Cette hypothèse est valable pour les NPScO@ANA car les NPScO sont nues avant greffage et sont fortement agrégées. Pour les NPStd@ANA, qui présentent un état d'agrégation légèrement supérieur après la réaction de greffage, cette hypothèse n'est pas plausible. La diminution de la température de blocage des NPStd@ANA pourrait être attribuée à une modification de la constante d'anisotropie magnétocristalline effective due à la présence du groupement phosphonate à leur surface.

### ***Evaluation préliminaire de l'intérêt de ces nano-objets en IRM***

Les nanoparticules dendronisées ont donné des résultats très encourageants sur les potentialités de leurs applications dans le domaine de l'IRM. Les mesures de relaxivité  $r_2$  à 1,5 T, à 7 T et les images fantômes ont conforté l'idée qu'elles représentent un concept très intéressant pour développer des agents de contraste négatifs. Les valeurs de relaxivité mesurées sont supérieures à celles de nombreux

autres agents de contraste référencés dans la littérature. Les expériences ont montré que nos suspensions restent stables sous un champ très intense et que leur relaxivité ne « s'écroule » pas sous son influence. Cependant, les différences observées lors des mesures de relaxivité à 1,5 T sont moins visibles à 7 T.

Les tests de stabilité dans les milieux physiologiques ou isotone ont montré que les nanoparticules greffées avec le dendrons ANA ne sont pas stables. Cette déstabilisation est attribuée à la diminution de leur potentiel zêta après adsorption des cations présents dans les milieux. Nous avons pu cependant constater que les nanoparticules synthétisées par décomposition thermique et fonctionnalisées avec le dendrons ANACOOH présentent de nombreux points positifs pour obtenir des suspensions stables dans les milieux physiologiques (stabilité dans le temps, distribution de taille, ...) : il semble que la taille du dendron ANACOOH (plus grande que celle du dendron ANA) apporterait des répulsions stériques suffisantes pour conserver la stabilité des nanoparticules dans les milieux physiologiques.

Nos nanoparticules dendronisées ont présenté une très faible toxicité sur des cellules tumorales de rats et d'humaines et également après injection à de petits animaux. Ces premiers tests de toxicité sont encourageants cependant, des études plus approfondies doivent être menées car les concentrations utilisées lors des tests étaient faibles et ont limité le champ des études. Les premières images IRM n'ont pas permis de conclure sur la biodistribution des nanoparticules dendronisées après leur injection. Une baisse du signal a été observée dans la zone pelvienne et les reins après injections des suspensions de NPStd@ANA et NPStd@ANACOOH respectivement. La biodistribution des NPSCO@ANA et NPSCO@ANACOOH n'a pas encore été établie. Des travaux complémentaires d'imagerie optique, après greffage d'un fluorophore, et éventuellement la scintigraphie, après marquage radioactif, sont en cours pour évaluer leur biodistribution.

Les résultats obtenus en IRM tendent donc à renforcer l'intérêt des nanoparticules synthétisées par décomposition thermique et dendronisées pour des applications biomédicales car elles présentent un très bon potentiel en tant qu'agent de contraste par leur gamme de taille, et semblent présenter un meilleur comportement *in vivo*.

### ***Les perspectives***

Les perspectives faisant suite à ces travaux et aux résultats encourageants obtenus sont nombreuses. Des études sont encore à réaliser avec les dendrons et les nanoparticules actuelles. En effet, les conditions de greffage du dendron ANANH<sub>2</sub> n'ont pas été optimisées. Un protocole doit être développé pour maximiser le taux de greffage avec ce dendron aussi bien sur les NPSCO que les NPStd@OA car la fonctionnalité de ce dendron est très attrayante pour des greffages ultérieurs de molécules vectrices. Un protocole de greffage indirect est à explorer.

La caractérisation des nanoparticules dendronisées doit être approfondie. L'analyse des spectres IR peut être affinée par des déconvolutions des bandes pour déterminer avec plus de précision la nature du complexe de surface. Il sera aussi très intéressant d'effectuer des mesures Mössbauer et XPS sur des échantillons frais pour caractériser le « canting » et la composition des nanoparticules, avant et après greffage, avec plus de suivi dans le temps.

Du point de vu biomédical, de nombreuses études sont encore à mener telles qu'injecter des suspensions plus concentrées, évaluer la biodistribution, tester la toxicité en fonction de la concentration en nanoparticules dendronisées. Des travaux ont déjà débuté sur l'internalisation des cellules en fonction de la charge périphérique du dendron.

D'autres études sur l'architecture moléculaire des dendrons sont à explorer en faisant varier la charge, la taille, la génération et le nombre de groupements fonctionnels à leur périphérie. Cela permettrait de réduire la distribution de taille des nanoparticules dendronisées, d'améliorer la stabilité des nanoparticules dans les milieux physiologique pour des études *in vitro* et *in vivo*.

La taille des nanoparticules peut aussi être modifiée : greffer les dendrons sur des nanoparticules plus petites pourrait permettre d'obtenir des agents de contraste très intéressants par leur gamme de taille, pour marquer des cellules, avoir une plus grande furtivité, ou passer des barrières physiologiques plus facilement ; greffer des dendrons adaptés sur des nanoparticules plus grosses pourrait permettre d'obtenir des nanoparticules intéressantes pour des applications comme l'hyperthermie.



# ANNEXE



# 1 Propriétés magnétiques des nanoparticules

## Introduction

Dans certains matériaux, les moments magnétiques atomiques sont corrélés entre eux par des interactions appelées interactions d'échange. Trois types d'ordre spontané (c'est-à-dire existant sans application d'un champ magnétique extérieur) différents peuvent exister :

- le ferromagnétisme, où les moments atomiques sont parallèles entre eux ;
- l'antiferromagnétisme, où les moments sont antiparallèles, avec compensation des moments ;
- le ferrimagnétisme, où les moments sont antiparallèles, sans compensation des moments.

Cet ordre existe en dessous d'une certaine température, appelée température de Curie ( $T_C$ ) pour les ferromagnétiques et température de Néel ( $T_N$ ) pour les ferrimagnétiques et antiferromagnétiques. Au dessus de cette température, l'ordre spontané disparaît et le matériau devient paramagnétique.

L'énergie totale d'un matériau magnétique peut s'écrire comme la somme de plusieurs contributions :

$$E = E_{éch} + E_a + E_d + E_Z$$

L'énergie d'échange ( $E_{éch}$ ) tend à aligner les moments voisins, c'est une interaction intense et de courte portée. L'énergie d'anisotropie ( $E_a$ ) tend à aligner les moments dans une direction particulière du matériau. L'énergie dipolaire ( $E_d$ ) est une contribution à longue distance qui tend à refermer le flux magnétique. Enfin l'énergie Zeeman ( $E_Z$ ) rend compte de l'interaction entre les moments et un champ magnétique externe.

Pour optimiser la contribution des différentes énergies, en particulier l'énergie dipolaire et l'énergie d'anisotropie, un matériau magnétique se divise en domaines magnétiques, appelés domaines de Weiss, et séparés par des parois, appelées parois de Bloch (Figure 127).

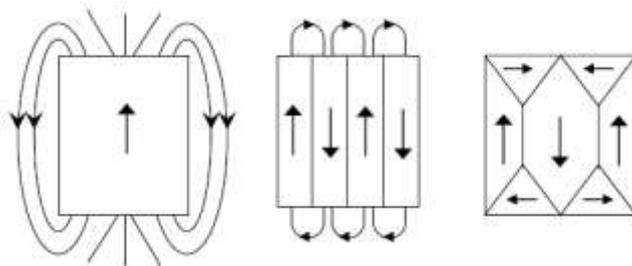


Figure 127 : diminution de l'énergie dipolaire par création de domaines.

Les moments magnétiques sont parallèles à l'intérieur de ces domaines et antiparallèles entre les domaines. Sous l'action d'un champ magnétique extérieur, les parois se déplacent, conduisant à une extension des domaines présentant la même orientation que le champ appliqué, aux dépens des autres domaines (Figure 128) Des défauts dans le cristal (dislocations, hétérogénéités, présence d'autres phases...) peuvent entraver le mouvement des parois et former des points d'ancrage. Un champ magnétique élevé sera alors nécessaire pour libérer les parois. Ce phénomène est à l'origine de l'apparition d'un cycle d'hystérésis observé lorsqu'on mesure l'aimantation d'un matériau en fonction du champ magnétique appliqué. Le cycle d'hystérésis est caractérisé par son aimantation rémanente  $M_r$ , son aimantation à saturation  $M_s$ , et par son champ coercitif  $H_c$  (Figure 128)

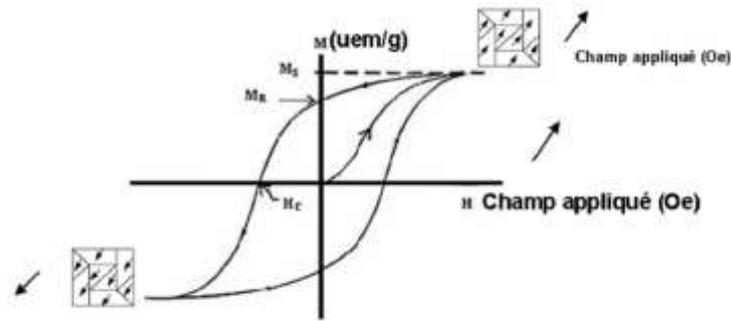


Figure 128 : cycle d'hystérésis de l'aimantation en fonction du champ magnétique appliqué ( $H$ ) où  $M_s$  est l'aimantation à saturation,  $M_r$  est l'aimantation rémanente et  $H_c$  est le champ coercitif. D'après Leslie-Pelecky et al.<sup>339</sup>.

Cependant, la création d'une paroi de Bloch coûte de l'énergie, et il existe donc un certain rayon limite  $r_c$  en dessous duquel la configuration la plus favorable sera un unique domaine dont l'aimantation sera orientée suivant une direction particulière, avec :

$$r_c = \frac{9\sqrt{AK}}{\mu_0 M_s^2}$$

où  $A$  est la constante d'échange,  $K$  la constante d'anisotropie,  $\mu_0$  la perméabilité du vide et  $M_s$  l'aimantation à saturation du matériau. Le rayon critique  $r_c$  est d'environ  $30 \text{ nm}$ <sup>340 341</sup>, mais ce rayon critique dépend en fait des conditions de synthèse, des interactions dipolaires et des valeurs dans la gamme  $30 - 120 \text{ nm}$  sont rapportées. La nanoparticule est dans ce cas composée d'un unique domaine magnétique dont l'aimantation à température ambiante est stable dans le temps : on parle de nanoparticule monodomaine bloqué. Le cycle d'aimantation est ouvert avec la présence d'un champ coercitif et d'une aimantation rémanente (Figure 129).

Lorsque le rayon de la nanoparticule diminue en dessous de  $r_0$ , l'énergie thermique à température ambiante devient suffisante pour faire fluctuer l'aimantation, et le cycle d'hystérèse est alors fermé, sans champ coercitif  $H_c$  ni aimantation rémanente  $M_r$  (Figure 129).

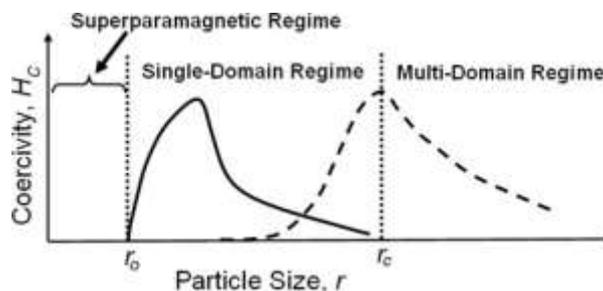


Figure 129 : variation du champ coercitif en fonction du rayon  $r$  de la nanoparticule : quand  $r > r_c$ , la nanoparticule est composée de plusieurs domaines magnétiques, quand  $r_0 < r < r_c$ , la nanoparticule est dans l'état monodomaine bloqué, quand  $r < r_0$ , la nanoparticule est dans l'état superparamagnétique. D'après Jeong et al.<sup>342</sup>.

## Magnétisme d'une particule unique

### Anisotropie magnétocristalline

L'anisotropie magnétocristalline est liée à la structure cristallographique du matériau : il existe des directions cristallographiques dans lesquelles il sera plus facile d'aimanter le matériau, appelées axes de facile aimantation. Cette anisotropie peut être de type cubique ou uniaxiale, comme pour la magnétite qui présente un axe de facile aimantation suivant la direction [111] à température ambiante<sup>343</sup>. L'énergie associée s'écrit :

$$E_{an}^{uni} = K_1 V \sin^2 \theta + K_2 V \sin^4 \theta + \dots$$

avec  $K_1$  et  $K_2$  les constantes d'anisotropies au premier et second ordre, et  $\theta$  l'angle entre l'aimantation et l'axe de facile aimantation.

Les directions de facile aimantation sont déterminées par le signe de  $K_1$  et le rapport  $K_2/|K_1|$ . Pour  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ,  $K_1 = -2,5 \times 10^4 \text{ J.m}^{-3}$ , et  $K_2$  est négligeable<sup>344</sup>. Les directions faciles sont parallèles aux axes [110]. Pour  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ,  $K_1 = -1,35 \times 10^4 \text{ J.m}^{-3}$ , et  $K_2 = -0,28 \times 10^4 \text{ J.m}^{-3}$  à température ambiante<sup>345</sup>. La direction de facile aimantation est la direction [111].

Dans une particule monodomaine, on se limite souvent au premier ordre et on écrit alors l'énergie magnétocristalline comme :

$$E_{an}^{uni} = KV \sin^2 \theta$$

ce qui définit pour l'aimantation de la nanoparticule deux minima d'énergie ( $\theta = 0$  et  $\theta = \pi$ ) séparés par une barrière d'énergie  $E_B = KV$  à  $\theta = \pi/2$  ()

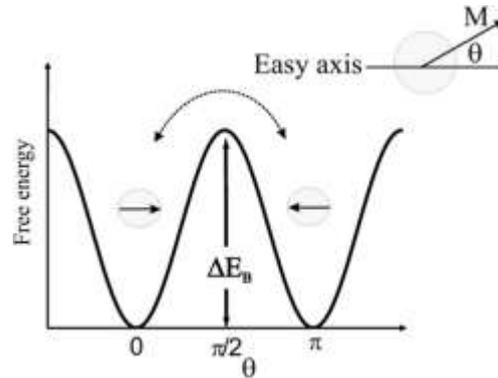


Figure 130 : description schématique de l'énergie libre d'une nanoparticule monodomaine avec une anisotropie uniaxiale en fonction de la direction d'aimantation. D'après Bedanta et al.<sup>346</sup>.

### Anisotropie de surface

Il est en général difficile de séparer les différentes formes d'anisotropie, et on utilise en pratique une constante d'anisotropie effective  $K_{eff}$ <sup>347</sup> qui regroupe les anisotropies de volume  $K_v$  et de surface  $K_s$  :

$$K_{eff} = K_v + \frac{S}{V} K_s = K_v + \frac{6}{d} K_s$$

pour une particule sphérique de volume  $V$ , de surface  $S$  et de diamètre  $d$ . L'anisotropie augmente donc quand le diamètre des nanoparticules diminue, comme on peut le voir sur la Figure 131.

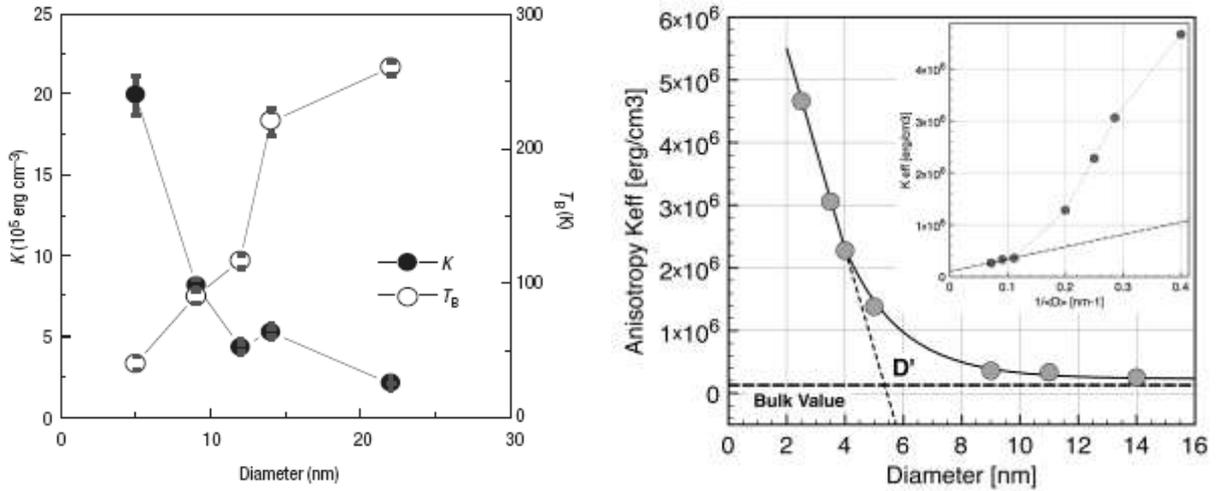


Figure 131 : évolution de la constante d'anisotropie effective en fonction du diamètre des nanoparticules (à gauche) d'après Park et al. (la constant d'anisotropie est représentée par les points noirs, l'échelle est à gauche)<sup>111</sup> et d'après Demortière et al. (à droite)<sup>121</sup>.

### Anisotropie de forme

Le champ démagnétisant  $H_d$  est le champ créé par l'aimantation du système considéré. Il s'écrit :

$$H_d = -NM$$

avec  $M$  l'aimantation du système et  $N$  le facteur démagnétisant. L'énergie dipolaire  $E_d$  est issue de l'interaction entre le champ démagnétisant et la distribution d'aimantation. Le champ démagnétisant dépend de l'orientation de l'aimantation par rapport à la forme de l'échantillon : on parle d'anisotropie de forme. L'énergie associée est donnée par :

$$E_{an}^{forme} = \frac{1}{2} \mu_0 V (N_x M_x^2 + N_y M_y^2 + N_z M_z^2)$$

avec  $N_x, N_y, N_z$  et  $M_x, M_y, M_z$  les composantes du facteur démagnétisant et de l'aimantation suivant les directions  $x, y$  et  $z$ , et avec  $N_x + N_y + N_z = 1$ .  $\mu_0$  est la perméabilité du vide, et  $V$  le volume du système. Dans le cas d'une particule sphérique, on a  $N_x = N_y = N_z = 1/3$ .

Dans tout système ouvert, non sphérique, et possédant une aimantation résultante non nulle, celle-ci tend à s'aligner selon la plus grande dimension. Une sphère uniformément aimantée ne présente pas d'anisotropie de forme, car les facteurs démagnétisant sont isotropes dans toutes les directions. Au contraire, dans une particule non sphérique, toutes les directions ne sont plus équivalentes, et l'aimantation sera plus facile suivant les directions les plus longues de l'échantillon, dans le plan d'un film ou le long d'un bâtonnet par exemple.

Le comportement d'une nanoparticule magnétique est régi par la coexistence de toutes ces énergies. Chaque énergie varie différemment en fonction de la température, du champ appliqué, de la forme et de la taille de la nanoparticule. Les propriétés magnétiques, et en particulier la dynamique de retournement de l'aimantation, vont donc dépendre de tous ces paramètres. Nous allons dans le paragraphe suivant aborder la notion de superparamagnétisme, qui est intimement liée à la dynamique de retournement de l'aimantation.

### Dynamique d'aimantation

Nous avons vu précédemment qu'une nanoparticule est constituée d'un seul domaine magnétique en dessous d'une certaine taille critique. En l'absence d'un champ magnétique extérieur, l'aimantation de cette particule sera orientée parallèlement ou antiparallèlement à l'axe de facile d'aimantation, ces deux configurations favorables étant séparées par une barrière d'énergie  $E_B$  (Figure 131) :

$$E_B = E_{\max} - E_{\min} = K_{\text{eff}} V$$

Néel a établi en 1949 que pour des particules suffisamment petites,  $KV$  devient inférieur à l'énergie thermique et l'aimantation se retourne ainsi spontanément d'une direction de facile aimantation à l'autre sans champ magnétique externe<sup>348 349</sup>. Selon la loi de Néel-Brown, ce retournement se fait avec un temps de relaxation caractéristique  $\tau$  :

$$\tau = \tau_0 \exp\left(\frac{KV}{k_B T}\right)$$

avec  $\tau_0 \sim 10^{-9}$ - $10^{-11}$  s,  $k_B$  la constante de Boltzman,  $K$  la constante d'anisotropie et  $V$  le volume de la nanoparticule. L'équation précédente indique que le temps de relaxation augmente lorsque la température diminue.

Pour une température suffisamment basse, ou bien pour une taille de nanoparticule suffisamment élevée,  $\tau$  est plus grand que le temps de mesure et l'aimantation apparait comme bloquée. On parle alors d'un état monodomaine bloqué.

A l'inverse, pour une température suffisamment haute, ou pour des nanoparticules de taille suffisamment petite, le temps de relaxation  $\tau$  est inférieur au temps de mesure  $\tau_m$ , on parle alors du régime superparamagnétique. Pendant le temps de mesure  $\tau_m$ , l'aimantation de la nanoparticule va fluctuer plusieurs fois et l'aimantation apparente sera nulle.

La température à laquelle on passe du régime superparamagnétique au régime bloqué (c'est à dire pour  $\tau = \tau_m$ ) est appelée température de blocage  $T_b$ . On obtient ainsi (équation TB) :

$$T_b = \frac{KV}{k_B \ln\left(\frac{\tau_m}{\tau_0}\right)}$$

La température de blocage  $T_b$  dépend de la taille de la nanoparticule, de l'anisotropie et du temps de mesure. En pratique, toutes les anisotropies participent à la dynamique de retournement de l'aimantation, et il faut donc prendre en compte l'anisotropie effective  $K_{\text{eff}}$  (comprenant l'anisotropie de surface) pour le calcul de la température de blocage.  $\tau_m$  est de l'ordre de  $10^{-10}$ - $10^{-7}$  s pour la spectrométrie Mössbauer, de  $10^{-5}$ -1 s pour des mesures en SQUID AC et de  $\sim 100$  s pour des mesures en SQUID DC (*SQUID* : *Superconducting Quantum Interference Device*). Lorsque la température de blocage est déterminée par SQUID DC, on utilise souvent  $\tau_m = 100$  s et  $\tau_0 = 10^{-9}$  s pour calculer l'énergie d'anisotropie, et l'équation précédente devient alors :

$$KV = 25k_B T_b$$

Il est important de noter que la température de blocage ne dépend pas seulement du matériau et des caractéristiques intrinsèques de la particule considérée (anisotropie, taille, ...), mais également de la méthode utilisée pour mesurer la température de blocage. De plus, si les particules ne sont pas parfaitement monodisperses, ce qui est en pratique toujours le cas, la distribution de taille résultera en une distribution de températures de blocage. Enfin, l'équation TB ne prend pas en compte les interactions entre les particules, alors que les interactions dipolaires ont un effet important sur la température de blocage.

### Effets de surface

La réduction de taille des nanoparticules entraîne une augmentation du rapport surface/volume, et les effets de surface peuvent devenir prépondérants pour les particules de petite taille. La rupture de la symétrie du réseau et une sous-coordination des atomes de surface entraînent une frustration et un désordre de spin à la surface de la particule ou dans une couche superficielle<sup>162 152 350 351 352 353 354 355</sup>. La conséquence de la réduction de taille est donc la présence d'une couche désordonnée avec un comportement magnétique de type verre de spin, induisant une déviation de la direction d'aimantation des atomes de surface par rapport à celle du volume de la particule, appelé « canting » de spin, qui conduit à une réduction de l'aimantation à saturation de la particule. Le « canting » de spin dépend de l'environnement de la nanoparticule, et il peut être modifié en fonction du type de liaison formée entre les molécules organiques et la surface de la nanoparticule<sup>162 152</sup>.

En 2009, Roca *et al.* ont montré que les nanoparticules synthétisées par décomposition thermique et recouvertes d'acide oléique présentaient un « canting » de spin négligeable, par comparaison aux nanoparticules issues de la coprécipitation<sup>152</sup>.

### Mesures magnétiques

Les propriétés magnétiques peuvent être évaluées en mesurant l'aimantation  $M$  de l'échantillon en fonction du champ magnétique appliqué  $H$  et en fonction de la température.

Pour des températures nettement supérieures à la température de blocage, l'aimantation en fonction du champ magnétique suit une loi de Langevin, et présente un cycle fermé. On s'éloigne de ce comportement modèle en se rapprochant de la température de blocage. En dessous de la température de blocage, on observe un cycle ouvert, avec la présence d'une aimantation rémanente  $M_r$  et d'un champ coercitif  $H_c$  qui augmentent lorsque la température diminue. On devrait en théorie observer, pour un ensemble de nanoparticules qui n'interagissent pas entre elles avec des axes de facile aimantation orientés aléatoirement, une aimantation rémanente égale à la moitié de l'aimantation à saturation ( $M_r/M_s=0,5$ ). Cependant, l'aimantation rémanente observée en pratique est toujours en dessous de cette valeur théorique<sup>356</sup>.

L'aimantation en fonction de la température peut se mesurer sous un champ permanent ou sous un champ alternatif. Lors des mesures sous champ alternatif, on applique un champ de faible intensité (quelques Oersted) à une fréquence donnée, et on mesure la susceptibilité magnétique  $\chi$ , qui est définie comme la pente de l'aimantation en fonction du champ magnétique. La susceptibilité peut se décomposer en une partie réelle  $\chi'$  et une partie imaginaire  $\chi''$  :

$$\chi = \frac{dM}{dH} = \chi' - i\chi''$$

$\chi'$  représente la part de la susceptibilité qui est en phase avec le champ magnétique appliqué et  $\chi''$  la partie en quadrature avec le champ appliqué.  $\chi''(T)$  présente un maximum à la température de blocage des nanoparticules, la position de ce maximum étant dépendante de la fréquence appliquée.

$\chi'(T)$  présente également un maximum à une certaine température dépendante de la fréquence du champ magnétique appliqué. La température du maximum de  $\chi''(T)$ , c'est-à-dire la température de blocage  $T_b$ , correspond au point d'inflexion de la courbe  $\chi'(T)$ .

L'aimantation peut aussi être mesurée sous un champ statique. On effectue en général cette mesure après avoir refroidi l'échantillon sans champ magnétique appliqué (*Zero Field Cooled*, courbe ZFC) et après avoir refroidi l'échantillon sous un champ magnétique (*Field Cooled*, courbe FC). La susceptibilité sous un champ statique (courbe ZFC) peut être assimilée à la mesure de  $\chi'$  dans la limite d'une fréquence infiniment faible, avec  $\chi'' = 0$ <sup>357</sup>. La courbe ZFC présente un maximum à une certaine température qui est souvent assimilée à la température de blocage des nanoparticules, bien que la température de blocage soit égale au maximum de  $\chi''(T)$ .

L'enregistrement de la susceptibilité en fonction de la fréquence appliquée ( $f$ ) permet de mesurer la température de blocage en fonction du temps de mesure  $\tau_m = 1/2\pi f$ , et ainsi de mesurer l'énergie d'anisotropie (voir équation TB)

Nous avons vu les principales propriétés magnétiques d'une nanoparticule isolée, ainsi que quelques techniques de caractérisation magnétique. Cependant, les nanoparticules ne sont généralement pas indépendantes et peuvent interagir par différents types d'interactions, en particulier par interactions dipolaires, ce qui peut modifier les propriétés des nanoparticules isolées. Elles influent en particulier sur l'aimantation rémanente, le champ coercitif et la température de blocage. D'une manière générale, plus les interactions dipolaires sont importantes, plus la température de blocage est décalée vers les hautes températures ; l'effet sur le champ coercitif et l'aimantation rémanente est moins clair, toutefois une réduction du champ coercitif est souvent observée<sup>287 358 359 360 361 362 363 364 365 366 367 368 369 370 371 372</sup>.

## 2 Les temps de relaxation

---

Pour pouvoir être en mesure d'explicitier ce que sont les temps de relaxation il faut définir le phénomène de résonance magnétique nucléaire sur lequel repose l'IRM<sup>373</sup>. Le principe de l'IRM est d'enregistrer les signaux des protons de l'eau car ils possèdent un moment magnétique intrinsèque élevé qui donne lieu à un phénomène de résonance très net. Ainsi, seul le noyau d'hydrogène joue un rôle important en imagerie aujourd'hui et on peut parler d'IRM « protonique ».

Les protons sont des particules chargées positivement (charge électrique de +1). Une particule qui tourne induit autour d'elle un moment cinétique ou « spin » que l'on représente par un vecteur  $\vec{S}$ . De même une charge qui tourne induit autour d'elle un champ magnétique appelé moment magnétique. Ce moment magnétique est représenté par le vecteur  $\vec{\mu}_\mu$  qui est le vecteur d'aimantation élémentaire microscopique. Le vecteur d'aimantation et le spin sont alignés sur l'axe de rotation de la particule (Figure 132). En l'absence de champ magnétique externe, les vecteurs d'aimantation d'une population de protons sont orientés de façon totalement aléatoire. La somme des vecteurs d'aimantation élémentaire microscopique est nulle et il n'y a donc pas de vecteur d'aimantation macroscopique :  $\vec{M} = \sum \vec{\mu} = 0$  (Figure 132).

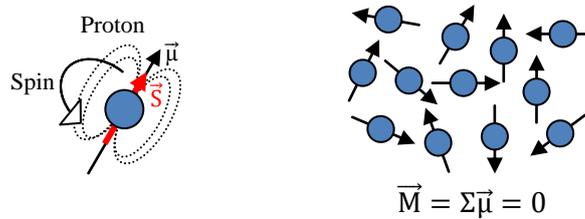


Figure 132 : schéma d'un proton (à gauche) et d'une population de proton (à droite) dont les moments magnétiques, soumis à l'agitation thermique, sont orientés aléatoirement.

Dès qu'un champ magnétique extérieur  $\vec{B}_0$  est appliqué (selon l'axe vertical Oz d'un espace à 3 dimensions par exemple) sur cette population, les vecteurs d'aimantation (soit les protons), ne peuvent avoir que deux orientations possibles. En effet, leurs moments cinétiques donc également leurs moments magnétiques ne peuvent avoir que deux valeurs quantifiées qui correspondent à deux niveaux d'énergie ( $E_1$  et  $E_2$ ) qui ont été créés par le champ magnétique (Figure 133).

Une partie des spins s'orientent alors dans le sens du champ  $B_0$  (parallèlement = état up = sur  $E_1$ ) et l'autre s'orientent dans le sens opposé (antiparallèlement = état down = sur  $E_2$ ). La statistique de Boltzmann a déjà montré que c'est le niveau  $E_1$  qui est le plus peuplé (surnombre). C'est une petite différence, de l'ordre de 2 protons pour 1 million (sous un champ de 0,5 Tesla à 37°C), mais elle va être à l'origine de l'apparition d'un vecteur d'aimantation macroscopique orienté dans le sens du champ appliqué :  $\vec{M}_{z_0}$  (à l'équilibre, Figure 133).

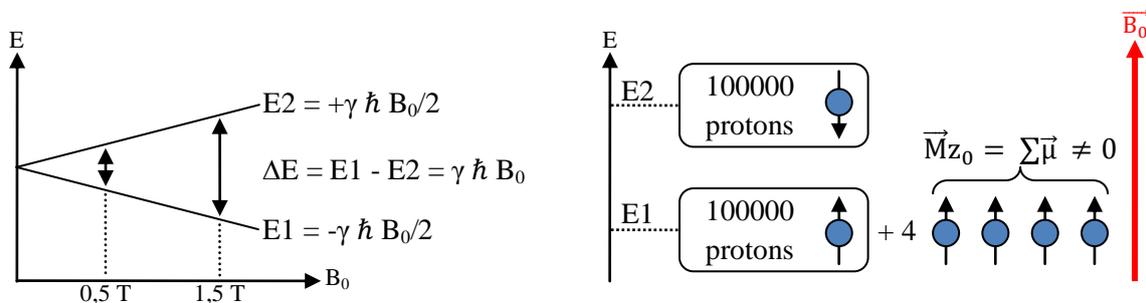


Figure 133 : - à gauche, la levée de dégénérescence des niveaux d'énergie est proportionnelle à l'intensité du champ  $B_0$  ( $\gamma$  est le rapport gyromagnétique spécifique à chaque noyau). Les moments magnétiques prennent  $2S + 1$  orientations soit deux orientations pour les protons dont le spin est de  $1/2$  par convention ;

- à droite, une population de 2 millions + 4 protons soumis à  $B_0$  va se répartir en deux populations, une de 1 millions de protons antiparallèles et l'autre de 1 millions + 4 protons parallèles.

Il faut savoir que les protons ne sont pas parfaitement alignés selon  $\vec{B}_0$ , mais tournent individuellement autour de celui-ci, avec un angle donné, à une fréquence dite de Larmor :  $\omega_0 = \gamma B_0$  ou  $\gamma$  est le rapport gyromagnétique spécifique à chaque noyau. Ils décrivent alors un cône autour de  $\vec{B}_0$ . Ainsi, à l'équilibre, le vecteur d'aimantation macroscopique  $\vec{M}_{z_0}$  a deux composantes :

- une composante dans le plan xOz de valeur  $\vec{M}_z$  dite longitudinale ;
- une composante dans le plan xOy de valeur  $\vec{M}_{xy}$  dite transversale.

La composante  $\vec{M}_{xy}$  est nulle en valeur absolue car les protons sont déphasés (Figure 134). En effet, à l'état d'équilibre chaque proton a son propre environnement et est soumis à des contraintes

d'inhomogénéité de champs d'origine moléculaire. Ils interfèrent alors avec des petits champs magnétiques locaux qui sont superposés au champ magnétique  $\vec{B}_0$ . C'est la présence de ces petits champs magnétiques qui est à l'origine du déphasage en fréquence de Larmor des protons (vitesse de précession légèrement inférieure ou supérieure à  $\omega_0$ ) et avec la non existence d'une aimantation transversale.

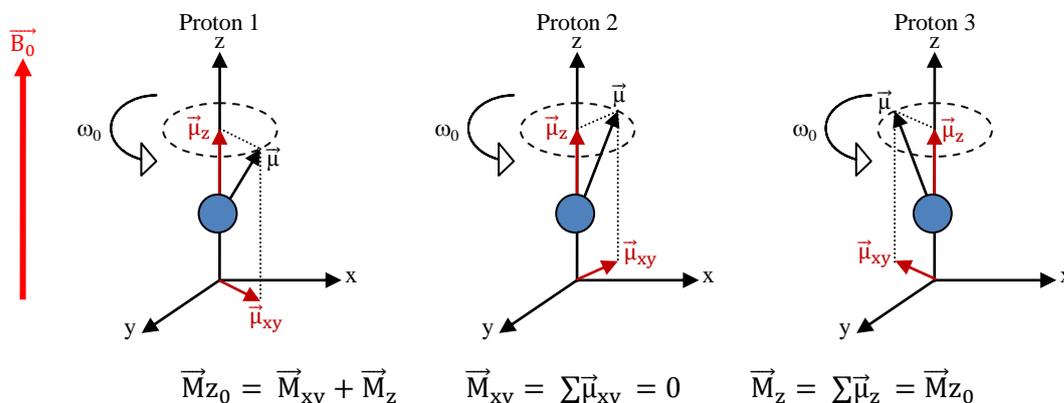


Figure 134 : exemple de 3 protons placés sur le niveau E1 (à un instant t) qui précessent en déphasage autour de  $\vec{B}_0$ .

Pour faire une mesure RMN un champ (électro-)magnétique  $\vec{B}_1$  pulsé et tournant est appliqué perpendiculairement à  $\vec{B}_0$  (il s'agit d'une onde électromagnétique dont seule la composante magnétique joue un rôle en RMN). Si la fréquence de rotation  $\omega_R$  du champ magnétique tournant est égale à la fréquence de Larmor il y a un transfert d'énergie (résonance magnétique), égal à  $\Delta E = E_1 - E_2$ , au système en état d'équilibre. Des protons du niveau de basse énergie  $E_1$  vont transiter vers le niveau de haute énergie  $E_2$ .

Lorsque la moitié des protons en surnombre sur le niveau E1 passe sur le niveau E2, les populations des deux niveaux s'égalisent. On parle alors d'impulsion à 90 ° où :

- la composante longitudinale  $\vec{M}_z$  diminue pour s'annuler ;
- lors de leur transition, les protons se mettent en phase et la composante  $\vec{M}_{xy}$  augmente pour atteindre une valeur maximale.

Quand le champ  $\vec{B}_1$  est supprimé (fin de l'impulsion), le système retourne à son état d'équilibre initial. Le temps que va remettre  $\vec{M}_z$  pour retrouver sa valeur maximale est appelé temps de relaxation longitudinale  $T_1$ . En revenant à l'état d'équilibre, les protons se déphasent et le temps que va mettre  $\vec{M}_{xy}$  pour s'annuler est appelé temps de relaxation transversale  $T_2$  (Figure 135).

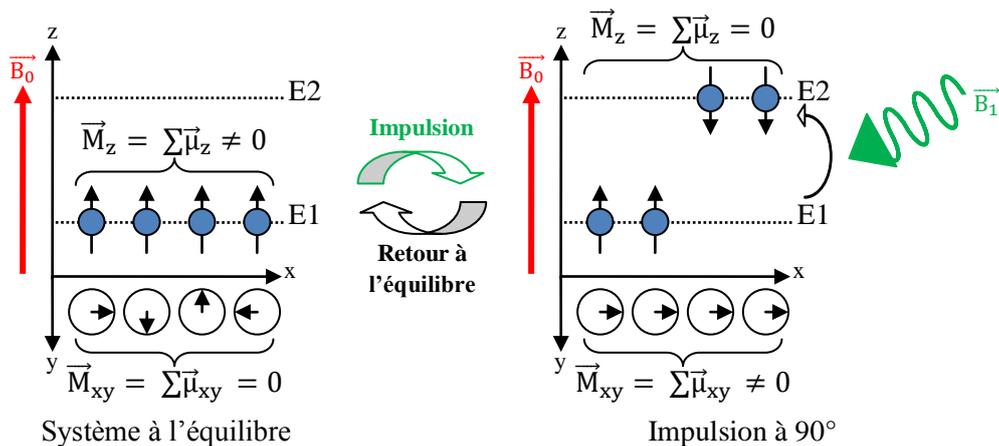


Figure 135 : - à gauche, avant l'impulsion avec  $\vec{B}_1$ , les quatre protons en surnombre sont alignés sur  $\vec{B}_0$  sans composante transversale car les protons sont déphasés ;  
 - à droite, l'impulsion entraîne une transition  $E1 \rightarrow E2$  et un rephasage des protons.

Dans la pratique, la mesure des temps de relaxation s'effectue par la mesure des variations des deux aimantations longitudinale et transversale. Pour faire ces mesures, une bobine ou antenne de réception est placée dans le plan transversal (xOy) et recueille un signal nommé FID pour Free Induction Delay ou signal d'induction libre.

Pour comprendre l'origine du signal de FID, il faut se rappeler que les vecteurs d'aimantations microscopiques des protons  $\vec{\mu}$ , tournent en décrivant des cônes autour de champ magnétique permanent  $\vec{B}_0$  (Figure 134, page 194). Après l'impulsion à  $90^\circ$ , l'aimantation transversale  $\vec{M}_{xy}$  qui est à son maximum tourne elle aussi et induit alors une onde de radiofréquence qui est transformable en signal électrique mesurable. Le signal de F. I. D. est l'onde de radiofréquence produite lors de la disparition de l'aimantation transversale à la fin de l'impulsion. Il décrit une sinusoïde amorti par une exponentielle de temps  $T_2$  (Figure 136)

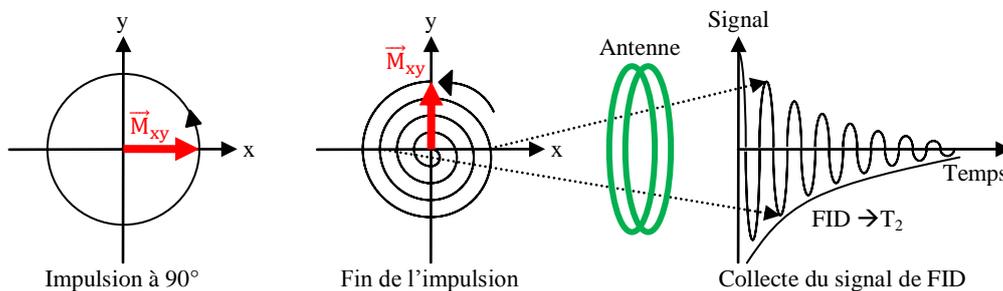


Figure 136 : - à gauche, pendant l'impulsion, l'aimantation transversale tourne en décrivant un cercle dans le plan xOy ;  
 - au centre, à la fin de l'impulsion, l'aimantation transversale se dissipe en décrivant une spirale ;  
 - à droite, le signal de FID est recueilli par l'antenne de réception.

Le signal de F.I.D ne décrit réellement pas une sinusoïde amortie par une exponentielle de temps  $T_2$ . En effet, le champ principal  $\vec{B}_0$  d'origine instrumentale n'est pas homogène à l'échelle microscopique et accentue, en plus des petits champs moléculaires locaux, les phénomènes de déphasage. Le signal de F.I.D décroît donc plus rapidement que prévu selon une exponentielle de temps  $T_2^*$  et non  $T_2$  ( $T_2^*$  est employé pour souligner la conjonction des deux effets d'inhomogénéité

de champs). En conséquence, le signal de FID est très faible et ne permet pas tel quel d'obtenir la vraie valeur de  $T_2$ . Pour accéder au vrai  $T_2$  une solution a été proposée dès 1955, bien avant l'avènement de l'IRM, par E. Hahn qui introduit la méthode l'écho-spin<sup>374</sup>. Cette méthode permet de se débarrasser des inhomogénéités propres au champ  $\vec{B}_0$ , elle ne sera pas détaillée dans ce manuscrit.

La mesure de l'aimantation longitudinale  $\vec{M}_z$  est elle aussi délicate. Effectivement, nous rappelons que l'antenne de réception est placée dans le plan transversal ce qui rend impossible la mesure directe de l'aimantation longitudinale car elle est orientée dans l'autre plan xOz. De plus, le champ principal  $\vec{B}_0$  est très intense et masque les faibles variations de  $\vec{M}_z$  qui se retrouve alors complètement indétectable. Pour pouvoir mesurer l'aimantation longitudinale, des méthodes de « saturation-récupération<sup>375</sup> » et « inversion-récupération<sup>376</sup> » ont été développées. Elles consistent à faire basculer  $\vec{M}_z$  dans le plan transversal xOy où est placée l'antenne de réception. Ainsi, comme pour l'aimantation transversale, le signal de FID de l'aimantation longitudinale est mesuré avec la méthode d'écho-spin pour remonter au vrai  $T_1$ .

### 3 Polarité de quelques solvants

---

Tableau 39 : indices de polarité pour différents liquides<sup>377</sup>,

Liquides	Indice de Polarité
Pentane	0,0
Hexane	0,1
Toluène	2,4
Dichlorométhane	3,1
Tétrahydrofurane (THF)	4,0
Acétone	5,1
Eau	10,2

### 4 La diffraction des rayons X

---

C'est une méthode de caractérisation macroscopique, non destructive et facile à mettre en œuvre. Elle donne des informations sur la cristallisation des matériaux, différentes selon la géométrie utilisée.

Dans les matériaux cristallisés, les atomes (qui sont des éléments diffusants) sont distribués de façon périodique suivant des plans. La périodicité des plans provoque une diffusion intense dans des directions discrètes (diffraction) lorsqu'un rayonnement traverse le cristal et se réfléchit sur les plans d'atomes. L'écart entre ces plans provoque en effet des interférences (onde en phase ou en déphasage) : on observe alors des pics caractéristiques du réseau cristallin. A l'échelle des atomes, la diffraction se produit quand la longueur d'onde du rayonnement est inférieure (ou égale) aux périodes ou paramètres a, b, c du réseau. Ceux-ci sont de l'ordre de quelques angströms, ce qui correspond à la diffraction des rayons X.

La diffraction des rayons X est basée sur la loi de Bragg ou la différence de marche optique entre les ondes diffusées par deux plans consécutifs est un nombre entier de longueur d'onde :

$$2d_{hkl}\sin\theta = n\lambda$$

- $d_{hkl}$  est la distance interréticulaire entre les plans de la famille  $\{hkl\}$  ;
- $\theta$  l'angle d'incidence des rayons X ;
- $n$  un entier ;
- $\lambda$  la longueur d'onde du rayonnement incident.

Pour les échantillons à base de Fe, il est préférable d'utiliser une anticathode de cobalt plutôt qu'une autre source pour que le bruit de fond lié à la fluorescence des atomes de Fe soit nettement inférieur. Les mesures sont réalisées à la température ambiante. Un schéma du montage expérimental est montré dans la figure suivante.

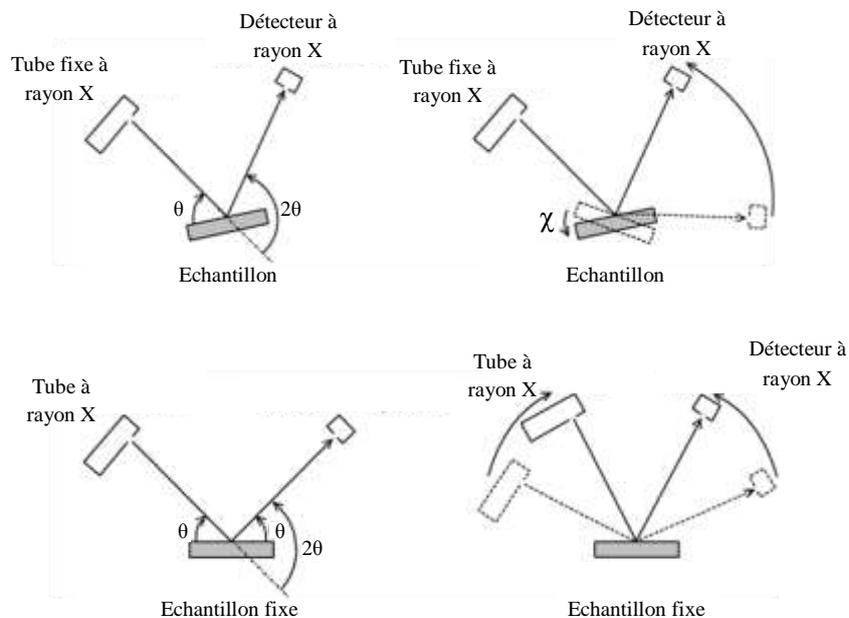


Figure 137 : représentation schématique d'un diffractomètre des rayons X en configuration  $\theta$ - $2\theta$  en haut et  $\theta$ - $\theta$  en bas.

$\theta$  est l'angle de Bragg,  $2\theta$  est l'angle entre la source et le détecteur. L'axe de rotation  $\omega$  est perpendiculaire au plan défini par la source, l'échantillon et le détecteur. C'est le mouvement du vecteur de diffraction par rapport à la normale de l'échantillon. Le mouvement de  $\chi$  décrit l'inclinaison de l'échantillon par rapport à l'axe horizontal.

Dans la configuration  $\theta$ - $2\theta$  : le tube à rayons X est fixe, l'échantillon bouge d'un angle  $\theta$  et le détecteur de rayons X d'un angle  $2\theta$ . C'est la configuration la plus courante, car le tube étant le dispositif le plus lourd et le plus encombrant, il est plus simple de le fixer. Dans la configuration  $\theta$ - $\theta$  : l'échantillon reste fixe (horizontal), le tube et le détecteur bougent de manière symétrique d'un angle  $\theta$ . Ceci permet de mesurer des poudres à des angles élevés (l'échantillon reste fixe), et facilite la mise en place de certains dispositifs comme un four autour de l'échantillon.

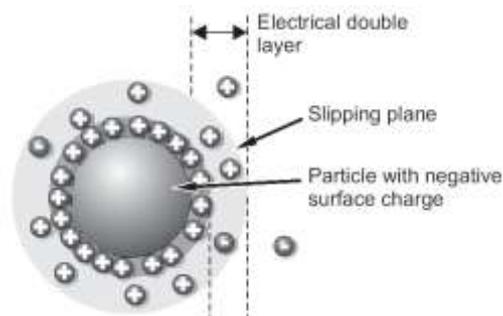
## 5 Le potentiel zêta

---

La valeur du potentiel zêta détermine l'état de dispersion des particules et la stabilité du colloïde dans la mesure où ce potentiel zêta est directement à l'origine des répulsions ou des attractions entre particules,

### *Présentation*

Autour de chaque particule, il existe une double couche électrique constituée d'ions de charge principalement opposée à celle de la particule (Figure 138). La couche interne, appelée couche de Stern, contient des ions fortement liés à la surface de la particule. En ce qui concerne la couche externe, elle est plus diffuse. A l'intérieur, il existe une frontière entre les ions liés ou non à la particule. Cette frontière est appelée plan de cisaillement et son potentiel est correspond au potentiel zêta.



*Figure 138 : Représentation schématique d'une particule entourée d'une double couche électrique et d'un plan de cisaillement (slipping plane).*

La valeur du potentiel zêta renseigne sur la stabilité potentielle du système colloïdal. Si toutes les particules en suspensions possèdent une valeur de potentiel fortement négative ou positive (généralement supérieure à +30 mV et inférieure à -30 mV), cela signifie que ces particules ont tendance à se repousser ou alors qu'elles n'ont pas tendance à précipiter. Cependant, si les particules possèdent une valeur de potentiel zêta faible, cela signifie qu'il n'y a aucune force permettant d'éviter aux particules de s'agréger ou de précipiter.

Un paramètre important affectant la valeur du potentiel zêta est le pH. En effet, plus le pH est élevé, plus le nombre de charges négatives est élevé et inversement (selon le matériau étudié), plus le pH est faible, plus le nombre de charges positives est élevé (selon le matériau étudié). Une valeur de potentiel zêta n'a donc aucun sens si on ne connaît pas le pH de la solution. Une courbe caractéristique du potentiel zêta en fonction du pH est donnée dans la Figure 139. Lorsque cette courbe admet une valeur nulle, on se situe au point isoélectrique, c'est-à-dire qu'il y a autant de charges positives que négatives autour de chaque particule et le système colloïdal se trouve dans l'état le moins stable.

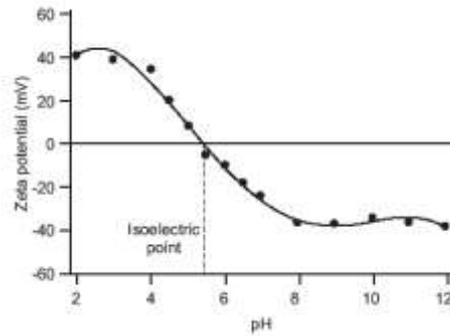


Figure 139 : courbe caractéristique du potentiel zêta en fonction du pH.

### Principe de la mesure

Le principe de la mesure est basé sur la mobilité électrophorétique : une électrophorèse est effectuée sur l'échantillon et la vitesse des particules est mesurée en utilisant un interféromètre laser à effet Doppler. L'équation de Henry permet ensuite d'obtenir le potentiel zêta :

$$U_E = \frac{2\varepsilon \cdot z \cdot f(Ka)}{3\eta}$$

- $z$  le potentiel zêta (mV) ;
- $U_E$  la mobilité électrophorétique ( $\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}/\text{V}\cdot\text{cm}^{-1}$ ) ;
- $\varepsilon$  la permittivité diélectrique de l'eau ( $\varepsilon = \varepsilon_0 \cdot D = 8,854 \cdot 10^{-12} \times 79 \text{ F}\cdot\text{m}^{-1}$ ) ;
- $\eta$  la viscosité de l'eau (à 25 °C,  $\eta = 8,95 \cdot 10^{-4} \text{ N}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}$ ) ;
- $f(Ka)$  la fonction d'Henry.

### Montage expérimental

Les mesures de potentiel zêta ont été effectuées par le même appareil utilisé pour la DLS. Le montage expérimental est donné dans la Figure 140. Une source laser illumine les particules contenues dans une cellule, le faisceau est préalablement séparé en deux par une lame séparatrice afin d'avoir un faisceau incident et un faisceau de référence. Un champ électrique impulsionnel est appliqué sur les particules situées dans la cellule capillaire parallélépipédique (figure 140 b). Les particules se déplacent vers l'électrode de charge opposée et leur vitesse est mesurée grâce un interféromètre laser à effet Doppler. La lumière réfléchiée à un angle de 17 ° est combinée au faisceau de référence. L'intensité de lumière détectée fluctue de façon proportionnelle à la vitesse des particules. Cette information est ensuite transmise au processeur et à l'ordinateur.

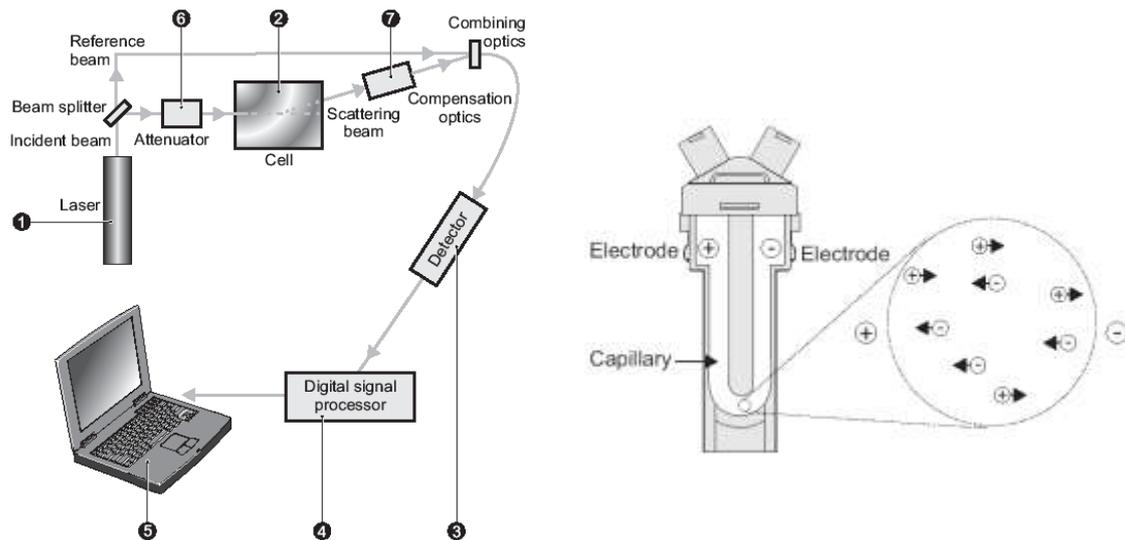


Figure 140 : représentation schématique (à gauche) du dispositif de mesure du potentiel zêta et (à droite) de la cellule capillaire électrophorèse.

## 6 La diffusion dynamique de la lumière

### Principe de la mesure

La technique de DLS (Dynamic Light Scattering) ou PCS (Photon Correlation Spectroscopy) permet d'obtenir la distribution en taille de particules colloïdales en suspension dans un milieu liquide dans une gamme de 1 nm à quelques micromètres de diamètre,

Le principe de la mesure est basé sur le mouvement Brownien : les particules à analyser sont dispersées dans un liquide, elles ne sont pas stationnaires mais perpétuellement en mouvement à cause des impacts des molécules de solvant sur la surface de la particule, les petites particules se déplaçant plus rapidement que les grosses, il est possible de calculer la taille des particules en fonction de leur vitesse.

La vitesse de déplacement des particules est définie par le coefficient de diffusion translationnel  $D$ , qui, d'après l'équation de Stokes-Einstein, est lui-même proportionnel au diamètre hydrodynamique de la particule sphérique :

$$r(H) = \frac{kT}{6\pi\eta D}$$

- $r(H)$  le rayon hydrodynamique de la particule sphérique ;
- $D$  le coefficient de diffusion translationnel ;
- $\eta$  la viscosité,  $k$  la constante de Boltzmann et  $T$  la température.

Le rayon hydrodynamique représente le cœur de la particule entouré de sa double couche de contre-ions (couche de solvation). Lorsque l'on augmente la force ionique du milieu environnant, cette double couche ionique est comprimée au point de faire varier le diamètre hydrodynamique. Il est donc nécessaire de réaliser les mesures en absence d'électrolyte afin d'éviter des courants de

convection induisant un mouvement parasite au mouvement brownien. La température de la cellule doit être stabilisée avec précision et la viscosité, dépendant de la température, doit aussi être connue. Pour obtenir des résultats corrects, les sols doivent rester stables durant la mesure, sinon le mouvement vertical des agglomérats se superpose aux mouvements browniens. Par ailleurs, il est nécessaire de travailler avec de suspensions extrêmement propres, car d'après la théorie de Rayleigh, l'intensité diffusée est proportionnelle au diamètre  $\times 10^6$  de la particule.

### Montage expérimental

Les mesures de DLS ont été effectuées par un nano-size MALVERN (nano ZS). Les particules sont illuminées par un laser et les fluctuations d'intensité de la lumière diffractée sont enregistrées (Figure 141). Les informations sont ensuite transmises à un corrélateur qui mesure le degré de similarité entre deux signaux sur une période de temps comprise entre une nanoseconde et une microseconde. Une fonction de corrélation est ainsi obtenue, elle dépend de la taille des particules (Figure 142). Lorsque ce sont des petites particules qui sont mesurées, l'intensité de la fonction de corrélation diminue rapidement car ces particules se déplacent rapidement. En revanche, lorsque ce sont de grandes particules qui sont mesurées, l'intensité de la fonction de corrélation diminue moins vite, du fait que ces particules possèdent un mouvement plus lent.

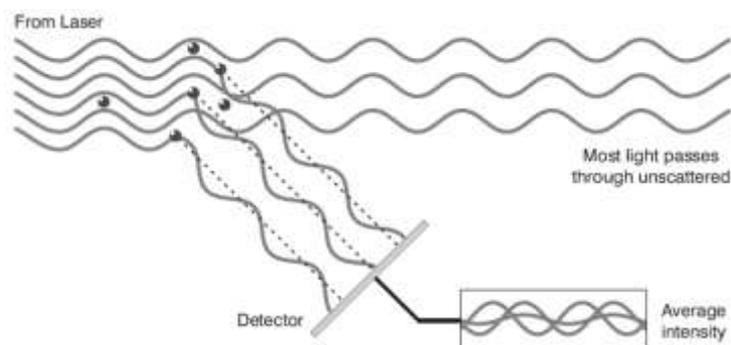


Figure 141 : Schéma de principe de la détection du signal émis par les particules<sup>378</sup>.

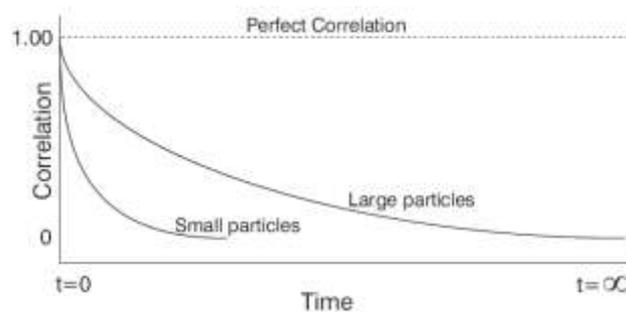


Figure 142 : courbes typiques des fonctions de corrélations pour différentes tailles de particules<sup>378</sup>.

Le logiciel utilise ensuite des algorithmes pour extraire les vitesses de décroissance de la fonction de corrélation et produire une distribution de taille en intensité, en volume ou en nombre. Une courbe caractéristique d'une distribution de taille en intensité pour des particules de plus de 500 nm de diamètre est présentée (Figure 143).

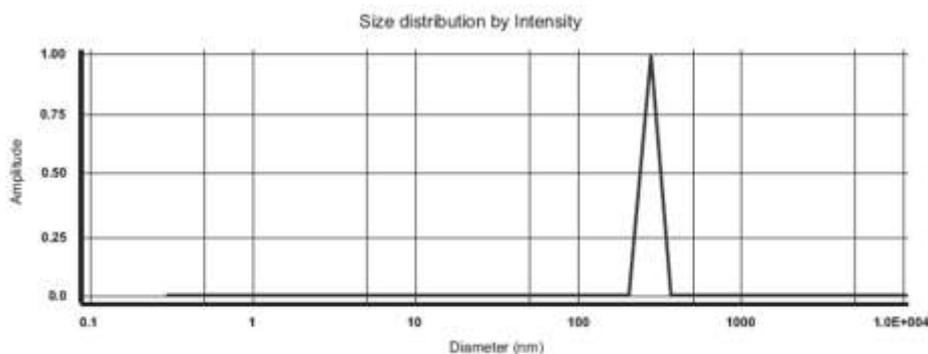
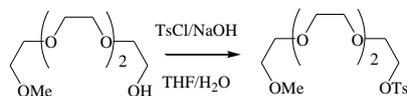


Figure 143 : courbe caractéristique de la distribution de taille en intensité<sup>378</sup>.

## 7 Protocole détaillé de la synthèse de dendrons

### 7.1 Synthèse du dendron ANA

#### Composé 1

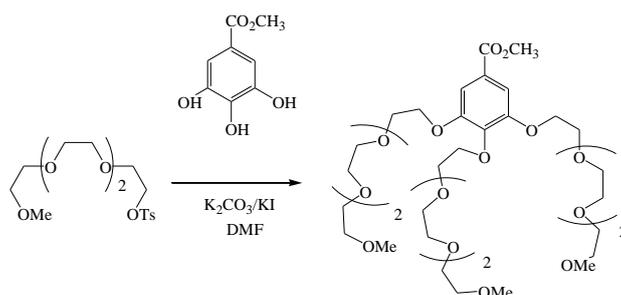


Une solution de chlorure de tosylo (32,00 g, 167,85 mmol) dans du THF (50 mL) est ajoutée goutte à goutte à une solution d'éther méthylique de tétraéthylèneglycol (25 g, 120,05 mmol) et d'hydroxyde de sodium (9,16 g, 229 mmol) dans un mélange THF et eau (175 mL, 25 mL respectivement) maintenu à 0°C. Le mélange est agité 48 h à T<sub>amb</sub>. Le milieu réactionnel est alors versé dans 200 mL d'une solution aqueuse saturée en NaCl. Le mélange est extrait plusieurs fois avec du CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Les phases organiques rassemblées sont lavées avec une solution aqueuse saturée en NaCl puis séchées sur MgSO<sub>4</sub>. Après filtration, le solvant est évaporé et le produit **1** pur est obtenu sous forme d'une huile incolore avec un rendement de 96 %.

**RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>)** : δ (ppm) = 2,44 (s, 3 H), 3,36 (s, 3H), 3,52-3,69 (m, 14 H), 4,15 (t, <sup>3</sup>J = 4,9 Hz, 2 H), 7,34 (d, <sup>3</sup>J = 4,3 Hz, 2 H), 7,78 (d, <sup>3</sup>J = 6,6 Hz, 2 H).

**RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>)** : δ (ppm) = 21,78, 59,14, 68,80, 69,45, 70,66, 70,73, 70,86, 72,07, 128,10, 129,99, 133,19, 144,96.

## Composé 2

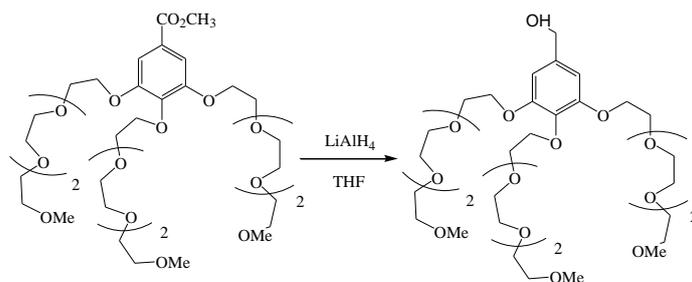


Une solution de **1** (22,64 g, 62,47 mmol), de 3,4,5-trihydroxybenzoate de méthyle (3,31 g, 17,97 mmol) et de  $K_2CO_3$  (24,88 g, 180,02 mmol) dans du DMF (100 mL) est chauffée à 80°C pendant 72 heures. Le milieu réactionnel est filtré sur célite, le filtrat est alors évaporé et le résidu est mis en solution dans  $CH_2Cl_2$  et lavé 3 fois avec une solution aqueuse saturée en NaCl. La phase organique est séchée sur  $MgSO_4$ , filtrée et concentrée sous pression réduite. Après purification par colonne de chromatographie ( $SiO_2$ ,  $CH_2Cl_2/4\%$  MeOH) le composé **2** est obtenu sous forme d'une huile jaune avec un rendement de 71%.

**RMN  $^1H$  ( $CDCl_3$ )** :  $\delta$  (ppm) = 3,37 (s, 9 H), 3,52-3,87 (m, 42 H), 3,88 (s, 3 H), 4,12 – 4,44 (m, 6 H), 7,29 (s, 2 H).

**RMN  $^{13}C$  ( $CDCl_3$ )** :  $\delta$  (ppm) = 52,0, 58,87, 68,80, 69,51, 70,24, 70,39, 70,43, 70,46, 70,48, 70,51, 70,71, 71,82, 72,31, 72,43, 108,98, 124,83, 142,54, 152,20, 166,41.

## Composé 3

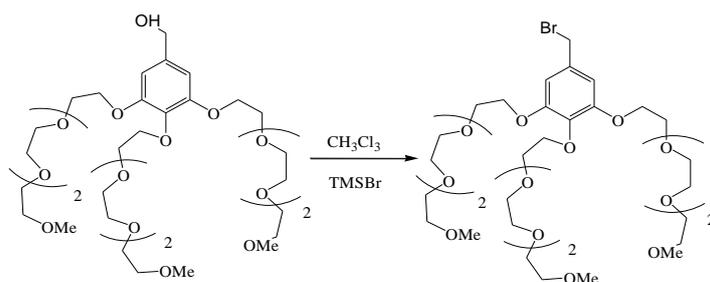


16,0 mL (15,98 mmol) d'une solution de  $LiAlH_4$  1M dans du THF sont ajoutés goutte à goutte à une solution de **2** (9,06 g, 12,00 mmol) dans du THF anhydre (20 mL) maintenue sous argon et refroidie à 0°C. Le mélange est agité 20 heures à  $T_{amb}$ . La réaction est arrêtée par ajout successif de 7 mL d'acétate de méthyle, 7 mL de MeOH puis 7 mL d' $H_2O$ . Le milieu réactionnel est filtré sur célite, le filtrat est évaporé à sec et le résidu est repris dans  $CH_2Cl_2$  et lavé 3 fois avec une solution aqueuse saturée en NaCl. La phase organique est séchée ( $MgSO_4$ ), filtrée, évaporée. Le composé **3** est obtenu sous forme d'une huile légèrement jaune avec un rendement de 95%.

**RMN  $^1H$  ( $CDCl_3$ )** :  $\delta$  (ppm) = 3,33 (s, 9H), 3,42-3,82 (m, 42 H), 4,11 (m, 6 H), 4,53 (s, 2 H), 6,59 (s, 2 H).

**RMN  $^{13}C$  ( $CDCl_3$ )** :  $\delta$  (ppm) = 58,85, 61,54, 64,74, 68,73, 69,60, 69,68, 70,16, 70,36, 70,46, 70,54, 70,65, 71,80, 72,16, 72,50, 106,35, 136,93, 137,49, 152,51.

## Composé 4

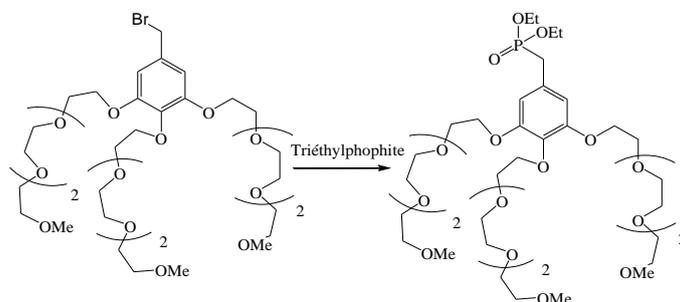


TMSBr (1,42 mL, 10,53 mmol) est ajouté goutte à goutte à une solution de **3** (6,12 g, 8,42 mmol) dans  $\text{CHCl}_3$  anhydre (10 mL) maintenue sous argon et refroidie à  $0^\circ\text{C}$ . Après 48h d'agitation à  $T_{\text{amb}}$ , les substances volatiles sont évaporées. Le composé **4** est obtenu pur sous forme d'huile marron avec un rendement de 92%.

**RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ )** :  $\delta$  (ppm) = 3,34 (s, 9 H), 3,52-3,83 (m, 42 H), 4,09-4,14 (m, 6 H), 4,38 (s, 2 H), 6,60 (s, 2H).

**RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ )** :  $\delta$  (ppm) = 58,85, 61,54, 64,74, 68,73, 69,60, 69,68, 70,16, 70,36, 70,46, 70,54, 70,65, 71,80, 72,16, 72,50, 106,35, 136,93, 137,49, 152,51.

## Composé 5

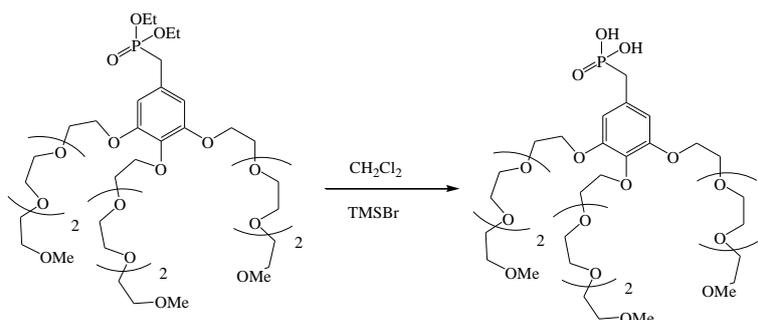


**4** (2,28 g, 2,89 mmol) est chauffé 2h à  $140^\circ\text{C}$  en présence de triéthylphosphite (0,79 mL, 4,62 mmol). Les substances volatiles sont évaporées et le composé **5** est obtenu pur sous forme d'une huile marron avec un rendement de 99%.

**RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ )** :  $\delta$  (ppm) = 1,24 (t,  $^3\text{J} = 7,0$  Hz, 6 H), 3,03 (d,  $^2\text{J} = 21,5$  Hz, 2 H), 3,36 (s, 9 H), 3,52-3,84 (m, 42 H), 3,95-4,13 (m, 6 H), 6,51 (d,  $^4\text{J} = 2,4$  Hz, 2 H).

**RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ )** :  $\delta$  (ppm) = 16,35, 33,64, 58,94, 62,17, 68,79, 69,65, 70,32, 70,45, 70,53, 70,59, 70,74, 71,87, 72,25, 109,38, 126,69, 137,39, 152,47.

## ANA



TMSBr (1,06 mL, 7,80 mmol) est ajouté à une solution de **5** (2,46 g, 2,89 mmol) dans 50 mL de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  anhydre. Après 48h d'agitation à  $T_{\text{amb}}$ , les substances volatiles et le solvant sont évaporés, puis, après ajout de MeOH, une seconde évaporation à sec est menée. Le dendron ANA est obtenu sous forme d'une huile marron avec un rendement de 94 % et peut être utilisée sans autre purification.

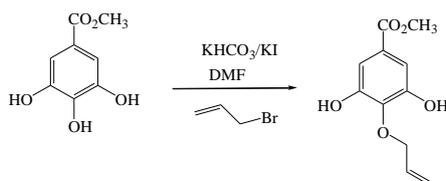
**RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ )** :  $\delta$  (ppm) = 2,66 (s, 2 OH), 3,16 (d,  $^4\text{J} = 21,8$  Hz, 2 H), 3,38 (s, 9 H), 3,49-3,86 (m, 42 H), 4,13-4,21 (m, 6 H), 5,92 (br s, P-OH), 6,62 ( $^4\text{d}$ ,  $\text{J} = 2,4$  H).

**RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ )** :  $\delta$  (ppm) = 34,24, 58,87, 68,56, 68,88, 69,69, 69,89, 70,23, 70,32, 70,36, 70,46, 70,53, 70,75, 71,16, 71,74, 71,79, 72,05, 72,24, 72,28, 109,52, 127,05, 136,86, 152,18.

**Maldi**: 791.39 obtenue pour  $\text{C}_{34}\text{H}_{63}\text{O}_{18}\text{P}$  (790.38 calculée).

## 7.2 Synthèse du composé intermédiaire

### Composé 6

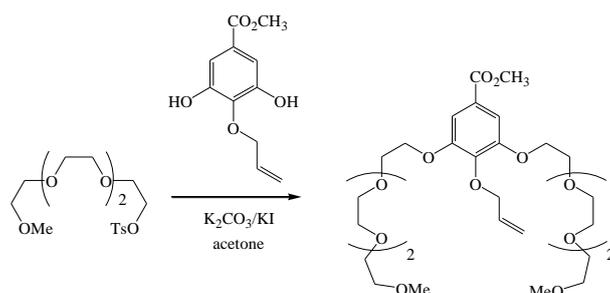


Une solution de gallate de méthyle (20,0 g, 108,6 mmol), de bromure d'allyle (9,4 mL, 108,6 mmol), de  $\text{KHCO}_3$  (43,4 g, 433,4 mmol) et de KI (0,1 g, 0,60 mmol) dans du DMF (100 ml) est agitée pendant 4 jours à  $30^\circ\text{C}$ . Le mélange réactionnel est versé dans 1L d'eau et de l'acide sulfurique est ajouté jusqu'à obtention d'un pH neutre. La phase aqueuse est ensuite extraite 3 fois avec 150 ml d'éther. Les phases organiques sont réunies, lavées trois fois avec 50 ml d'une solution aqueuse saturée en NaCl, séchées ( $\text{MgSO}_4$ ), filtrées et le solvant évaporé. Le produit brut est recristallisé dans un mélange  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ /6% MeOH (60 mL/10 mL) pour obtenir le composé **6** sous la forme d'un solide blanc avec un rendement de 87%.

**RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ )** :  $\delta$  (ppm) = 3,86 (s, 3 H), 4,64 (d,  $^3\text{J} = 6,1$  Hz, 2 H), 4,88 (br s, 2 OH), 5,19 (dd,  $^2\text{J} = 11,8$  Hz,  $^3\text{J} = 1,5$  Hz, 1 H), 5,30 (dd,  $^2\text{J} = 18,6$  Hz,  $^3\text{J} = 1,5$  Hz, 1 H), 6,06-6,19 (m, 1H), 7,05 (s, 2 H).

**RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ )** :  $\delta$  (ppm) = 53,32, 75,26, 110,89, 119,65, 127,30, 136,34, 140,27, 152,70, 169,34.

## Composé 7

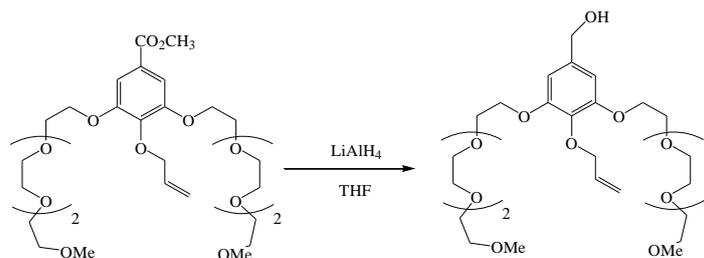


Une solution de **1** (24,9 g, 68,7 mmol), de **6** (7,0 g, 31,2 mmol), de K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (21,6 g, 156,1 mmol) et de KI (1,6 g, 9,4 mmol) dans de l'acétone (600 mL) est agitée pendant 30h à 65°C. Le milieu réactionnel est filtré et le solvant évaporé. Le produit brut obtenu est dilué dans CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> et lavé deux fois avec une solution aqueuse saturée de NaHCO<sub>3</sub> puis avec une solution aqueuse saturée de NaCl. Les phases organiques sont rassemblées et, après séchage sur MgSO<sub>4</sub>, filtration et concentration sous pression réduite, le produit brut est purifié par colonne chromatographie (SiO<sub>2</sub>, acétate d'éthyle/ 5 → 50 % acétone). Le composé **7** est obtenu sous la forme d'une huile jaune avec un rendement de 70%.

**RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>)** : δ (ppm) = 3,36 (s, 6H), 3,51-3,54 (m, 4H), 3,61-3,67 (m, 16 H), 3,71-3,74 (m, 4 H), 3,85-3,88 (m, 7 H), 4,17-4,20 (m, 4 H), 4,59 (d, <sup>3</sup>J = 5,9 Hz, 2 H), 5,15 (dd, <sup>2</sup>J = 10,5 Hz, <sup>3</sup>J = 1,5 Hz, 1H), 5,32 (dd, <sup>2</sup>J = 17,1 Hz, <sup>3</sup>J = 1,5 Hz, 1 H), 5,99-6,13 (m, 1 H), 7,28 (s, 2 H).

**RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>)** : δ (ppm) = 52,46, 59,33, 69,21, 69,96, 70,85, 70,96, 71,01, 71,19, 72,28, 74,34, 109,21, 117,94, 125,35, 134,73, 142,41, 152,81, 166,91.

## Composé 7iii

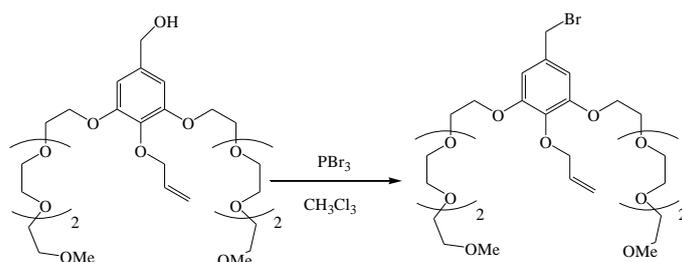


17 mL (0,5 éq.) d'une solution de LiAlH<sub>4</sub> 1M dans du THF sont ajouté lentement à une solution de **7** (20,4 g, 35,0 mmol) dans 100 mL de THF anhydre maintenue sous argon et refroidie à 0°C. Après 1 h d'agitation à T<sub>amb</sub>, l'hydrure n'ayant pas réagi est neutralisé avec de l'acétate d'éthyle, du méthanol et de l'eau. Le mélange est alors filtré et extrait avec du dichlorométhane. Les phases organiques sont rassemblées, lavées avec une solution saturée en NaCl, séchées (MgSO<sub>4</sub>), filtrées et évaporées. Le composé **7iii** est obtenu sous la forme d'une huile jaune pâle avec un rendement de 95% et est utilisé sans autre purification.

**RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>)** : δ (ppm) = 3,37 (s, 6 H), 3,52-3,56 (m, 4 H), 3,62-3,69 (m, 16 H), 3,70-3,73 (m, 4 H), 3,83-3,86 (m, 4 H), 4,15-4,18 (m, 4 H), 4,51 (dd, 2 H, <sup>3</sup>J = 5,8 Hz, <sup>4</sup>J = 1,2 Hz), 4,58 (s, 2 H), 5,15 (1 H, d, <sup>3</sup>J = 10,2 Hz), 5,30 (1 H, dd, <sup>3</sup>J = 17,2 Hz, <sup>4</sup>J = 1,6 Hz), 6,02-6,15 (m, 1 H), 6,63 (s, 2 H).

**RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>)** : δ (ppm) = 58,74, 64,50, 68,54, 69,55, 70,22, 70,34, 70,42, 70,56, 71,66, 73,79, 105,79, 116,98, 134,64, 136,65, 136,96, 152,46.

## Composé 7iv

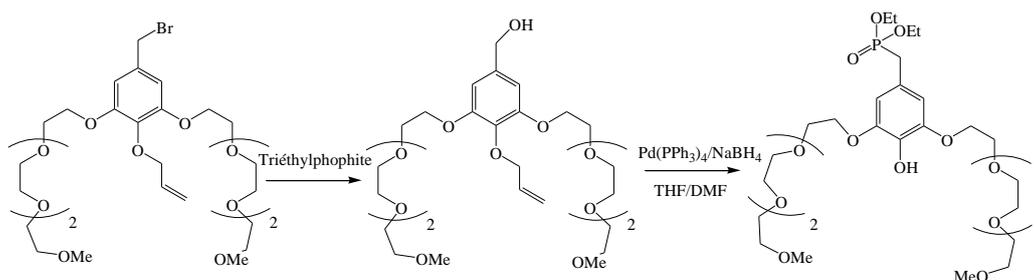


11,5 mL d'une solution de  $\text{PBr}_3$  1M dans du dichlorométhane sont ajoutés lentement à une solution de **7iii** (4,0 g, 7,7 mmol) dans 200 ml de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  anhydre maintenue sous argon et refroidie à  $0^\circ\text{C}$ . Après agitation à  $T_{\text{amb}}$  pendant 2h, 100 mL d'une solution aqueuse saturée en  $\text{NaHCO}_3$  sont ajoutés au milieu réactionnel. Les phases aqueuses et organiques sont séparées puis la phase aqueuse est extraite plusieurs fois avec  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . Les phases organiques sont rassemblées, lavées avec une solution saturée en  $\text{NaCl}$ , séchées ( $\text{MgSO}_4$ ), filtrées et évaporées. Le composé **7iv** est alors obtenu sous la forme d'une huile rouge avec rendement de 92% et est utilisé sans purification supplémentaire.

**RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ )** :  $\delta$  (ppm) = 3,37 (s, 6 H), 3,52-3,56 (m, 4 H), 3,62-3,67 (m, 16 H), 3,71-3,74 (m, 4 H), 3,83-3,87 (m, 4 H), 4,14-4,17 (m, 4 H), 4,41 (s, 2 H), 4,51 (dd, 2H,  $^3\text{J} = 5,8$  Hz,  $^4\text{J} = 1,2$  Hz), 5,16 (1 H, d,  $^3\text{J} = 10,2$  Hz), 5,32 (1 H, dd,  $^3\text{J} = 17,2$  Hz,  $^4\text{J} = 1,6$  Hz), 6,01-6,14 (m, 1 H), 6,62 (s, 2H).

**RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ )** :  $\delta$  (ppm) = 34,00, 58,84, 68,78, 69,54, 70,35, 70,46, 70,51, 70,70, 71,78, 73,89, 108,42, 117,15, 132,82, 134,84, 138,05, 152,60.

## Composé 7v et INT



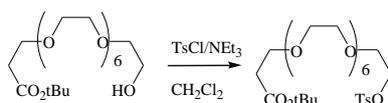
Une solution de **7iv** (2,20 g, 3,44 mmol) dans 3,0 ml de  $\text{P}(\text{OEt})_3$  est agitée pendant 2h à  $160^\circ\text{C}$ . L'excès de  $\text{P}(\text{OEt})_3$  est alors évaporé sous pression réduite à  $70^\circ\text{C}$ . Le phosphonate d'éthyle ainsi obtenu avec un rendement de 99% (**7v**) est dissous dans 33 ml de THF anhydre à  $T_{\text{amb}}$  et 80 mg (0,07 mmol) de  $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$  sont ajoutés au mélange. Après 10 minutes d'agitation à  $T_{\text{amb}}$ , 325 mg de  $\text{NaBH}_4$  (8,60 mmol) et 5,5 mL de DMF sont ajoutés au milieu réactionnel. Après 2h d'agitation, 200 mL d'une solution saturée de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  sont ajoutés lentement. La phase organique est séparée de la phase aqueuse et la phase aqueuse est extraite plusieurs fois avec  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . Les phases organiques sont combinées, lavées avec une solution saturée en  $\text{NaCl}$ , séchées ( $\text{MgSO}_4$ ), filtrées et concentrées sous pression réduite. Le produit brut est purifié par colonne de chromatographie ( $\text{SiO}_2$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/2 \rightarrow 5\%$  méthanol). Le composé **INT** est obtenu sous la forme d'une huile jaune foncée avec un rendement de 76%.

**RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ )** :  $\delta$  (ppm) = 1,24 (t, 6H,  $^3\text{J} = 7,1$  Hz), 3,01 (d, 2H,  $^2\text{J} = 21,3$  Hz), 3,63 (s, 6 H), 3,52-3,55 (m, 4 H), 3,62-3,73 (m, 20 H), 3,81-3,84 (m, 4 H), 3,93-4,04 (m, 4 H), 4,13-4,16 (m, 2 H), 4,18-4,21 (m, 2 H), 6,67 (d, 2 H,  $^4\text{J} = 2,5$  Hz).

**RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ )** :  $\delta$  (ppm) = 16,43, 33,31, 58,91, 62,00, 69,51, 69,70, 70,43, 70,54, 70,66, 71,87, 110,74, 121,76, 136,55, 146,59.

## 7.3 Synthèse du dendron ANACOOH : finalisation

### Composé 8

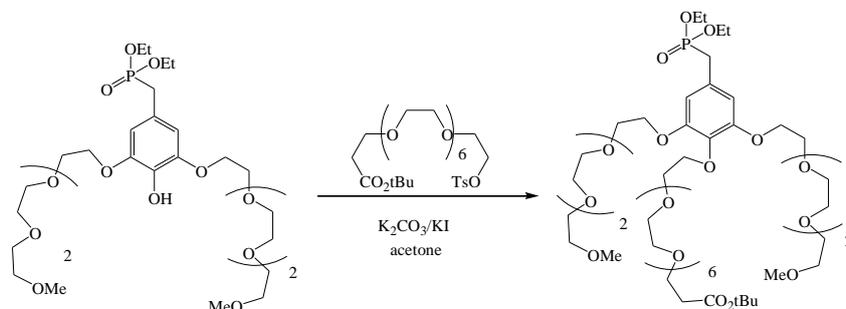


840  $\mu\text{L}$  (6,0 mmol) de triéthylamine anhydre et 570 mg (3,0 mmol) de chlorure de para-toluènesulfonyl sont ajoutés successivement à une solution de monoester tertibutylique d'octaéthylène glycol (1,00 g, 2,0 mmol) dans 20 ml de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  anhydre maintenue sous argon et refroidie à  $0^\circ\text{C}$ . Après 40h d'agitation à  $T_{\text{amb}}$ , le milieu réactionnel est dilué dans 70 ml de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , lavé plusieurs fois avec une solution aqueuse saturée en  $\text{NaCl}$ . Les phases organiques sont rassemblées, séchées ( $\text{MgSO}_4$ ), filtrées et concentrées sous pression réduite. Le produit brut est purifié par colonne de chromatographie ( $\text{SiO}_2$ , acétate d'éthyle/5 $\rightarrow$ 10% méthanol). Le composé **8** est obtenu sous la forme d'une huile incolore avec un rendement de 77%.

**RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ )** :  $\delta$  (ppm) = 1,44 (s, 9 H), 2,45 (s, 3 H), 2,50 (t, 2 H,  $^3\text{J} = 6,6$  Hz), 3,58-3,73 (m, 32 H), 4,16 (t, 2 H,  $^3\text{J} = 4,9$  Hz), 7,34 (d, 2 H), 7,81 (d, 2H).

**RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ )** :  $\delta$  (ppm) = 21,14, 27,65, 35,84, 66,40, 68,15, 69,00, 70,08, 79,78, 127,46, 129,47, 132,74, 144,32, 170,20.

### Composé 9

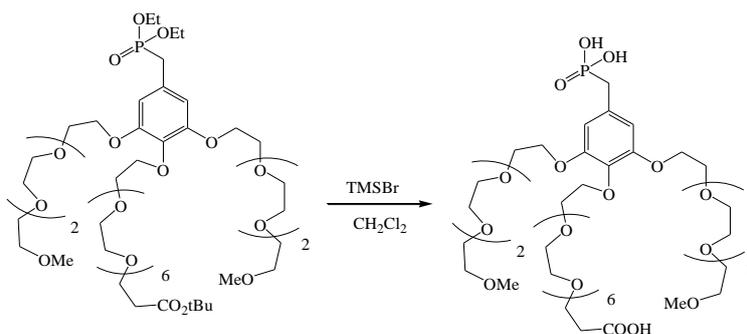


326 mg (2,36 mmol, 4,0 éq.) de  $\text{K}_2\text{CO}_3$  et 30 mg (0,18 mmol) de  $\text{KI}$  sont ajoutés à une solution équimolaire de **INT** (400 mg, 0,59 mmol) et de **8** (386 mg, 0,59 mmol) dans 10 mL d'acétone. Le mélange réactionnel est agité à  $60^\circ\text{C}$  pendant 72h. Après filtration, le solvant est évaporé et le résidu est dilué dans du  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . La phase organique est lavée avec une solution aqueuse saturée en  $\text{NaHCO}_3$ , puis une solution aqueuse saturée en  $\text{NaCl}$ , séchée ( $\text{MgSO}_4$ ), filtrée et concentrée sous pression réduite. Le produit brut est purifié par colonne de chromatographie ( $\text{SiO}_2$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ /5 $\rightarrow$ 10% méthanol). Le composé **9** est obtenu sous la forme d'une huile jaune avec un rendement de 90%.

**RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ )** :  $\delta$  (ppm) = 1,21 (t, 6 H,  $^3\text{J} = 7,1$  Hz), 1,44 (s, 9H), 2,49 (t, 2H,  $^3\text{J} = 6,6$  Hz), 3,03 (d, 2 H,  $^2\text{J} = 21,3$  Hz), 3,37 (s, 6H), 3,52-3,78 (m, 56 H), 3,83 (t, 4H,  $^3\text{J} = 5,2$  Hz), 3,98-4,03 (m, 4 H), 4,08-4,14 (m, 6 H), 6,52 (d, 2H, 4J = 2,5 Hz).

**RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ )** :  $\delta$  (ppm) = 16,33 ( $^3\text{J} = 5,5$  Hz), 27,97, 29,50, 33,59 ( $^1\text{J} = 138,6$  Hz), 58,81, 61,95 ( $^2\text{J} = 6,6$  Hz), 66,74, 68,76, 69,56, 70,23, 70,53, 70,45, 70,67, 71,79, 72,19, 80,21, 109,33 ( $^3\text{J} = 5,6$  Hz), 126,74 ( $^2\text{J} = 9,1$  Hz), 137,32 ( $^5\text{J} = 3,1$  Hz), 152,39 ( $^4\text{J} = 2,5$  Hz), 170,65.

## ANACOOH



TMSBr (1,73 mL, 6,45 mmol) est ajouté goutte à goutte à une solution de **9** (500 mg, 0,43 mmol) dans 5 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> anhydre maintenue sous argon et refroidie à 0°C. Après 1h d'agitation à T<sub>amb</sub>, les substances volatiles sont évaporées une première fois à sec puis plusieurs fois après ajout de MeOH. Le dendron **ANACOOH** est obtenu sous la forme d'une huile jaune pâle avec un rendement de 95% et est utilisé sans autre purification.

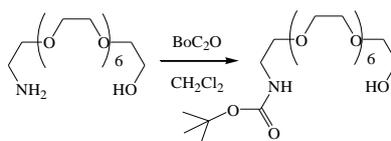
**RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>)** : δ (ppm) = 2,61 (t, 2 H, <sup>3</sup>J = 6,1 Hz), 3,09 (d, 2 H, <sup>2</sup>J = 21,5 Hz), 3,38 (s, 6 H), 3,54-3,89 (m, 60 H), 4,13-4,21 (m, 6H), 6,67 (d, 2 H, <sup>4</sup>J = 2,5 Hz).

**RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>)** : δ (ppm) = 34,42, 34,66 (<sup>1</sup>J = 135,9 Hz), 57,80, 66,30, 69,46, 69,99, 70,04, 70,09, 70,10, 70,38, 70,62, 70,70, 71,61, 72,17, 109,12 (<sup>3</sup>J = 5,9 Hz), 128,24 (<sup>2</sup>J = 9,1 Hz), 136,85 (<sup>3</sup>J = 3,1 Hz), 152,38 (<sup>4</sup>J = 2,4 Hz), 172,35.

**Maldi**: 1089.55 obtenue pour C<sub>44</sub>H<sub>79</sub>O<sub>24</sub>PNa<sub>3</sub> (1090.43 calculée).

## 7.4 Synthèse du dendron ANANH2 : finalisation

### Composé 10

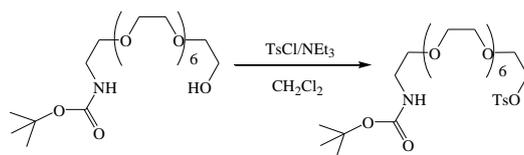


Boc<sub>2</sub>O (589 mg, 2,7 mmol) est ajouté à une solution d'amino-dPEG<sub>TM</sub><sup>8</sup> (1,00 g, 2,7 mmol) dans 20 ml de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> anhydre maintenue sous argon et refroidie à 0°C. Le milieu réactionnel est agité pendant une nuit à T<sub>amb</sub> puis dilué avec 100 ml de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. La phase organique est lavée avec une solution aqueuse saturée en NaCl, séchée (MgSO<sub>4</sub>) et filtrée. Après évaporation du solvant, le composé **10** pur est obtenu sous la forme d'une huile jaune avec un rendement de 95%.

**RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>)** : δ (ppm) = 1,44 (s, 9 H), 3,30 (t, 2 H, <sup>3</sup>J = 5,0 Hz), 3,53 (t, 2H, <sup>3</sup>J = 5,0 Hz), 3,59-3,73 (m, 30 H).

**RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>)** : δ (ppm) = 28,35, 40,27, 61,43, 70,08, 70,10, 70,23, 70,45, 72,52, 78,84, 155,93.

## Composé 11

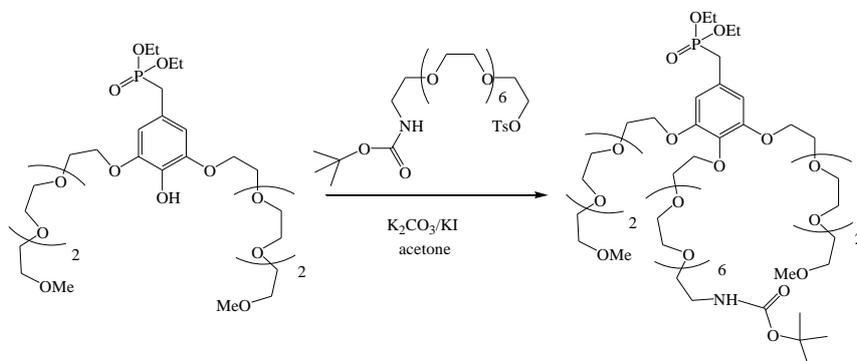


652  $\mu$ L (4,83 mmol) de triéthylamine anhydre et 440 mg (2,31 mmol) de para-toluènesulfonyl sont ajoutés successivement à une solution de **10** (986 mg, 2,1 mmol) dans 20 ml de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> anhydre maintenue sous argon et refroidie à 0°C. Après 40h d'agitation à T<sub>amb</sub>, le milieu réactionnel est dilué dans 70 ml de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. La phase organique est lavée avec une solution aqueuse saturée en NaCl, séchées (MgSO<sub>4</sub>), filtrée et concentrée sous pression réduite. Après purification par colonne de chromatographie (SiO<sub>2</sub>, acétate d'éthyle/5→10% méthanol) le composé **11** est obtenu sous la forme d'une huile incolore avec un rendement de 75%.

**RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>)** :  $\delta$  (ppm) = 1,43 (s, 9 H), 2,44 (s, 3 H), 3,30 (m, 2 H), 3,51-3,69 (m, 28 H), 4,13-4,17 (m, 2 H), 5,04 (br s, 1 H), 7,33 (d, 2H), 7,79 (d, 2H).

**RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>)** :  $\delta$  (ppm) = 21,47, 28,32, 40,28, 68,50, 69,22, 70,00, 70,09, 70,41, 70,54, 78,79, 127,79, 129,73, 132,98, 144,65, 155,84.

## Composé 12

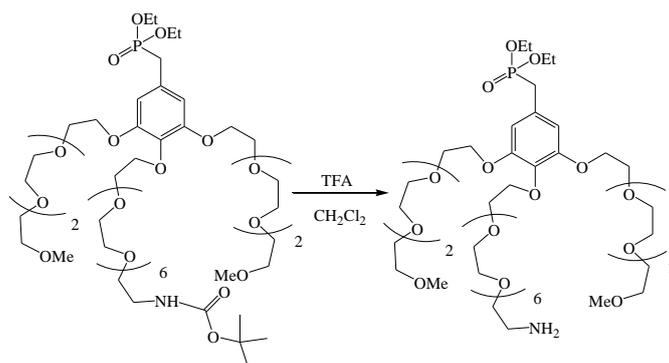


326 mg (2,36 mmol) de K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> et 30 mg (0,18 mmol) de KI sont ajoutés à une solution équimolaire de **INT** (400 mg, 0,59 mmol) et de **11** (369 mg, 0,59 mmol) dans 10 ml d'acétone. Le mélange réactionnel est agité à 60°C pendant 72 heures. Après filtration, le solvant est évaporé et le résidu est dilué dans CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. La phase organique est lavée avec une solution aqueuse saturée en NaHCO<sub>3</sub>, puis une solution aqueuse saturée en NaCl, séchée (MgSO<sub>4</sub>), filtrée et concentrée sous pression réduite. Après purification par colonne de chromatographie (SiO<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/5→10% méthanol) le composé **12** est obtenu sous la forme d'une huile jaune avec un rendement de 70%.

**RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>)** :  $\delta$  (ppm) = 1,24 (t, 6 H, <sup>3</sup>J = 6,9 Hz), 1,44 (s, 9 H), 3,03 (d, 2H, <sup>2</sup>J = 21,5 Hz), 3,30 (t, 2 H, <sup>3</sup>J = 5,0 Hz), 3,37 (s, 6 H), 3,51-3,57 (m, 6 H), 3,62-3,72 (m, 45 H), 3,77 (t, 2 H, <sup>3</sup>J = 5,3 Hz), 3,83 (t, 4H, <sup>3</sup>J = 5,3 Hz), 3,96-4,06 (m, 4 H), 4,09-4,14 (m, 6 H), 6,52 (d, 2 H, <sup>4</sup>J = 2,5 Hz).

**RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>)** :  $\delta$  (ppm) = 16,50, 28,48, 33,31, 40,42, 59,01, 62,14, 68,92, 69,73, 70,24, 70,28, 70,62, 70,84, 71,97, 72,36, 79,06, 109,50, 126,93, 137,50, 152,56, 156,03.

## Composé 13

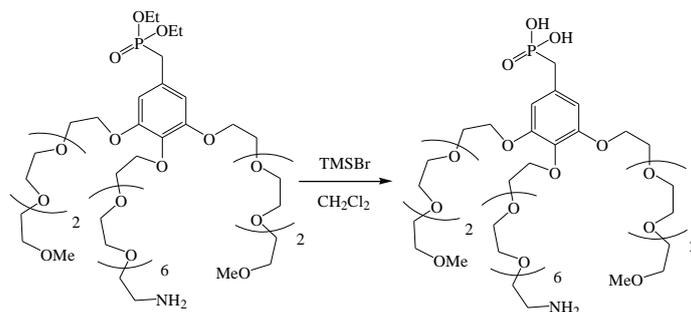


886  $\mu\text{L}$  (8,55 mmol) d'acide trifluoroacétique sont ajoutés goutte à goutte à une solution de **12** (631 mg, 0,57 mmol) dans 20 ml de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  anhydre maintenue sous argon et refroidie à  $0^\circ\text{C}$ . Le milieu réactionnel est agité pendant une nuit à  $T_{\text{amb}}$ , puis les substances volatiles sont évaporées. Le produit brut est dilué dans du  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  et lavé deux fois avec une solution aqueuse saturée en  $\text{NaHCO}_3$ . Les phases aqueuses sont extraites deux fois avec  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  et les phases organiques sont rassemblées, séchées ( $\text{MgSO}_4$ ) et filtrées. Après évaporation du solvant, le composé **13** est obtenu sous la forme d'une huile jaune foncé avec un rendement de 88%.

**RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ )** :  $\delta$  (ppm) = 1,31 (t, 6 H,  $^3\text{J} = 6,9$  Hz), 3,01 (t, 2 H,  $^3\text{J} = 5,2$  Hz), 3,22 (d, 2 H,  $^2\text{J} = 21,5$  Hz), 3,37 (s, 6 H), 3,53-3,90 (m, 56 H), 4,06-4,12 (m, 4 H), 4,14-4,22 (m, 6 H), 6,68 (d, 2 H,  $^4\text{J} = 2,5$  Hz).

**RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ )** :  $\delta$  (ppm) = 16,50, 28,48, 33,31, 40,42, 59,01, 62,14, 68,92, 69,73, 70,24, 70,28, 70,62, 70,84, 71,97, 72,36, 79,06, 109,50, 126,93, 137,50, 152,56, 156,03.

## ANANH2



TMSBr (1,73 mL, 6,45 mmol) est ajouté goutte à goutte à une solution de **13** (432 mg, 0,43 mmol) dans 20 mL de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  anhydre maintenue sous argon et refroidie à  $0^\circ\text{C}$ . Après 1h d'agitation à  $T_{\text{amb}}$ , les substances volatiles sont évaporées une première fois à sec puis plusieurs fois après ajout de MeOH. Le dendron **ANANH2** est obtenu sous la forme d'une huile jaune avec un rendement de 94% et est utilisé sans autre purification.

**RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ )** :  $\delta$  (ppm) = 1,21 (t, 6 H,  $^3\text{J} = 7,1$  Hz), 1,44 (s, 9 H), 2,49 (t, 2 H,  $^3\text{J} = 6,6$  Hz), 3,03 (d, 2 H,  $^2\text{J} = 21,3$  Hz), 3,37 (s, 6 H), 3,52-3,78 (m, 54 H), 3,83 (t, 4 H,  $^3\text{J} = 5,2$  Hz), 3,98-4,03 (m, 4 H), 4,08-4,14 (m, 6H), 6,52 (d, 2 H,  $^4\text{J} = 2,5$  Hz).

**RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ )** :  $\delta$  (ppm) = 35,64, 41,73, 59,95, 68,78, 70,53, 71,58, 71,67, 71,78, 71,87, 71,89, 71,94, 72,06, 72,14, 72,34, 72,44, 73,77, 74,19, 110,76, 131,24, 138,23, 154,44.

**Maldi**: 952.50 obtenue pour  $\text{C}_{41}\text{H}_{79}\text{NO}_2\text{P}$  (952.49 calculée).

## 8 L'ultrafiltration

L'ultrafiltration est, comme la dialyse, une technique de purification basée sur une séparation en taille des molécules. Cette technique consiste à filtrer une solution sous pression à travers une membrane perméable (Figure 144). Les petites molécules sont ainsi forcées à passer à travers cette membrane. Elles sont ensuite récupérées dans un bécber et constituent le filtrat. En ce qui concerne la solution de départ, elle se trouve, du fait de la filtration, purifiée et concentrée.

L'ultrafiltration peut s'effectuer en deux modes : continu ou discontinu. En mode continu, le solvant est ajouté en permanence lors de la filtration. Ainsi, le volume de la solution reste le même durant toute la durée de l'ultrafiltration. En mode discontinu, la solution subit une succession de concentration et de dilution. Un schéma de principe du mode discontinu est donné dans la Figure 145 et le pourcentage d'impuretés enlevées à chaque réduction de volume de la solution dans le Tableau 40.

L'ultrafiltration a l'avantage sur la dialyse de permettre une purification rapide des solutions (quelques minutes suffisent).

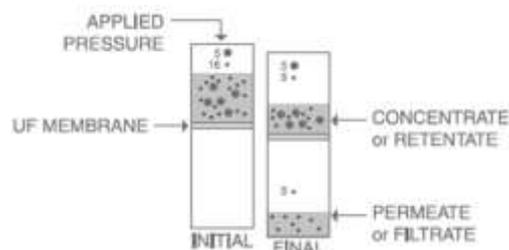


Figure 144 : schéma de principe de l'ultrafiltration (● représente les molécules de grande taille et • les molécules de petite taille)<sup>379</sup>.

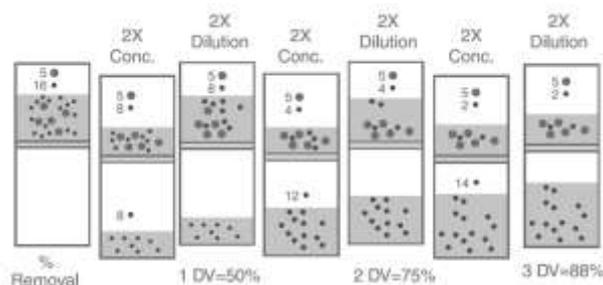


Figure 145 : ultrafiltration discontinue par réduction de volume (● représente les molécules de taille supérieure aux pores de la membrane et • les molécules de petite taille)<sup>379</sup>.

Tableau 40 : comparaison de l'efficacité de la purification entre l'ultrafiltration discontinue par réduction de volume et l'ultrafiltration continue<sup>379</sup>.

Diafiltration Volumes	2X Volume Reduction		Continuous Diafiltration (Constant Volume)	
	100% Permiable 0% Retention*	75% Permiable 25% Retention*	100% Permiable 0% Retention*	75% Permiable 25% Retention*
1	50%	41%	63%	53%
2	75%	65%	86%	77%
3	88%	79%	95%	89%
4	94%	88%	98,2%	95%
5	96,9%	93%	99,3%	97,6%
6	98,4%	95,6%	99,7%	98,9%
7	99,2%	97,4%	99,9%	99,4%
8	99,6%	98,4%		99,7%
9	99,8%	99,0%		99,9%
10	99,9%	99,4%		

## 9 Schéma du protocole de greffage par la méthode B/pHréa

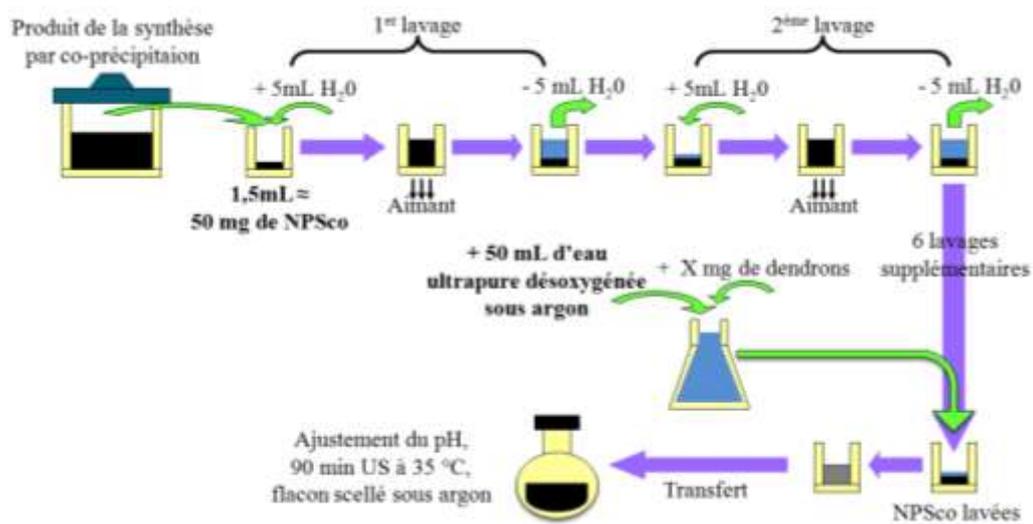


Figure 146 : schéma du protocole de la méthode pH/réa.

## 10 Exemple des premiers spectres infrarouges et ATG des NPSco@ANA

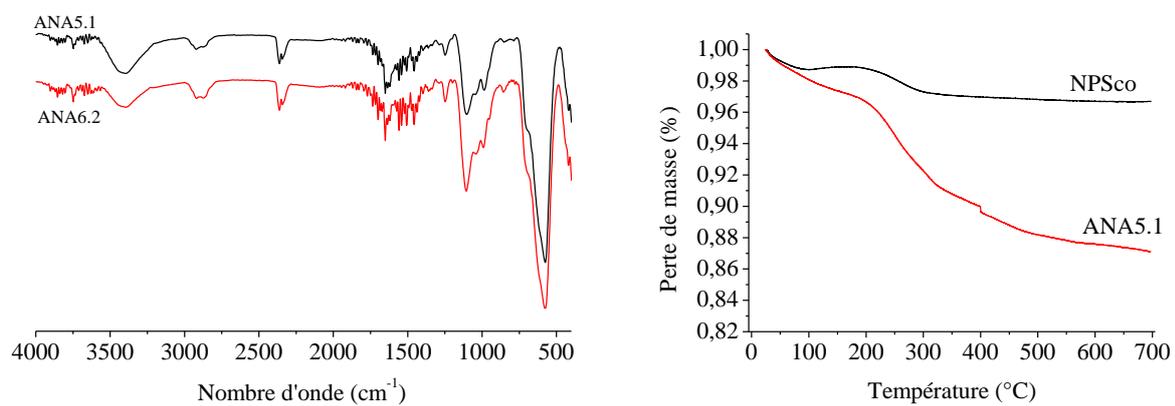


Figure 147 : deux exemples de spectres infrarouges des NPSco@ANA (à gauche) et exemple d'ATG (à droite).

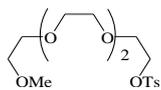
## **11 Spectre RMN $^1\text{H}$ et $^{13}\text{C}$ des différents composés obtenus durant les étapes de synthèse de dendrons ANACOOH et ANANH<sub>2</sub>**

---

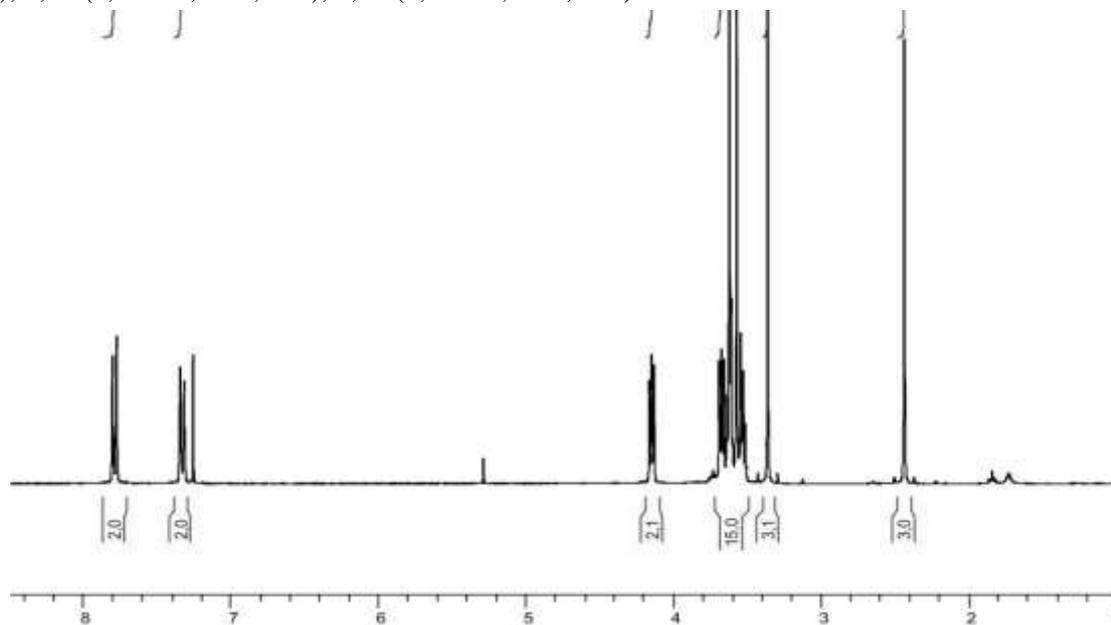
Voir pages suivantes.

## 11.1 Synthèse du composé intermédiaire

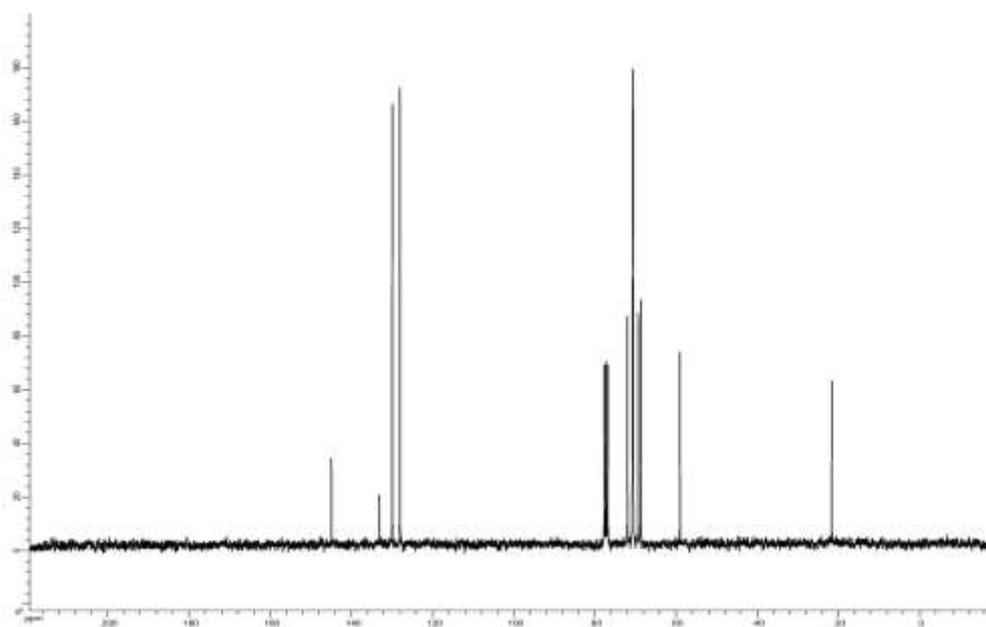
### Composé 1



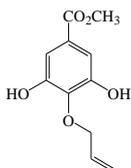
RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta$  (ppm) = 2,44 (s, 3 H), 3,36 (s, 3H), 3,52-3,69 (m, 14 H), 4,15 (t,  $^3\text{J} = 4,9$  Hz, 2 H), 7,34 (d,  $^3\text{J} = 4,3$  Hz, 2 H), 7,78 (d,  $^3\text{J} = 6,6$  Hz, 2 H).



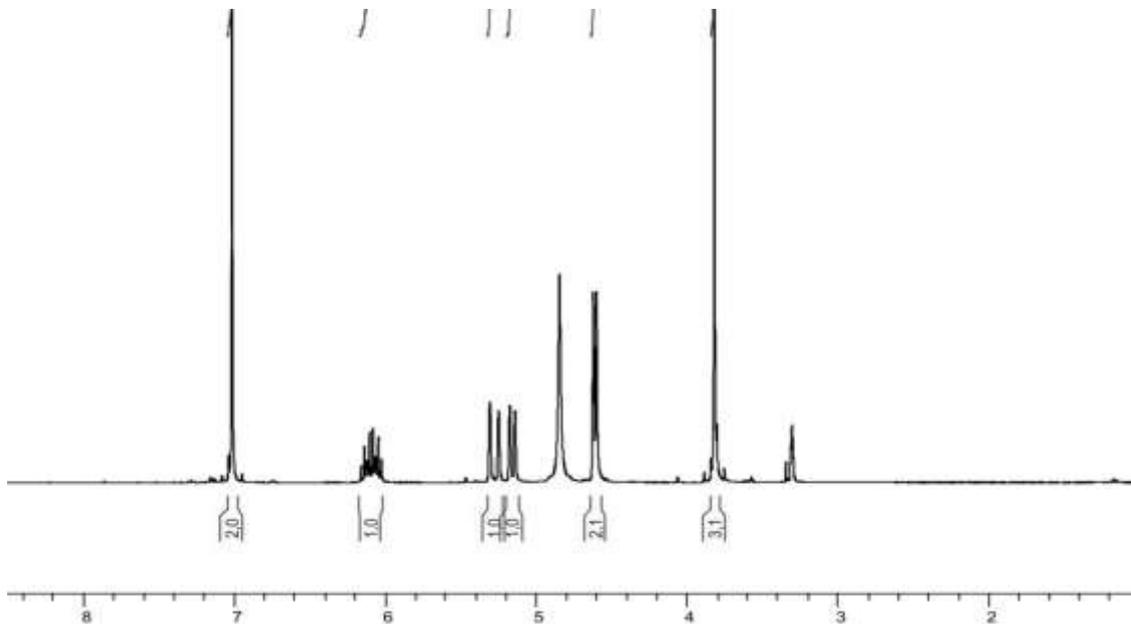
RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta$  (ppm) = 21,78, 59,14, 68,80, 69,45, 70,66, 70,73, 70,86, 72,07, 128,10, 129,99, 133,19, 144,96.



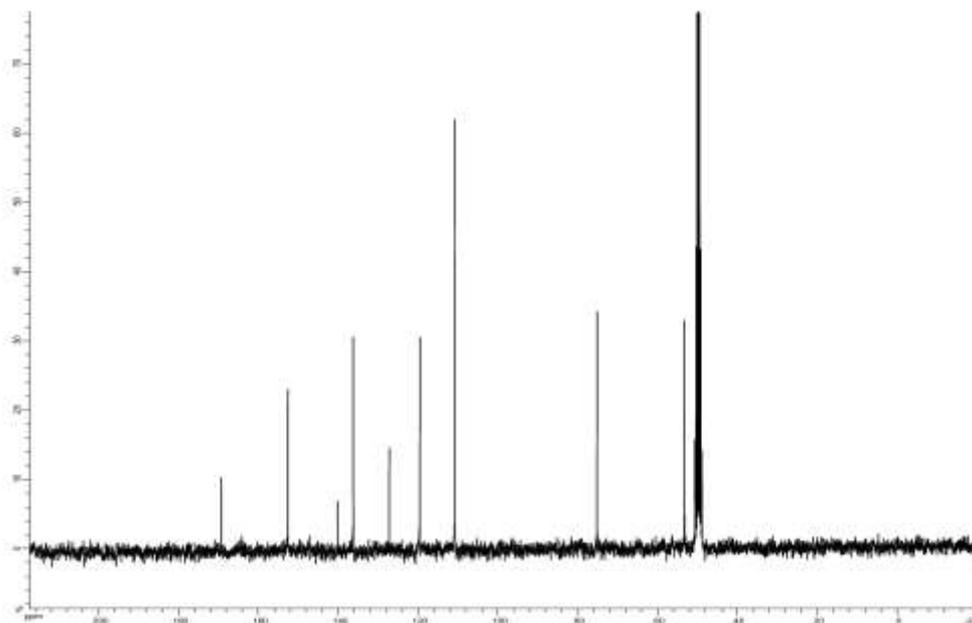
## Composé 6



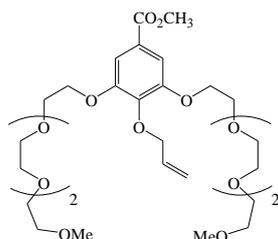
**RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) :**  $\delta$  (ppm) = 3,86 (s, 3 H), 4,64 (d,  $^3\text{J} = 6,1$  Hz, 2 H), 4,88 (br s, 2 OH), 5,19 (dd,  $^2\text{J} = 11,8$  Hz,  $^3\text{J} = 1,5$  Hz, 1 H), 5,30 (dd,  $^2\text{J} = 18,6$  Hz,  $^3\text{J} = 1,5$  Hz, 1 H), 6,06-6,19 (m, 1H), 7,05 (s, 2 H).



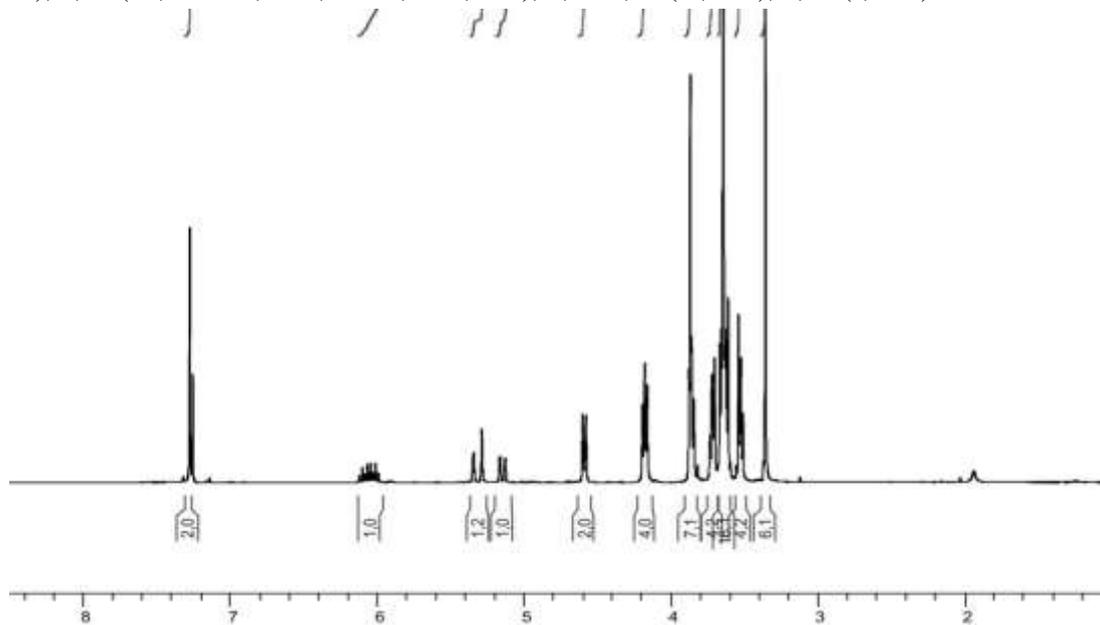
**RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) :**  $\delta$  (ppm) = 53,32, 75,26, 110,89, 119,65, 127,30, 136,34, 140,27, 152,70, 169,34.



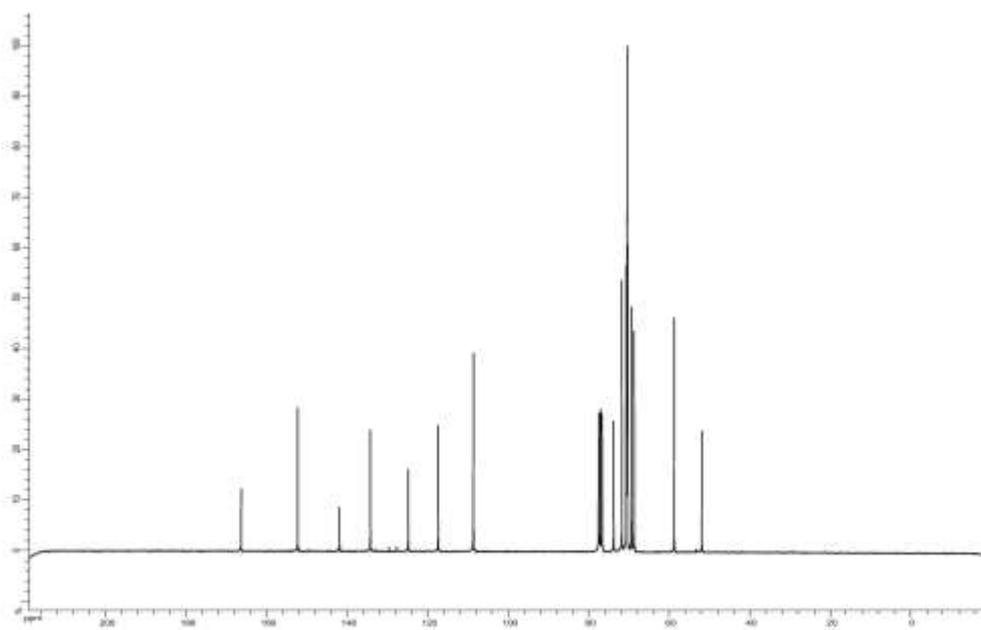
## Composé 7



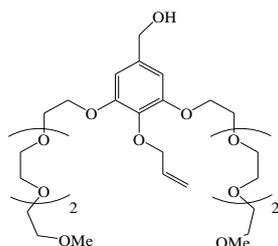
**RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) :**  $\delta$  (ppm) = 3,36 (s, 6H), 3,51-3,54 (m, 4H), 3,61-3,67 (m, 16 H), 3,71-3,74 (m, 4 H), 3,85-3,88 (m, 7 H), 4,17-4,20 (m, 4 H), 4,59 (d,  $^3J = 5,9$  Hz, 2 H), 5,15 (dd,  $^2J = 10,5$  Hz,  $^3J = 1,5$  Hz, 1H), 5,32 (dd,  $^2J = 17,1$  Hz,  $^3J = 1,5$  Hz, 1 H), 5,99-6,13 (m, 1 H), 7,28 (s, 2 H).



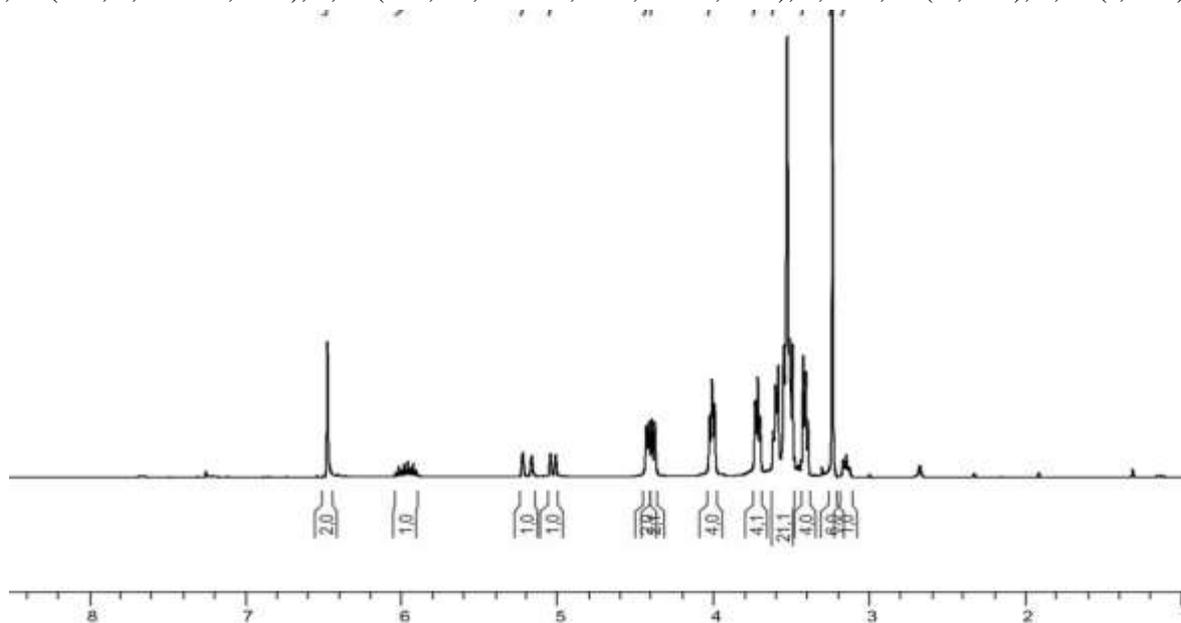
**RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) :**  $\delta$  (ppm) = 52,46, 59,33, 69,21, 69,96, 70,85, 70,96, 71,01, 71,19, 72,28, 74,34, 109,21, 117,94, 125,35, 134,73, 142,41, 152,81, 166,91.



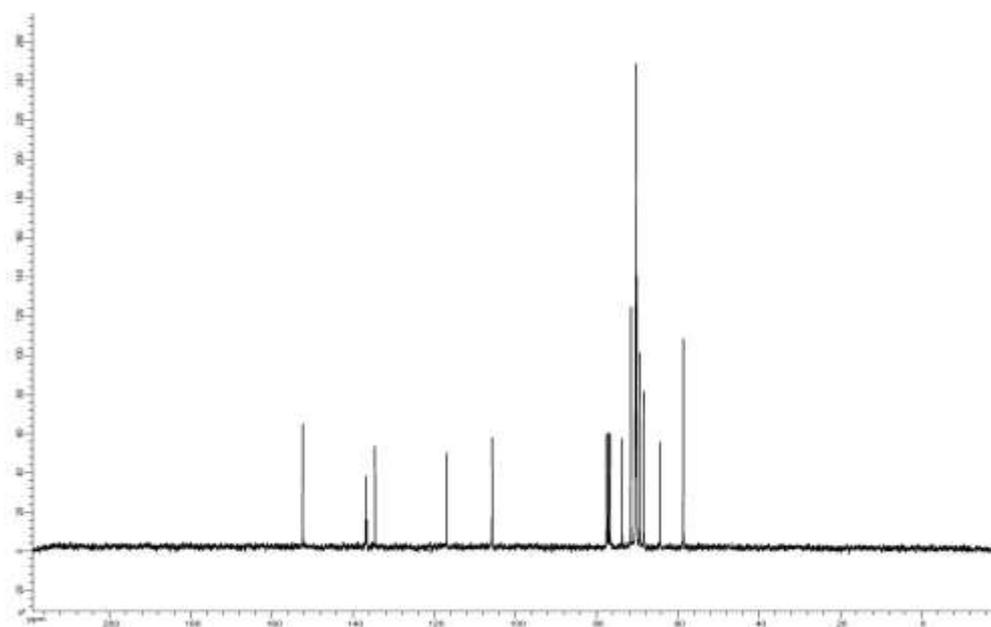
### Composé 7iii



**RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) :**  $\delta$  (ppm) = 3,37 (s, 6 H), 3,52-3,56 (m, 4 H), 3,62-3,69 (m, 16 H), 3,70-3,73 (m, 4 H), 3,83-3,86 (m, 4 H), 4,15-4,18 (m, 4 H), 4,51 (dd, 2 H,  $^3\text{J} = 5,8$  Hz,  $^4\text{J} = 1,2$  Hz), 4,58 (s, 2 H), 5,15 (1 H, d,  $^3\text{J} = 10,2$  Hz), 5,30 (1 H, dd,  $^3\text{J} = 17,2$  Hz,  $^4\text{J} = 1,6$  Hz), 6,02-6,15 (m, 1 H), 6,63 (s, 2 H).

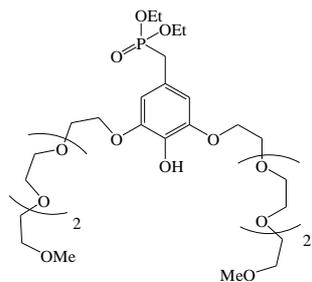


**RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) :**  $\delta$  (ppm) = 58,74, 64,50, 68,54, 69,55, 70,22, 70,34, 70,42, 70,56, 71,66, 73,79, 105,79, 116,98, 134,64, 136,65, 136,96, 152,46.

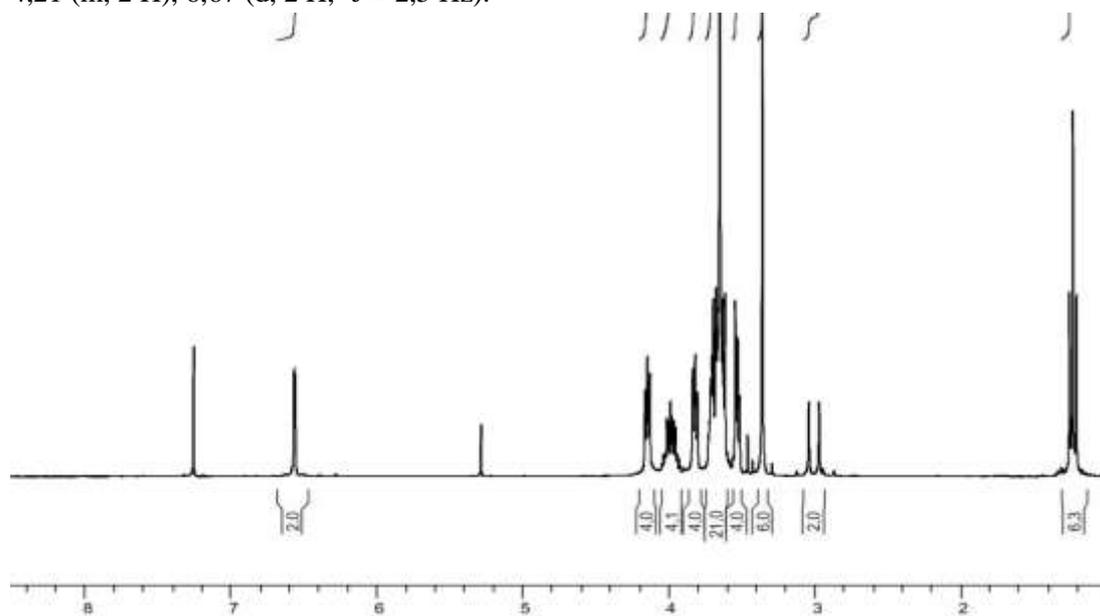




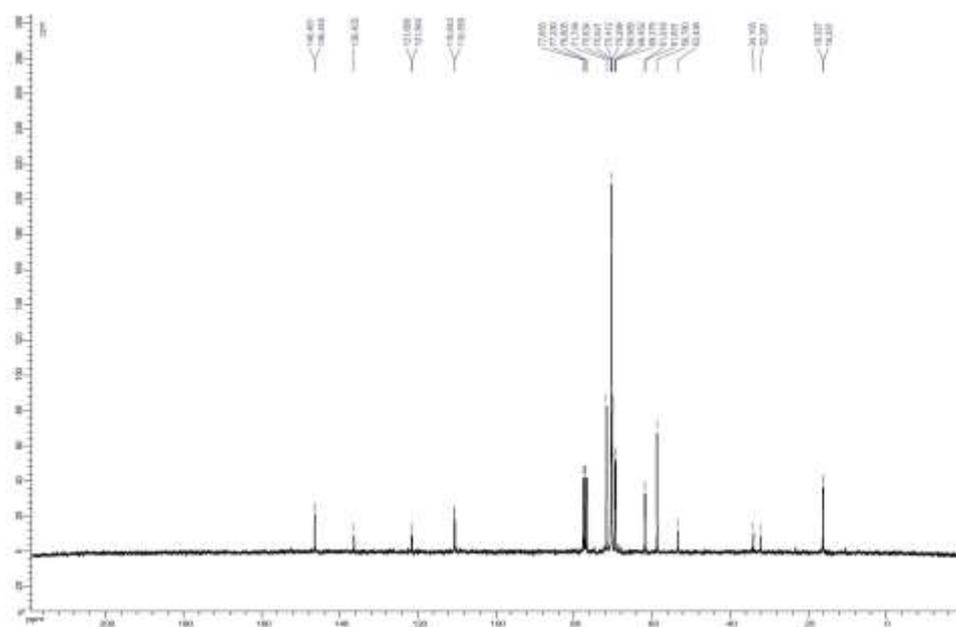
## Composé INT



RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta$  (ppm) = 1,24 (t, 6H,  $^3\text{J} = 7,1$  Hz), 3,01 (d, 2H,  $^2\text{J} = 21,3$  Hz), 3,63 (s, 6 H), 3,52-3,55 (m, 4 H), 3,62-3,73 (m, 20 H), 3,81-3,84 (m, 4 H), 3,93-4,04 (m, 4 H), 4,13-4,16 (m, 2 H), 4,18-4,21 (m, 2 H), 6,67 (d, 2 H,  $^4\text{J} = 2,5$  Hz).

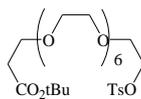


RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta$  (ppm) = 16,43, 33,31, 58,91, 62,00, 69,51, 69,70, 70,43, 70,54, 70,66, 71,87, 110,74, 121,76, 136,55, 146,59.

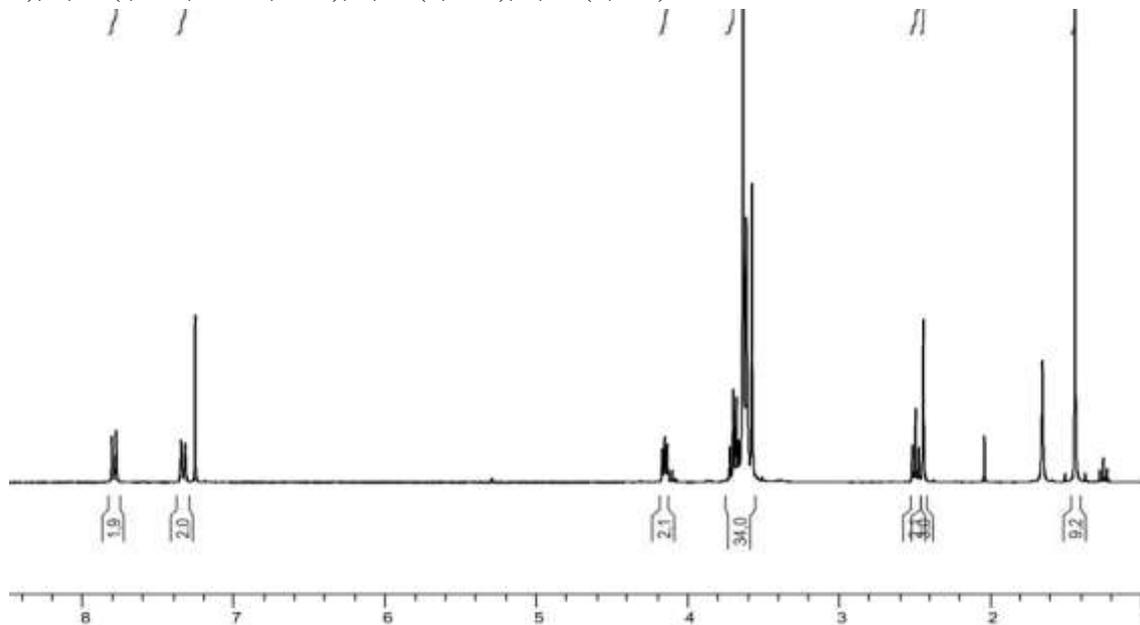


## 11.2 Synthèse du dendron ANACOOH : finalisation

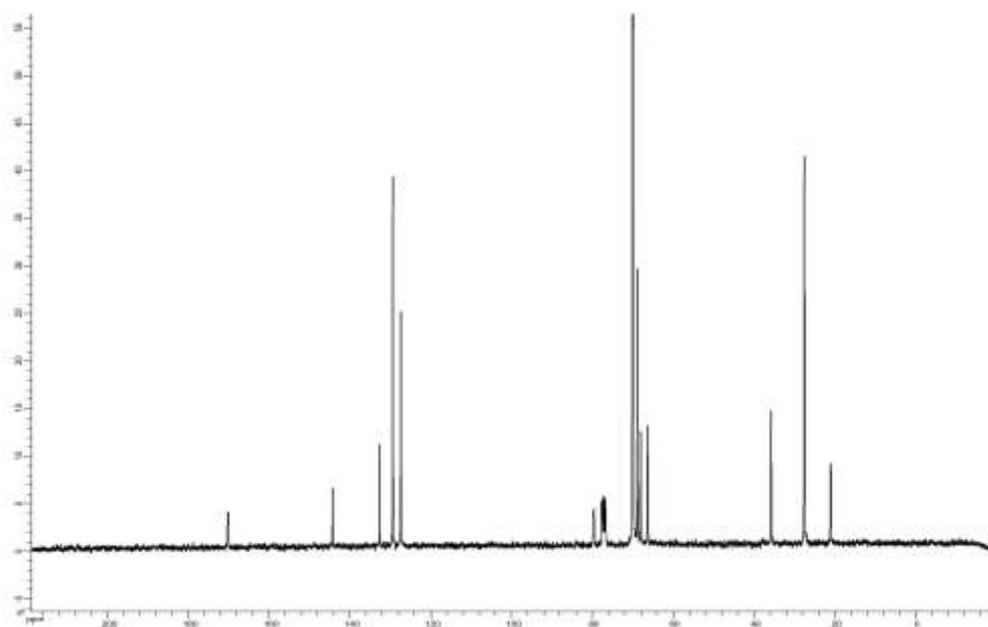
### Composé 8



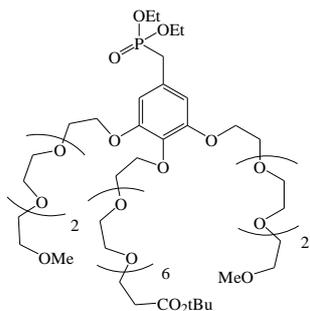
**RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>) :**  $\delta$  (ppm) = 1,44 (s, 9 H), 2,45 (s, 3 H), 2,50 (t, 2 H, <sup>3</sup>J = 6,6 Hz), 3,58-3,73 (m, 32 H), 4,16 (t, 2 H, <sup>3</sup>J = 4,9 Hz), 7,34 (d, 2 H), 7,81 (d, 2H).



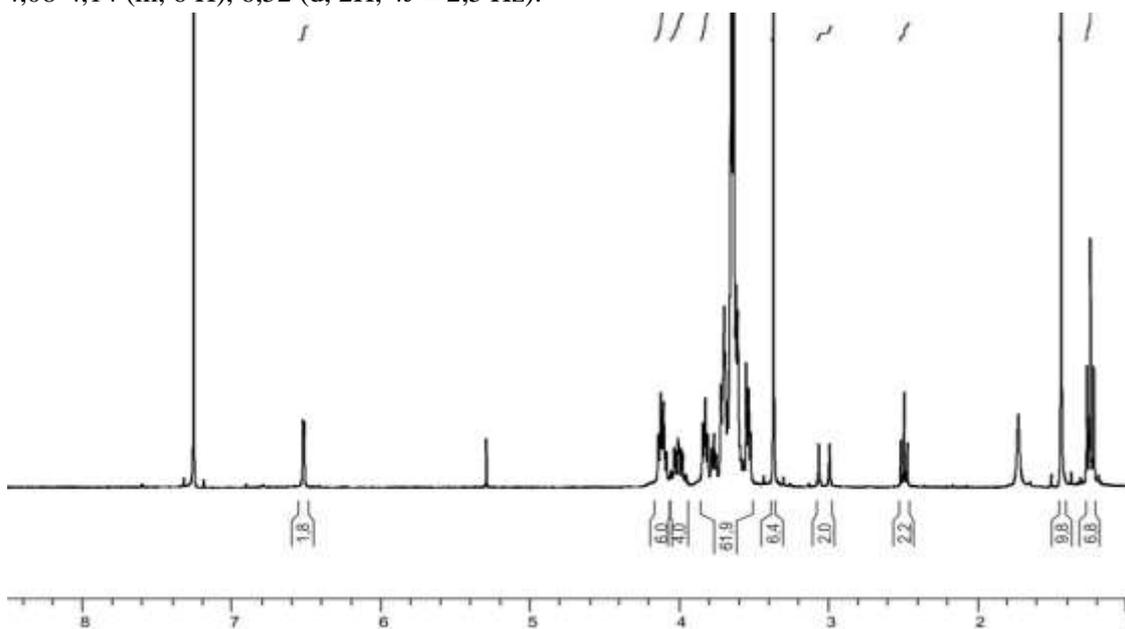
**RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>) :**  $\delta$  (ppm) = 21,14, 27,65, 35,84, 66,40, 68,15, 69,00, 70,08, 79,78, 127,46, 129,47, 132,74, 144,32, 170,20.



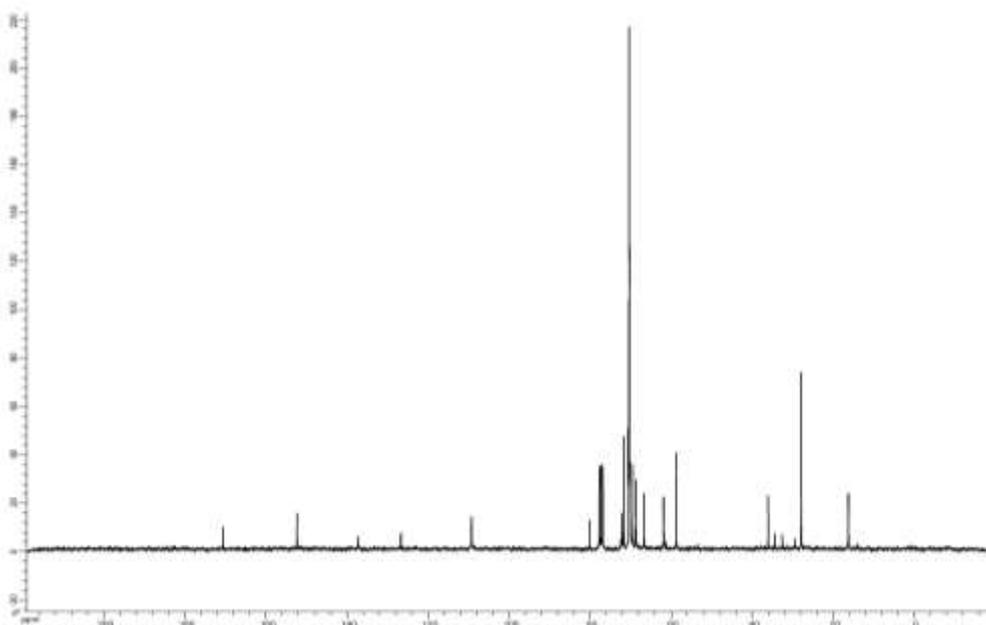
## Composé 9



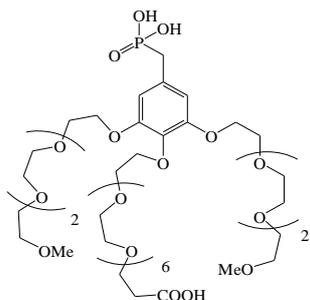
**RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) :**  $\delta$  (ppm) = 1,21 (t, 6 H,  $^3\text{J} = 7,1$  Hz), 1,44 (s, 9H), 2,49 (t, 2H,  $^3\text{J} = 6,6$  Hz), 3,03 (d, 2 H,  $^2\text{J} = 21,3$  Hz), 3,37 (s, 6H), 3,52-3,78 (m, 56 H), 3,83 (t, 4H,  $^3\text{J} = 5,2$  Hz), 3,98-4,03 (m, 4 H), 4,08-4,14 (m, 6 H), 6,52 (d, 2H,  $4\text{J} = 2,5$  Hz).



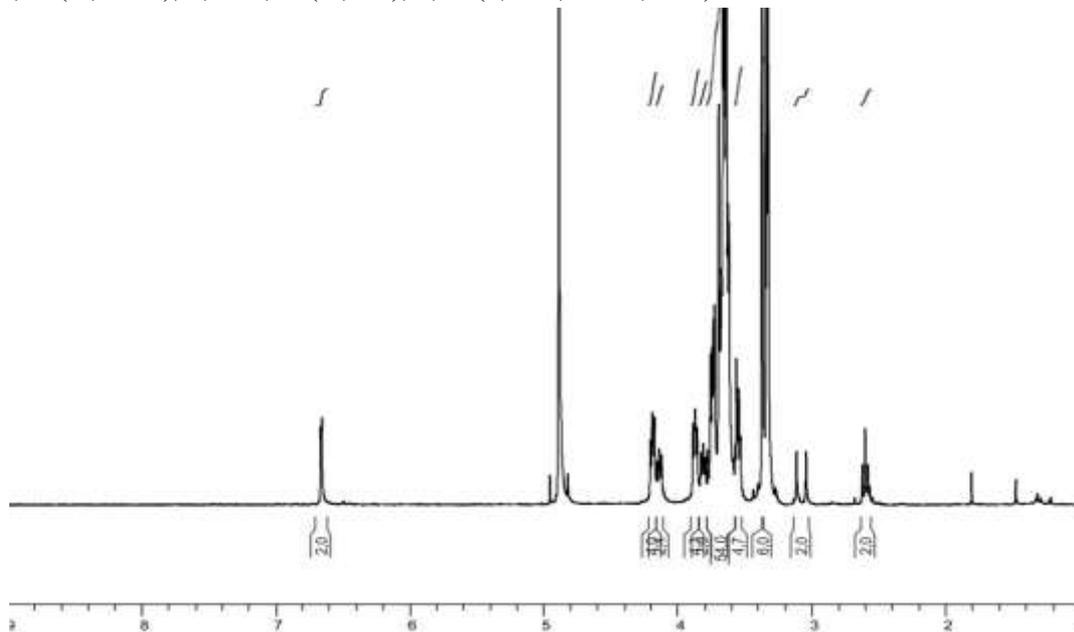
**RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) :**  $\delta$  (ppm) = 16,33 ( $^3\text{J} = 5,5$  Hz), 27,97, 29,50, 33,59 ( $^1\text{J} = 138,6$  Hz), 58,81, 61,95 ( $^2\text{J} = 6,6$  Hz), 66,74, 68,76, 69,56, 70,23, 70,53, 70,45, 70,67, 71,79, 72,19, 80,21, 109,33 ( $^3\text{J} = 5,6$  Hz), 126,74 ( $^2\text{J} = 9,1$  Hz), 137,32 ( $^5\text{J} = 3,1$  Hz), 152,39 ( $^4\text{J} = 2,5$  Hz), 170,65.



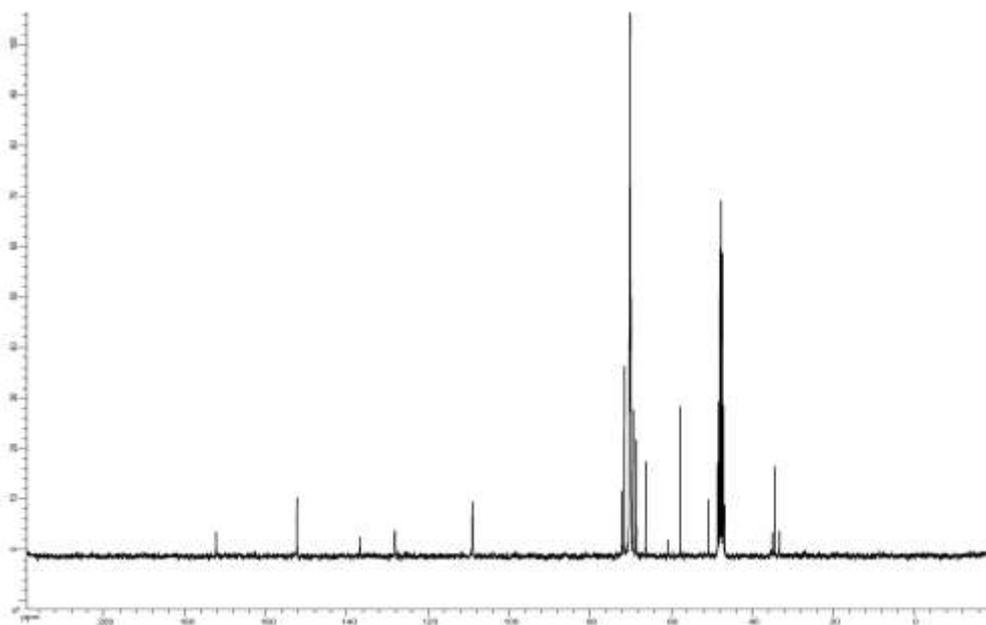
**ANACOOH**



**RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>)** : δ (ppm) = 2,61 (t, 2 H, <sup>3</sup>J = 6,1 Hz), 3,09 (d, 2 H, <sup>2</sup>J = 21,5 Hz), 3,38 (s, 6 H), 3,54-3,89 (m, 60 H), 4,13-4,21 (m, 6H), 6,67 (d, 2 H, <sup>4</sup>J = 2,5 Hz).

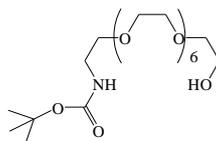


**RMN <sup>13</sup>C (MeOD)** : δ (ppm) = 34,42, 34,66 (<sup>1</sup>J = 135,9 Hz), 57,80, 66,30, 69,46, 69,99, 70,04, 70,09, 70,10, 70,38, 70,62, 70,70, 71,61, 72,17, 109,12 (<sup>3</sup>J = 5,9 Hz), 128,24 (<sup>2</sup>J = 9,1 Hz), 136,85 (<sup>5</sup>J = 3,1 Hz), 152,38 (<sup>4</sup>J = 2,4 Hz), 172,35.

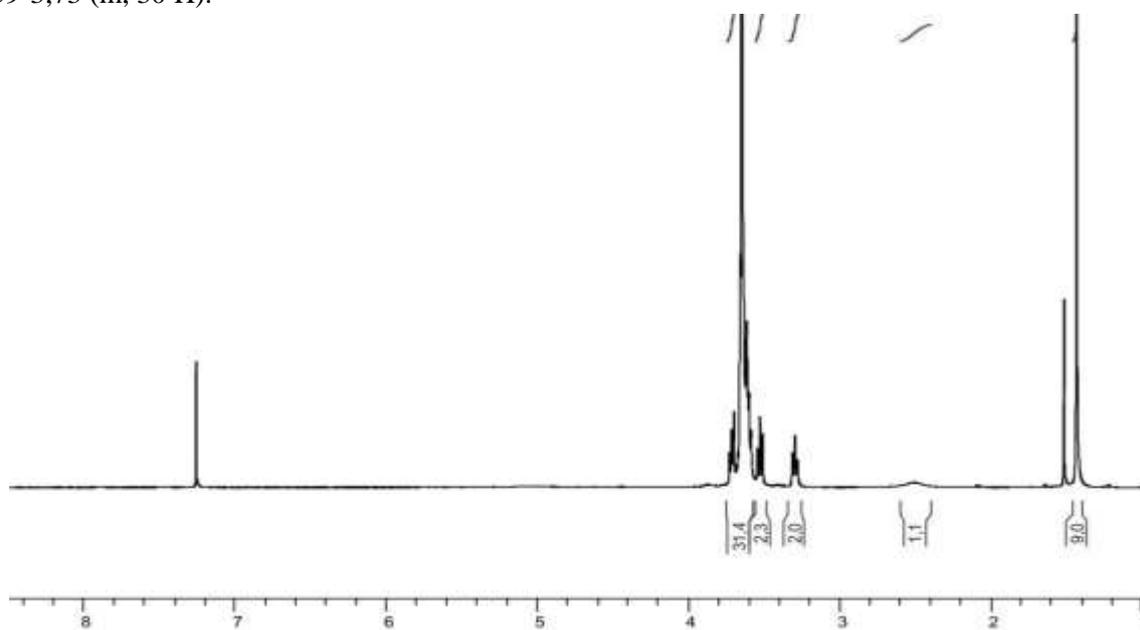


## 11.3 Synthèse du dendron ANANH2 : finalisation

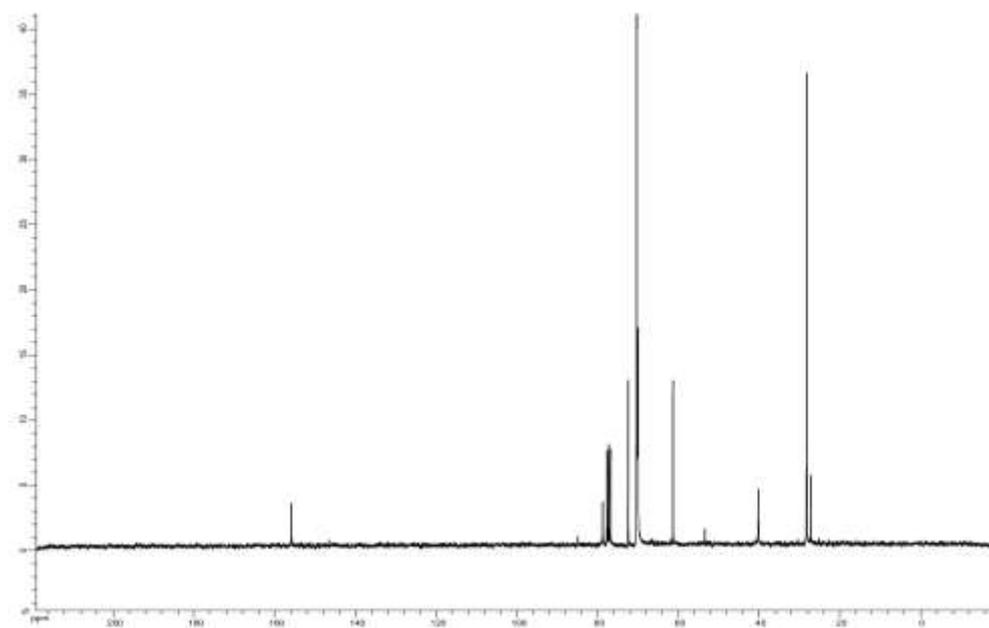
### Composé 10



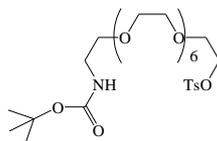
RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta$  (ppm) = 1,44 (s, 9 H), 3,30 (t, 2 H,  $^3\text{J} = 5,0$  Hz), 3,53 (t, 2H,  $^3\text{J} = 5,0$  Hz), 3,59-3,73 (m, 30 H).



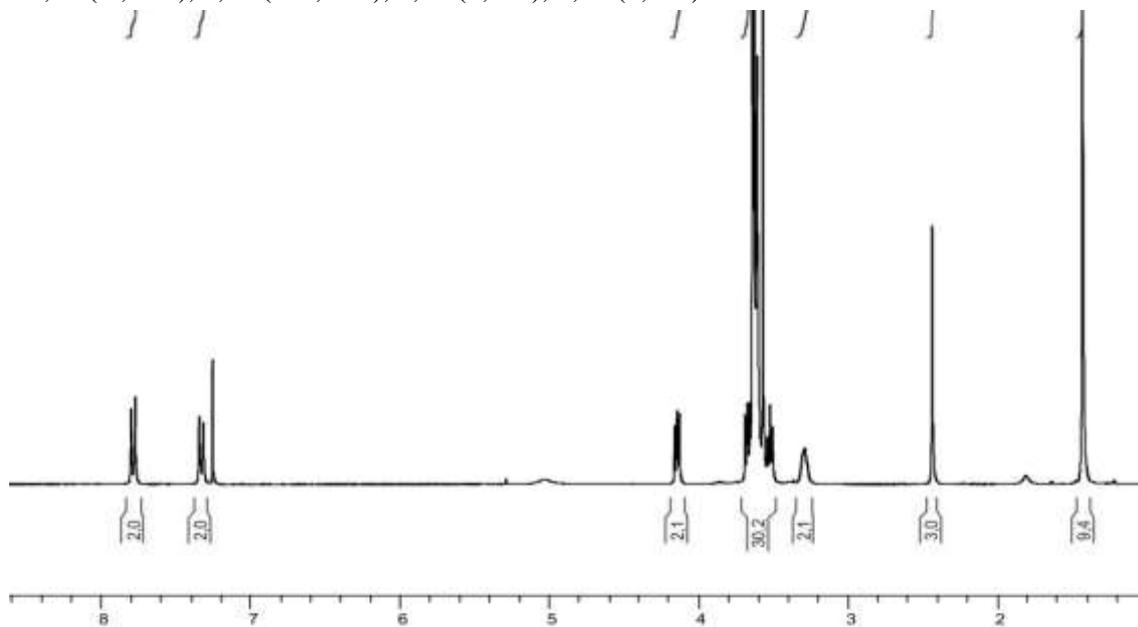
RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta$  (ppm) = 28,35, 40,27, 61,43, 70,08, 70,10, 70,23, 70,45, 72,52, 78,84, 155,93.



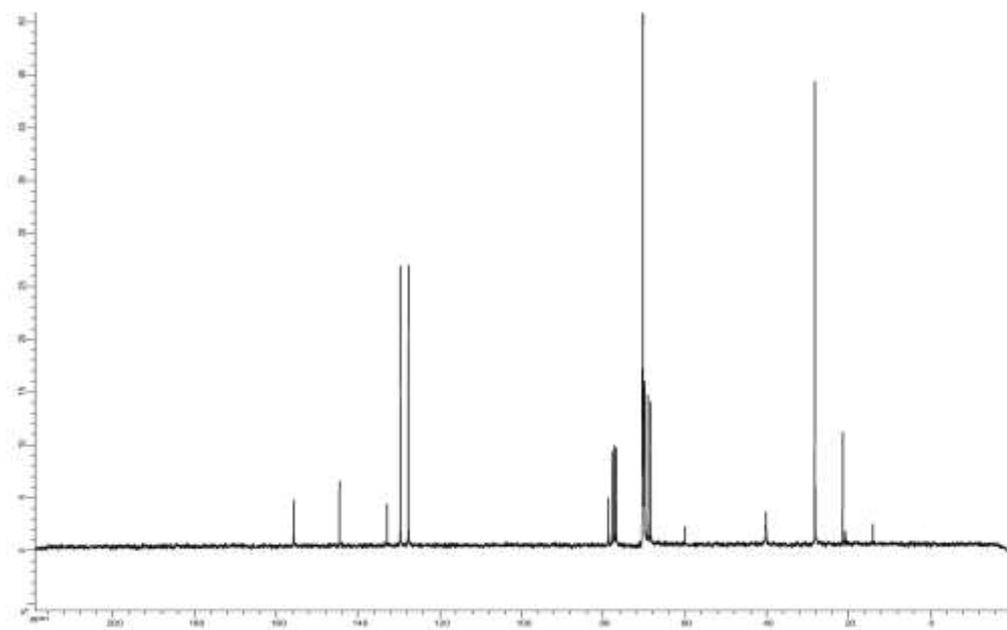
## Composé 11



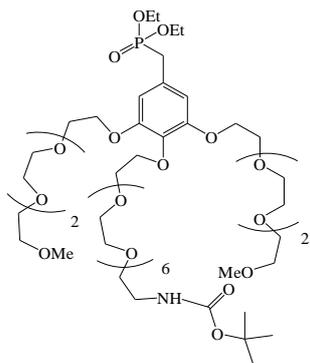
**RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) :**  $\delta$  (ppm) = 1,43 (s, 9 H), 2,44 (s, 3 H), 3,30 (m, 2 H), 3,51-3,69 (m, 28 H), 4,13-4,17 (m, 2 H), 5,04 (br s, 1 H), 7,33 (d, 2H), 7,79 (d, 2H).



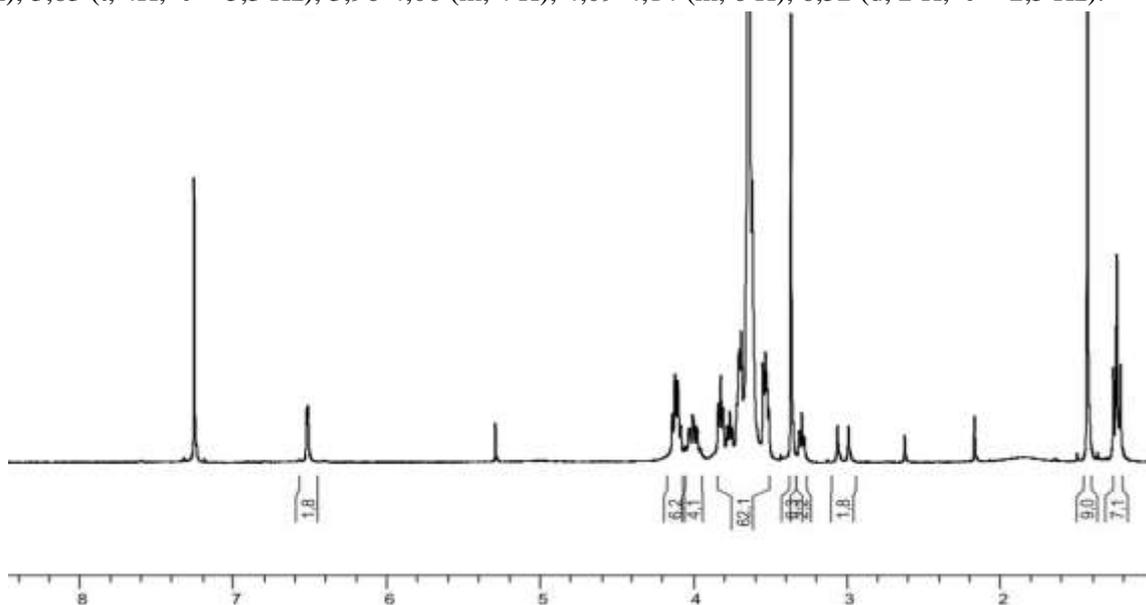
**RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) :**  $\delta$  (ppm) = 21,47, 28,32, 40,28, 68,50, 69,22, 70,00, 70,09, 70,41, 70,54, 78,79, 127,79, 129,73, 132,98, 144,65, 155,84.



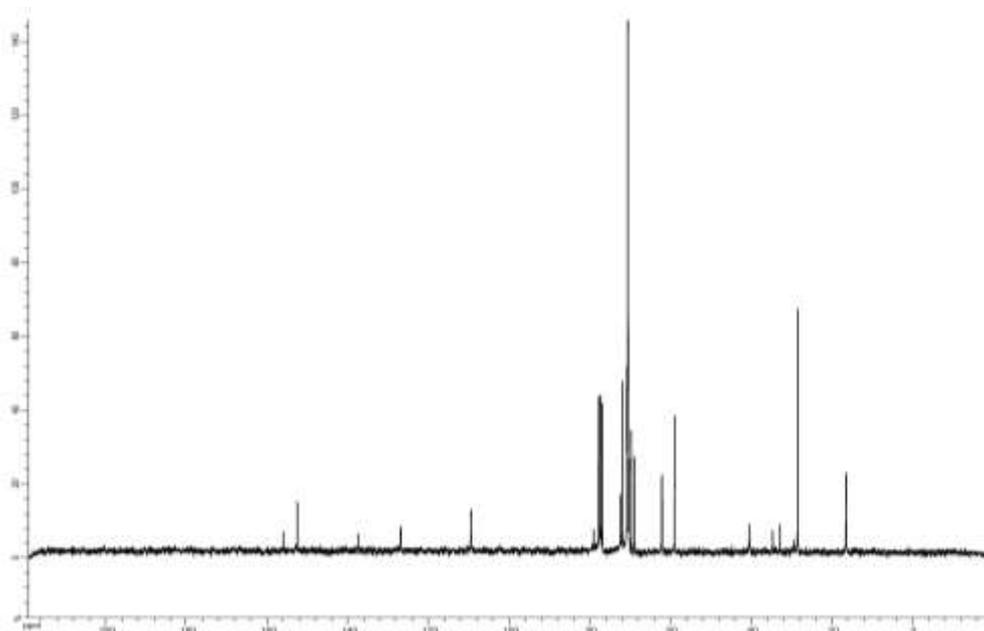
## Composé 12



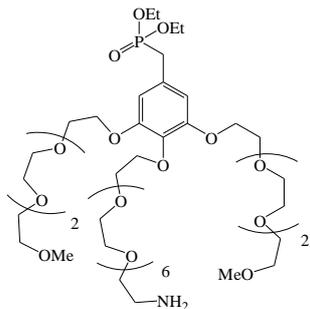
**RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) :**  $\delta$  (ppm) = 1,24 (t, 6 H,  $^3\text{J} = 6,9$  Hz), 1,44 (s, 9 H), 3,03 (d, 2H,  $^2\text{J} = 21,5$  Hz), 3,30 (t, 2 H,  $^3\text{J} = 5,0$  Hz), 3,37 (s, 6 H), 3,51-3,57 (m, 6 H), 3,62-3,72 (m, 45 H), 3,77 (t, 2 H,  $^3\text{J} = 5,3$  Hz), 3,83 (t, 4H,  $^3\text{J} = 5,3$  Hz), 3,96-4,06 (m, 4 H), 4,09-4,14 (m, 6 H), 6,52 (d, 2 H,  $^4\text{J} = 2,5$  Hz).



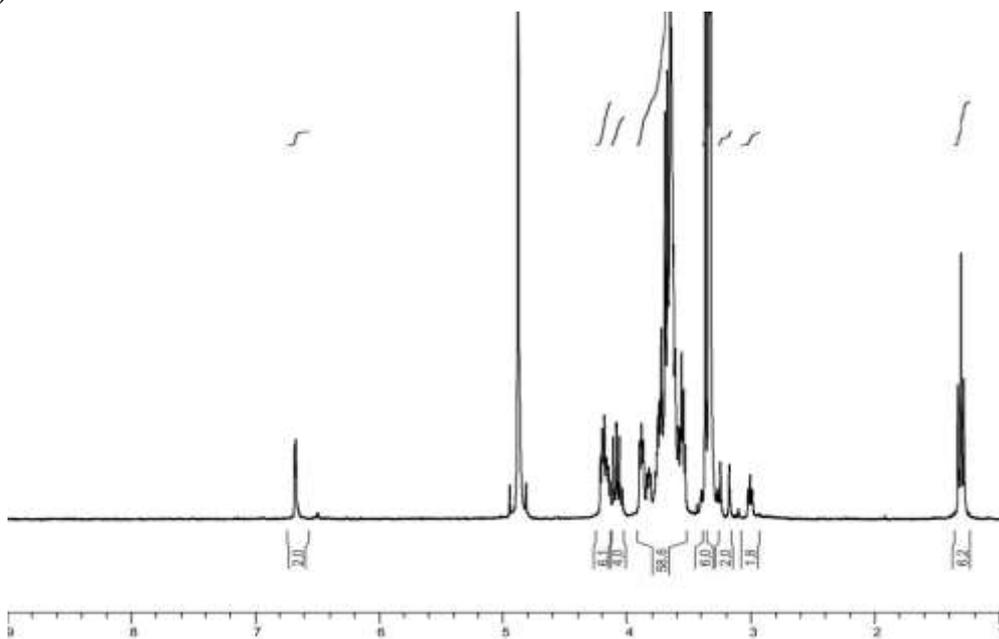
**RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) :**  $\delta$  (ppm) = 16,50, 28,48, 33,31, 40,42, 59,01, 62,14, 68,92, 69,73, 70,24, 70,28, 70,62, 70,84, 71,97, 72,36, 79,06, 109,50, 126,93, 137,50, 152,56, 156,03.



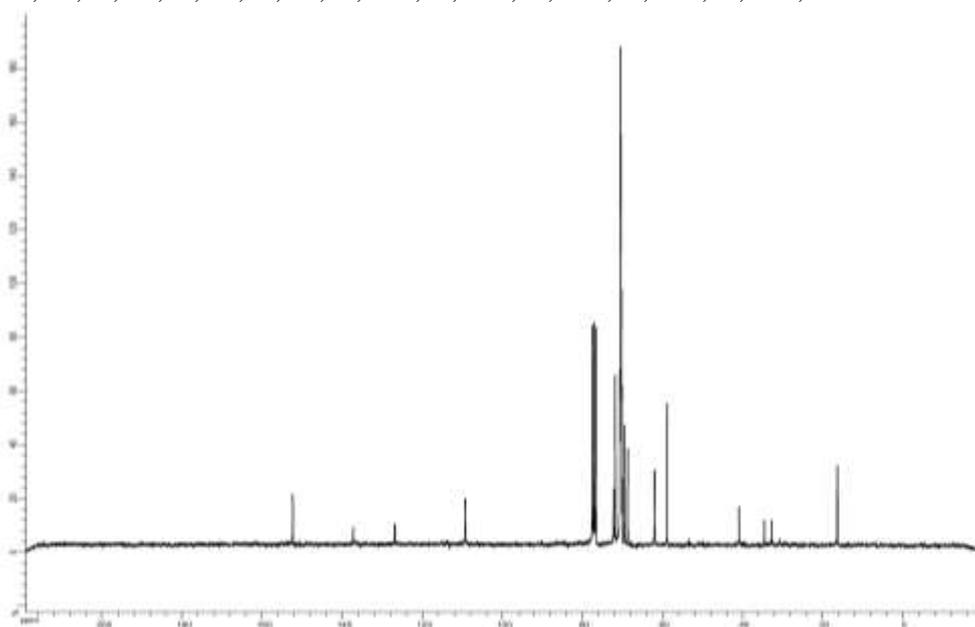
### Composé 13



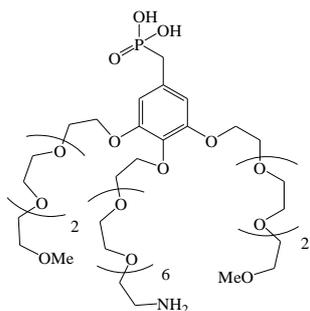
RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta$  (ppm) = 1,31 (t, 6 H,  $^3\text{J} = 6,9$  Hz), 3,01 (t, 2 H,  $^3\text{J} = 5,2$  Hz), 3,22 (d, 2 H,  $^2\text{J} = 21,5$  Hz), 3,37 (s, 6 H), 3,53-3,90 (m, 56 H), 4,06-4,12 (m, 4 H), 4,14-4,22 (m, 6 H), 6,68 (d, 2 H,  $^4\text{J} = 2,5$  Hz).



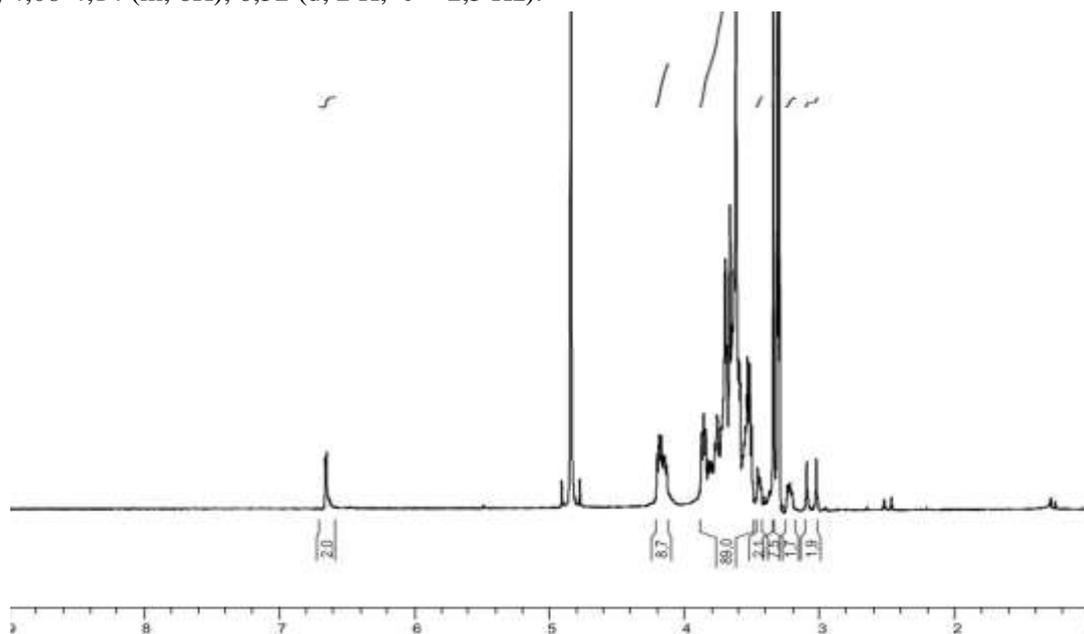
RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta$  (ppm) = 16,50, 28,48, 33,31, 40,42, 59,01, 62,14, 68,92, 69,73, 70,24, 70,28, 70,62, 70,84, 71,97, 72,36, 79,06, 109,50, 126,93, 137,50, 152,56, 156,03.



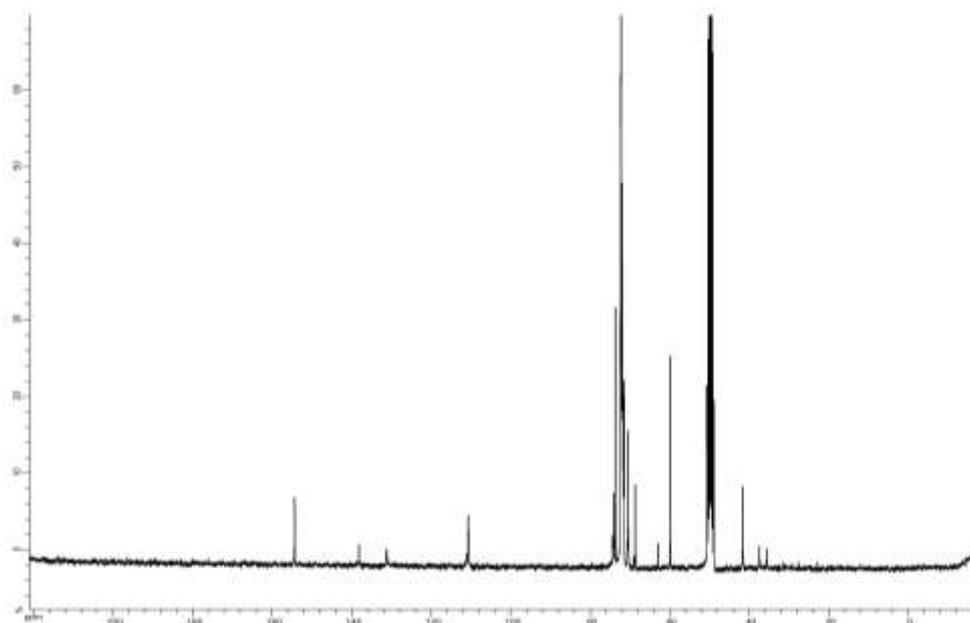
ANANH2



**RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) :**  $\delta$  (ppm) = 1,21 (t, 6 H,  $^3\text{J} = 7,1$  Hz), 1,44 (s, 9 H), 2,49 (t, 2 H,  $^3\text{J} = 6,6$  Hz), 3,03 (d, 2 H,  $^2\text{J} = 21,3$  Hz), 3,37 (s, 6 H), 3,52-3,78 (m, 54 H), 3,83 (t, 4 H,  $^3\text{J} = 5,2$  Hz), 3,98-4,03 (m, 4 H), 4,08-4,14 (m, 6H), 6,52 (d, 2 H,  $^4\text{J} = 2,5$  Hz).



**RMN  $^{13}\text{C}$  (MeOD) :**  $\delta$  (ppm) = 35,64, 41,73, 59,95, 68,78, 70,53, 71,58, 71,67, 71,78, 71,87, 71,89, 71,94, 72,06, 72,14, 72,34, 72,44, 73,77, 74,19, 110,76, 131,24, 138,23, 154,44.



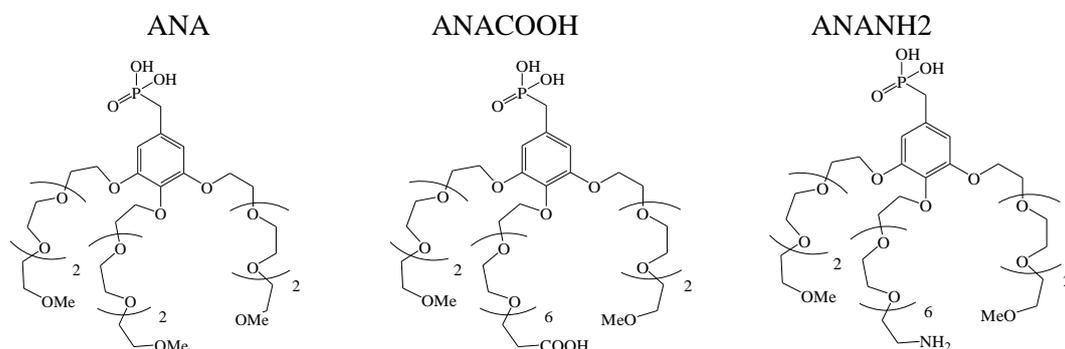
# LISTE DES ABREVIATIONS LES PLUS UTILISEES

## Nanoparticules après synthèses

- NPSco = nanoparticules synthétisées par co-précipitation nues ;
- NPSco@OA = nanoparticules synthétisées par co-précipitation sur lesquelles des molécules d'acide oléique ont été greffées
- NPStd@OA = nanoparticules synthétisées par décomposition thermique recouvertes de molécules d'acide oléique ;
- NPStd = nanoparticules synthétisées par décomposition thermique sans les molécules d'acide oléique.

## Les molécules et dendrons

- PEG = chaîne polyéthylène glycol ;
- OA= acide oléique
- Dendrons =



## Nanoparticules dendronisées

- NPSco@ANA = nanoparticules synthétisées par co-précipitation et fonctionnalisées par greffage direct avec le dendron ANA ;
- NPSco@ANACOOH = nanoparticules synthétisées par co-précipitation et fonctionnalisées par greffage direct avec le dendron ANACOOH ;
- NPSco@ANANH2 = nanoparticules synthétisées par co-précipitation et fonctionnalisées par greffage direct avec le dendron ANANH2 ;
- NPSco@ANA (EL) = nanoparticules synthétisées par co-précipitation et fonctionnalisées par échange de ligands avec le dendron ANA ;
- NPStd@ANA = nanoparticules synthétisées par décomposition thermique et fonctionnalisées par échange de ligands avec le dendron ANA ;
- NPStd@ANACOOH = nanoparticules synthétisées par décomposition thermique et fonctionnalisées par échange de ligands avec le dendron ANACOOH ;
- NPStd@ANAN2 = nanoparticules synthétisées par décomposition thermique et fonctionnalisées par échange de ligands avec le dendron ANANH2 ;

## Autre

- PIE = point isoélectrique ;
- NPS = nanoparticule superparamagnétique ;
- DLS = mesure de la distribution de taille des nanoparticules en suspension par diffusion dynamique de la lumière ;
- Méthode A = première méthode de greffage (direct) réalisée (travaux de la thèse de Daou T.J.) avec des NPSCO de 12 nm et le dendron ANA ;
- Méthode B = méthode développée aux cours de nos premiers travaux où l'on favorise la dispersion des NPSCO lors de la réaction de greffage direct avec des dendrons ANA ;
- Méthode B/pHréa = méthode développée aux cours de nos premiers travaux où l'on favorise la dispersion des NPSCO lors de la réaction de greffage direct avec des dendrons ANA à la différence que le pH du milieu réactionnel est fixé pour favoriser les interactions électrostatiques entre les NPSCO et les dendrons ;
- Méthode B/pHréa op = méthode identique à la méthode B/pHréa sauf qu'elle a été optimisée pour favoriser la stabilité des suspensions.



## REFERENCES

---

- <sup>1</sup> Baibich M. N.; Broto J. M.; Fert A.; Van Dau F. N.; Petroff F.; Etienne P.; Creuzet G.; Friederich, A.; Chazelas J.; *Phys. Rev. Lett.* **1988**, *61* (21), 2472.
- <sup>2</sup> Binasch G.; Grünberg P., Saurenbach F.; Zinn W.; *Phys. Rev. B* **1989**, *39* (7), 4828.
- <sup>3</sup> Futamoto M.; *J. Opt. Adv. Mat.* **2006**, *8*, 1861.
- <sup>4</sup> Gupta A. K.; Sun J.Z.; *J. Mag. Mag. Mat.* **1999**, *200* (1-3), 24.
- <sup>5</sup> Liong M. ; Lu J. ; Kovochich M. ; Xia T. ; Ruehm S. G.; Andre E. N.; Tamanoi F.; Zink J. I.; *ACS NANO* **2008**, *2* (5), 889.
- <sup>6</sup> Arruebo M.; Fernández-Pacheco R.; Ibarra M. R.; Santamaría J.; *Nano Today* **2007**, *2* (3), 22.
- <sup>7</sup> Kim J.; Piao Y.; Hyeon T.; *Chem. Soc. Rev.* **2009**, *38*, 372.
- <sup>8</sup> Billotey C.; Wilhelm C.; Devaud M.; Bacri J.C.; Bittoun J.; Gazeau F.; *Magn. Reson. Medi.* **2003**, *49*, 646.
- <sup>9</sup> De M.; Ghosh P. S.; Rotello V. M.; *Adv. Mater.* **2008**, *20*, 4225.
- <sup>10</sup> Bragg W.H.; *Nature.* **1915**, *95*, 561.
- <sup>11</sup> Nishikawa S.; Proc. Tokyo Math.; *Phys. Soc.* **1915**, *8*, 199.
- <sup>12</sup> Cudennec Y.; Lecerf A.; *Solid State Sc.* **2005**, *7*, 520.
- <sup>13</sup> Cornel R.M.; Schwertmann U.; The Iron Oxides: Structure, Properties, Reactions, Occurrence, and Uses. *Weinheim, New York: VCH.* **1996**.
- <sup>14</sup> JCPDS. International Tables for Diffraction Data, Powder Diffraction File.
- <sup>15</sup> Morales M.P.; Pecharroman C.; Gonzalez-Carrero T.; *J. solid state Chem.* **1994**, *108*, 158.
- <sup>16</sup> Shmakov A.N.; Kryukova G.N.; Tsybulya S.V.; *J. Appl. Cryst.* **1995**, *28*, 141.
- <sup>17</sup> Greaves C. J.; *Solid State Chem.* **1983**, *49*, 325.
- <sup>18</sup> Haneda K.; Morrish A.H.; *Solid State Com.* **1977**, *22*, 779.
- <sup>19</sup> Morales M.P.; Andres-Verges M.; Veintemillas-Verdaguer S.; Montero M.I.; Serna C.J.; *J. Magn. Magn. Mater.* **1999**, *203*, 146.
- <sup>20</sup> Millot N.; Thèse de doctorat, Université de Bourgogne, Dijon. **1998**.

- 
- <sup>21</sup> Belin T.; Thèse de doctorat, Université de Bourgogne, Dijon. **2002**.
- <sup>22</sup> Gillot B.; *Vibrational Spectroscopy*. **1994**, 6, 127.
- <sup>23</sup> Cornell R.M.; Schwertmann U.; *The Iron Oxides : Structure, Properties, Reactions, Occurrences and uses*, Wiley, New York, USA, ISBN 3527302743. **2003**.
- <sup>24</sup> Cornell R.M.; Schwertmann U.; *Iron Oxides in the Laboratory-Preparation and Characterisation*, VCH Editions, Weinheim, Germany. **1991**.
- <sup>25</sup> Bruce I.J.; Taylor J.; Todd M.; Davies M.J.; Borioni E.; Sangregorio C.; Sen T.; *J. Magn. Magn. Mater.* **2004**, 284, 145.
- <sup>26</sup> Waldron R.D.; *Phys. Rev.* **1955**, 99, 1727.
- <sup>27</sup> White W.B.; DeAngelis B.A.; *Spectrochimica Acta*. **1967**, 23A, 985.
- <sup>28</sup> Belin T.; Millot N.; Caillot T.; Aymes D.; Niepce J.C. *J. Solid. State. Chem.* **2002**, 163, 459.
- <sup>29</sup> Daou T. J.; Pourroy G.; Begin-Colin S.; Greneche J. M.; Ulhaq-Bouillet C.; Legare P.; Bernhardt P.; Leuvre C.; Rogez G.; *Chem. Mater.* **2006**, 18 (18), 4399.
- <sup>30</sup> Dunlop, D. J.; Özdemir, O. *Rock Magnetism, Fundamentals and frontiers*. **1997**, Vol.3.
- <sup>31</sup> Gorter E.W.; *Philips Research Reports*. **1954**, 9, 295.
- <sup>32</sup> Néel L.; *Annales de Physique*. **1948**, 12, 3, 137.
- <sup>33</sup> Han D.H.; Wang H.L.; Luo J.; *J. Magn. Magn. Mater.* **1994**, 136, 176.
- <sup>34</sup> Walz F.; *J. Phys. : Condens. Matter*. **2002**, 14, R285.
- <sup>35</sup> Verwey E. J.; Haayman P. W.; Romeijan, F. C.; *J. Chem. Phys.* **1947**, 15.
- <sup>36</sup> Brabers, V. A. M. *Handbook of Magnetic Materials*. Elsevier Science, North Holland, **1995**.
- <sup>37</sup> Zijlstra H.; *Ferromagnetic Materials*, North-Holland, Amsterdam. **1982**, Vol. 3.
- <sup>38</sup> Brice-Profeta S.; Thèse de doctorat Université de Paris VI, Paris. **2004**.
- <sup>39</sup> Iizumi M.; Koetzle T. F.; Shirane G.; Chikazumi S.; Matsui M.; Todo S.; *Acta Cryst., sect. B struct. Crystallogr. Cryst. Chem.* **1982**, 38, 2121.
- <sup>40</sup> Zuo J. M.; Spence J. C. H.; Petuskey W.; *Phys. Rev. B*. **1990**, 42, 8451.
- <sup>41</sup> Coey J.M.D.; *Phys. Rev. Lett.* **1971**, 27, 1140.

- 
- <sup>42</sup> Berkowitz A.E.; Schuele W.J.; Flanders P.J.; *J. Appl. Phys.* **1968**, 39,1261.
- <sup>43</sup> Mollard P.; Germe P.; Rousset A.; *Physica B+C*. **1999**, 203,146.
- <sup>44</sup> Kodama R.H.; Berkowitz A.E.; *Phys. Rev. B*. **1999**, 59, 6321.
- <sup>45</sup> Sato T.; Iijima T, Sekin M.; Inagaki N.; *J. Magn. Magn. Mater.* **1987**, 65, 252.
- <sup>46</sup> Morrish A.H.; Haneda K.; *J. Appl. Phys.* **1981**, 52, 2496.
- <sup>47</sup> Haneda K.; Morrish A.H.; *J. Appl. Phys.* **1988**, 63, 4258.
- <sup>48</sup> Lin D.; Nunes A.C.; Majkrzak C.F.; Berkowitz A.E.; *J. Magn. Magn. Mater.* **1995**, 145, 343.
- <sup>49</sup> Gazeau F.; Bacri J.C.; Gendron F.; Perzynski R.; Raikher Y.L.; Stepanov V.L.; Dubois E.; *J. Magn. Magn. Mater.* **1998**, 186, 175.
- <sup>50</sup> Tronc E.; Fiorani D.; Noguès M.; Testa A.; Lucari F.; D’Orazio F.; Grenèche J.M.; Wernsdorfer W.; Galvez N.; Chanéac C.; Maily D.; Jolivet J.P.; *J. Magn. Magn. Mater.* **2003**, 262, 6.
- <sup>51</sup> Parker F.T.; Foster M.W.; Margulies D.T.; Berkowitz A.E.; *Phys. Rev. B*. **1993**, 47, 7885.
- <sup>52</sup> Popplewell J.; Sakhnini L.; *J. Magn. Magn. Mater.* **1995**, 149, 72.
- <sup>53</sup> Goya G.F.; Berquo T.S.; Fonseca F.C.; Morales M.P.; *J. Appl. Phys.* **2003**, 94, 3520.
- <sup>54</sup> Panda R. N.; Gajbhiye N. S.; Balaji G.; *J. All. Comp.* **2001**, 326, 50.
- <sup>55</sup> Marco M.D.; Port M.; Couvreur P.; Dubernet C.; Ballirano P.; Sadun, C.; *J. Am. Ceram. Soc.* **2006**, 128, 10054.
- <sup>56</sup> Aragon R.; Buttrey D.; Sheperd J.; Honig J.M.; *Phys. Rev. B*. **1985**, 32, 1818.
- <sup>57</sup> Ramdani A.; Steinmetz J.; Gleitzer C.; Coey J.M.D.; Friedt J.M.; *J. Phys. Chem. Solids*. **1987**, 48, 217.
- <sup>58</sup> Millot N.; Keller N.; Perriat P.; *Phys. Rev. B*. **2001**, 64, 012402.
- <sup>59</sup> Honig J.M.; *J. Alloys Compd.* **1995**, 229, 24.
- <sup>60</sup> Brinker C.J.; Scherer G.W.; *Sol–Gel Science*. Academic Press: San Diego, **1990**.
- <sup>61</sup> Dai Z.; Meiser F.; Mo’hwald H.; *J. Colloid Interface Sci.* **2005**, 28 (1), 298.
- <sup>62</sup> Ismail A. A.; *Appl. Catal., B* **2005**, 58, 115.

- 
- <sup>63</sup> Del Monte F.; Morales M. P.; Levy D.; Fernandez A.; Ocana M.; Roig A.; Molins E.; O'Grady, K.; Serna C.; *Langmuir* **1997**, 13, 3627.
- <sup>64</sup> Chaneac C.; Tronc E.; Jolivet J. P.; *Nanostruct. Mater.* **1995**, 6, 715.
- <sup>65</sup> Niznansky D.; Rehspringer J. L.; Drillon, M.; *IEEE Trans. Magn.* **1994**, 30, 821.
- <sup>66</sup> Solinas S.; Piccaluga G.; Morales M. P.; Serna C. J.; *Acta Mater.* **2001**, 2805.
- <sup>67</sup> Poul L.; Ammar S.; Jouini N.; Fiévet F.; Villain F.; *J. Sol-Gel Sci. Tech.* **2003**, 26, 261.
- <sup>68</sup> Fievet F.; Lagier J. P.; Blin B.; Beaudoin B.; Figlarz M.; *Solid State Ionics* **1989**, 198, 32.
- <sup>69</sup> Tzitzios V. K.; Petridis D.; Zafiropoulou I.; Hadjipanayis G.; Niarchos D.; *J. Magn. Magn. Mater.* **2005**, 294 (2), e95.
- <sup>70</sup> Kurihara L. K.; Bruce R. W.; Fliflet, A.; Lewis D. U.S.; *Chem. Abstr.* 2005, 140, 185634.
- <sup>71</sup> Merikhi J.; Jungk H.-O.; Feldmann C.; *J. Mater. Chem.* **2000**, 10, 1311.
- <sup>72</sup> Cai W.; Wan J.; *J. Colloid Interface Sci.* **2007**, 305, 366.
- <sup>73</sup> Joseyphus R. J.; Kodama D.; Matsumoto T.; Sato, Y.; Jeyadevan B.; Tohji K.; *J. Magn. Magn. Mater.* **2007**, 310 (2), 2393.
- <sup>74</sup> Langevin D.; *Annu. Rev. Phys. Chem.* **1992**, 43, 341.
- <sup>75</sup> Paul B.K.; Moulik, S.P.; *Curr. Sci.* **2001**, 80, 990.
- <sup>76</sup> Gupta A.K.; Gupta, M.; *Biomaterials.* **2005**, 26, 3995.
- <sup>77</sup> Carpenter E.E.; Seip C.T.; O'Connor C.J.; *J. Appl. Phys.* **1999**, 85, 5184.
- <sup>78</sup> Liu C.; Zou B.; Rondinone A.J.; Zhang Z.J.; *J. Phys. Chem. B.* **2000**, 104, 1141.
- <sup>79</sup> Woo K.; Lee H.J.; Ahn J.-P.; Park Y.S.; *Adv. Mater.* **2003**, 15, 1761.
- <sup>80</sup> Moumen N.; Pileni M.P.; *J. Phys. Chem.* **1996**, 100, 1867.
- <sup>81</sup> Inouye K.; Endo R.; Otsuka Y.; Miyashiro K.; Kaneko K.; Ishikawa T.; *J. Phys. Chem.* **1982**, 86, 1465.
- <sup>82</sup> Tan, W.; Santra, S.; Zhang, P.; Tapeç, R.; Dobson, J. US Patent 6 548 264, **2003**.
- <sup>83</sup> Morales M.P.; Gonzalez-Carreno T.; Serna C.J.; *J. Mater. Res.* **1992**, 7, 2538.
- <sup>84</sup> Ocana M.; Morales M.P.; Serna C.J.; *J. Colloid Interface Sci.* **1995**, 171, 85.

- 
- <sup>85</sup> Ocana M.; Rodriguez-Clemente R.; Serna C.J.; *Adv. Mater.* **1995**, 7, 212.
- <sup>86</sup> Sugimoto T.; Muramatsu A.; *J. Colloid Interface Sci.* **1996**, 184, 626.
- <sup>87</sup> Kahn H. R.; Petrikowski K.; *J. Magn. Magn. Mater.* **2000**, 215-216, 526.
- <sup>88</sup> Gonzalez-Carreno T.; Morales M. P.; Gracia M.; Serna C. J.; *Mater.Lett.* **1993**, 18, 151.
- <sup>89</sup> Kim E. H.; Lee H. S.; Kwak B. K.; Kim B.-K.; *J. Magn. Magn.Mater.* **2005**, 289, 328
- <sup>90</sup> Abu Mukh-Qasem R.; Gedanken A.; *J. Colloid Interface Sci.* **2005**, 284 (2), 489.
- <sup>91</sup> Alvarez G. S.; Muhammed M.; Zagorodni A. A.; *Chem. Eng. Sci.***2006**, 61, 4625.
- <sup>92</sup> Massart R.; Cabuil V.; *Journal de chimie physique.* **1987**, 84, 967.
- <sup>93</sup> Vayssières L.; Chanéac C.; Tronc E.; Jolivet J.P.; *J. Colloid Interface Sci.* **1998**, 205, 205.
- <sup>94</sup> Jolivet J.P.; Tronc E. J.; *Colloid Interface Sci.* **1998**, 125, 688.
- <sup>95</sup> Theory, Production and Mechanism of Formation of Monodispersed Hydrosols BY VICTOR K . LAMER AND ROBERTH . DINEGAR
- <sup>96</sup> Massart R.; *C. R. Acad. Sc. Paris.* 1980, 291C, 1.
- <sup>97</sup> Massart R.; *IEEE Trans. Magn.* **1981**, 17, 1247.
- <sup>98</sup> Iron oxides in the laboratory: preparation and characterization, U Schwertmann, RM Cornell - 2000 – books.
- <sup>99</sup> Kim D.K.; Zhang Y.; Voit W.; Rao K.V.; Muhammed M.; *J Magn Magn Mater* **2001**, 225(1–2), 30.
- <sup>100</sup> Gupta A. K., Curtis A. S. G.; *Biomaterials* **2004**, 25(15), 3029.
- <sup>101</sup> Jolivet J.P.; Belleville P.; Tronc E.; Livage J.; *Clays Clay Miner.* **1992**, 40, 531.
- <sup>102</sup> Tronc E.; Belleville P.; Jolivet J.P.; Livage J.; *Langmuir.* **1992**, 8, 313.
- <sup>103</sup> Jolivet J.P.; Tronc E.; Chanéac C.; *R. Chimie.* **2003**, 5, 659.
- <sup>104</sup> Jolivet J.P.; Chanéac C.; Tronc E.; *Chem. Comm.* 2004, 5, 481.
- <sup>105</sup> Jolivet J.P.; Vayssières L.; Chanéac C.; Tronc E.; *Mater. Res. Symp. Proc.* **1997**, 432, 145.
- <sup>106</sup> Daou T.J.; Thèse de doctorat, Université de Strasbourg, Strasbourg **2007**.

- 
- <sup>107</sup> Salazar J. S.; Perez L.; Abril O.; Truonc Phuoc L.; Ihiwakrim D.; Vazquez M.; Greneche J.M., Sylvie Bégin-Colin S.; Pourroy G., *Chem. Mater.* Soumis.
- <sup>108</sup> Murray C.B.; Norris D.J.; Bawendi M.G.; *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, 115, 8706.
- <sup>109</sup> Peng X.; Wickham J. Alivisatos A.P.; *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120, 5343.
- <sup>110</sup> O'Brien S.; Brus L.; Murray C.B.; *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123, 12085.
- <sup>111</sup> Park J.; An K.; Hwang Y.; Park J.G.; Noh H.J.; Kim J.-Y.; Park J.-H.; Hwang N.M.; Hyeon T.; *Nat. Mater.* **2004**, 3, 891.
- <sup>112</sup> Sun S.; Zeng H.; Robinson D.B.; Raoux S.; Rice, P.M.; Wang S.X.; Li G.; *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 273.
- <sup>113</sup> Redl F.X.; Black C.T.; Papaefthymiou G.C.; Sandstrom R.L.; Yin M.; Zeng H.; Murray C.B.; O'Brien S.P.; *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 14583.
- <sup>114</sup> Park J.; Lee E.; Hwang N.M.; Kang M.; Kim S.C.; Hwang Y.; Park J.G.; Noh H.J.; Kim J.Y.; Park J.H.; Hyeon T.; *Ang. Chem. Inter. Ed.* **2005**, 44 (19), 2872.
- <sup>115</sup> Park J.; An K.; HWANG Y.; et al.; *Nature Materials*, **2004**, 3, 891.
- <sup>116</sup> Bronstein L. M.; Huang X.; Retrum J.; Schmucker A.; Pink M.; Stein B. D.; Dragnea B.; *Chem. Mater.* **2007**, 19 (15), 3624.
- <sup>117</sup> Rockenberger J.; Scher E.C.; Alivisatos A.P.; *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121, 11595.
- <sup>118</sup> Farrell D.; Majetich S.A.; Wilcoxon J.P.; *J. Phys. Chem. B.* **2003**, 107, 11022.
- <sup>119</sup> Jana N.R.; Chen Y.; Peng X.; *Chem. Mater.* **2004**, 16, 3931.
- <sup>120</sup> Samia A.C.S.; Hyzer K.; Schlueter J.A.; Qin C.-J.; Jiang J.S.; Bader S.D.; Lin X.-M.; *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 4126.
- <sup>121</sup> Demortière A.; Panissod P.; Pichon, B.; Pourroy, G.; Guillon D.; Donnio B.; Bégin-Colin S.; Size-Dependent Properties of Magnetic Iron Oxide Nanocrystals. *submitted*.
- <sup>122</sup> Li Y.; Afzaal M.; O'Brien P.; *J. Mater. Chem.* **2006**, 16, 2175.
- <sup>123</sup> Sun S.; Zeng H.; *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124(28), 8204.
- <sup>124</sup> Kovalenko M.V.; Bodnarchuk M.I.; Lechner R.T.; et al.; *JACS* **2007**, 129, 6352.
- <sup>125</sup> Roca A. G.; Niznansky D.; Poltierova-Vejpravova J.; Bittova B.; Gonzalez-Fernandez M. A.; Serna C. J.; Morales M. P.; *J. Appl. Phys.* **2009**, 105 (11), 114309.

- 
- <sup>126</sup> Sato S.; Murakata T.; Yanagi H.; Miyasaka F.; Iwaya S. J.; *Mater.Sci.* **1994**, 29, 5657
- <sup>127</sup> Tartaj P.; Morales M. P.; Veintemillas-Verdaguer S.; Gonzalez-Carreño T.; Serna C. J.; Synthesis, properties and biomedical applications of magnetic nanoparticles; *Handbook of Magnetic Materials*; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, **2006**; 403.
- <sup>128</sup> Li Z.; Choi C. J.; You J. H.; Kim B.; Zhang Z. D. J.; *Magn. Magn.Mater.* **2004**, 283, 8.
- <sup>129</sup> Li Z.; Chen H.; Bao H. B.; Gao M. Y.; *Chem. Mater.* **2004**, 16,1391.
- <sup>130</sup> Wooding A.; Kilner M.; Lambrick D.B.; *J. Colloid and Int. Sci.* **1991**, 144, 236.
- <sup>131</sup> Lesnikovich A.E.; Shunkevich T.M.; Naumenko V.N.; Vorobyova S.A.; Baykov M.W.; *J. Magn. Magn. Mater.* **1990**, 85, 14.
- <sup>132</sup> Hyeon T.; Lee S.S.; Park J.; Chung Y.; Na B.; *J. A. C. S.* **2001**, 123, 12798.
- <sup>133</sup> Wu K.T.; Kuo P.C.; Yao Y.D.; Tsai E.H.; *IEEE Transactions on Magnetics.* **1990**, 37, 2651.
- <sup>134</sup> Wooding A.; Kilner M.; Lambrick D.B.; *J. Colloid Interface Sci.* **1991**, 144, 236.
- <sup>135</sup> Shen L.; Laibinis P.E.; Hatton T.A.; *Langmuir.* **1999**, 15, 447.
- <sup>136</sup> Shen L.; Stachowiak A.; Hatton T.A.; Laibinis P.E.; *Langmuir.* **2000**, 16, 9907.
- <sup>137</sup> Colvin V.L.; Goldstein A.N.; Alivisatos A.P.; *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, 114, 5221.
- <sup>138</sup> Papell S.S.; Faber O.C.; *NASA Technical Note.* **1968**, NASA-TN-D-4676, 25.
- <sup>139</sup> Mendenhall G.D.; Geng Y.; Hwang J.; *J. Colloid Interface Sci.* **1996**, 184, 519.
- <sup>140</sup> Wormuth K.; *J. Colloid Interface Sci.* **2001**, 241, 366.
- <sup>141</sup> Ortega-Vinusea J. L.; Martín-Rodríguez A.; Hidalgo-Alvarez, R.; *J. Colloid Interface Sci.* **1996**, 184, 259.
- <sup>142</sup> Kobayashi M.; Skarba M.; Galletto P.; Cakara D.; Borbovec M.; *J. Colloid Interface Sci.* **2005**, 292, 139.
- <sup>143</sup> Lefebure S.; Dubois E.; Cabuil V.; Neveu S.; Massart R. *J. Mater.Res.* **1998**, 13, 2975.
- <sup>144</sup> Bacri J.-C.; Perzynski R.; Salin D.; *J. Magn. Magn. Mater.* **1990**, 85, 27.
- <sup>145</sup> Cornel R.M.; Schwertzman U.; Iron Oxides in the Laboratory-Preparation and Characterisation, *VCH Editions, Weinheim, Germany.* **1991**.

- 
- <sup>146</sup> Bacri J.; Perzynski R.; Salin D.; Cabuil V.; Massart R.; *J. Magn. Magn. Mater.* **1990**, 85, 27.
- <sup>147</sup> Chen M.; Yamamuro S.; Farrell D.; Majetich S. A.; *J. Appl. Phys.* **2003**, 93, 7551
- <sup>148</sup> Zhou W. L.; Carpenter E. E.; Lin J.; Kumbhar A.; Sims J.; O'Connor C.; *J. Eur. Phys. J. D* **2001**, 16, 289.
- <sup>149</sup> Morawski A. M.; Winter P. M.; Crowder K. C.; Caruthers S. D.; Fuhrlop R. W.; Scott, M. J.; Robertson J. D.; Abendschein D. R.; Lanza G. M.; Wickline S. A.; *Magn. Reson. Med.* **2004**, 51, 480.
- <sup>150</sup> Hao R.; Xing R.; Xu Z., Hou Y., Gao S.; Sun S.; *Adv. Mater.* **2010**, DOI: 10.1002/adma.201000260.
- <sup>151</sup> Sun C., Lee J.S.H.; Zhang M.; *Adv. Drug Del. Rev.* **2008**, 601252–1265
- <sup>152</sup> Roca A.G.; Costo R., Rebolledo A.F., Veintemillas-Verdaguer S.; Tartaj P., Gonzalez-Carreño T.; Morales M.P.; Serna C.J. ; *J. Phys. D: Appl. Phys.* **2009**, 42, 224002.
- <sup>153</sup> Fana Q.L.; Neohb K.G.; Kangb E.T.; Shuter B.; Wang S.C.; *Biomaterials* **2007**, 28, 5426.
- <sup>154</sup> Gonzales M.; Krishnan Kannan M.; *J. Magn. Magn. Mat.* **2007**, 311, 59.
- <sup>155</sup> Qin J., Laurent S., Jo Y.S., Roch A., Mikhaylova M., Bhujwala Z.M.; Muller R.N.; Muhammed M.; *Adv. Mater.* **2007**, 19, 1874.
- <sup>156</sup> Cha H.G.; Kim Y.H.; Kim C.W.; Kang Y.S.; *Sensors and Actuators B* **2007**, 126, 221.
- <sup>157</sup> Sahoo Y.; Pizem H.; Fried T.; Golodnitsky D.; Burstein L.; Sukenik C. N.; Markovich G. *Langmuir* **2001**, 17, 7907.
- <sup>158</sup> Frantz R.; Durand J.O.; Granier M.; Lanneau G.F.; *Tet. Lett.*, **2004**, 45, 2935.
- <sup>159</sup> Frantz R.; Granier M.; Durand J.O.; Lanneau G.F.; *Tet. Lett.*, **2002**, 43, 9115.
- <sup>160</sup> Kar S.; Durand J.O.; Granier M.; Joly P.; Melnyk O.; *Tet. Lett.*, **2003**, 44, 5617.
- <sup>161</sup> Huang P. M.; Wang, M. K. In; Auerswald K.; Stanjek H.; Bigham J. M.; *Advances in Geoecology* **1997**; 30, 241.
- <sup>162</sup> Daou T.J.; Grenèche J. M.; Pourroy G.; Buathong S.; Derory A.; Ulhaq-Bouillet C. ; Donnio B.; Guillon D.; Begin-Colin S., *Chem. Mater.* **2008**, 20, 5869.
- <sup>163</sup> Tartaj P.; Morales M.P.; Veintemillas-Verdaguer S.; Gonzalez-Carreño T; Serna, C.J.; *J. Phys. D-App. Phy.* **2003**, 36(13), 182.
- <sup>164</sup> Tartaj P.; Serna C.J.; *J. Amer. Chem. Soci.* **2003**, 125(51), 15754.

- 
- <sup>165</sup> Louis C.; Bazzi R.; Marquette C.A.; Bridot J.L., Roux S.; Ledoux G.; Mercier B., Blum L.; Perriat P.; Tillement O. *Chem. Mater.* **2005**, 17 (7), 1673.
- <sup>166</sup> Bridot J.L.; Faure A.C.; Laurent S.; Rivière C.; Billotey C.; Hiba B.; Janier M.; Josserand V.; Coll J.L.; Vander Elst L., Muller R., Roux S., Perriat P., Tillement O.; *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 129 (16), 5076.
- <sup>167</sup> Palma R.; Peeters S., Van Bael M.J.; Van den Rul H.; Bonroy K.; Laureyn W.; Mullens J.; Borghs G.; Maes G.; *Chem. Mater.* **2007**, 19, 1821.
- <sup>168</sup> Liu Z., Ding J.; Xue J., *New J. Chem.* **2009**, 33, 88.
- <sup>169</sup> Laurent S.; Forge D., Port M., Roch A., Robic C., Vander Elst L., Muller R.N. *Chem. Rev.* **2008**, 108(6), 2064.
- <sup>170</sup> Laurent S.; Nicotra C.; Gossuin Y.; Roch A.; Ouakssim A.; Vander Elst L.; Cornant M.; Soleil P.; Muller R. N. *Phys. Status Solidi* **2004**, 12, 3644.
- <sup>171</sup> Lee K. M.; Kim S.-G.; Kim W.-S.; Kim S. S.; *Korean J. Chem. Eng.* **2002**, 19, 480.
- <sup>172</sup> Berry C. C.; Wells S.; Charles S.; Curtis A. S. G.; *Biomaterials* **2003**, 23, 4551.
- <sup>173</sup> Duguet E.; Vasseur S.; Mornet S.; Goglio G.; Demourgues A.; Portier J.; Grasset F.; Veverka P.; Pollert E.; *Bulletin of Materials Science* **2006**, 29 (6), 581.
- <sup>174</sup> Jia Z.; Yujun W.; Yangcheng L.; Jingyu M.; Guangsheng L.; *React. Funct. Polym.* **2006**, 66, 1552.
- <sup>175</sup> Kim E. H.; Ahn Y.; Lee H. S.; *J. Alloys Compd.* **2006**, doi: 10.1016/j.allcom.2006.08.311.
- <sup>176</sup> Scho'pf, B.; Neuberger T.; Schulze K.; Petri A.; Chastellain M.; Hofmann M.; Hofmann H.; von Rechenberg B.; *J. Magn. Magn. Mater.* **2005**, 293, 411.
- <sup>177</sup> Xue B.; Sun Y.; *J. Chromatogr. A* **2001**, 921, 109.
- <sup>178</sup> Pardoe H.; Chua-anusorn W.; St. Pierre T.G.; Dobson J.; *J. Magn. Magn. Mater.* **2001**, 225, 41.
- <sup>179</sup> Zhang Y.; Kohler N.; Zhang M.; *Biomaterials* **2002**, 23, 1553.
- <sup>180</sup> Tamaura Y.; Takahasi K.; Koderia Y.; Saito Y.; Inada Y.; *Biotechnol. Lett.* **1986**, 8, 877.
- <sup>181</sup> Faure A.F.; Dufort S.; Josserand V.; Perriat P.; Coll J.L.; Roux S.; Tillement O.; *Small* **2009**, 5 (22), 2565.
- <sup>182</sup> Daou T.J.; Li L., Reiss P., Josserand V.; Texier I.; *Langmuir* **2009**, 25, 3040.

- 
- <sup>183</sup> T. J. Daou; G. Pourroy; J. M. Greneche; A. Bertin; D. Felder-Flesch; S. Begin-Colin; *Dalton Trans.*, **2009**, 1.
- <sup>184</sup> Bulte J.W.M.; Douglas T.; Witwer B.; Zhang S-C.; Strable E.; Lewis BK.; Zywicke H.; Miller B., Gelderen P.V., Moskowitz B.M., Duncan I.D., Frank J.A.; *Nat Biotechnol* **2001**;19(12), 1141.
- <sup>185</sup> Knecht M.R.; Crooks R.M.; *New J. Chem.* **2007**, 31, 1349.
- <sup>186</sup> Schellenberger, E. A.; Bogdanov, A. J.; Hogemann, D.; Tait, J.; Weissleder, R.; Josephson, L. *Mol. Imaging* **2002**, 1, 102.
- <sup>187</sup> Papisov M. I.; Bogdanov A.; Schaffer B.; Nossiff N.; Shen T.; Weissleder R.; Brady T. J. *J. Magn. Mater.* **1993**, 122, 383.
- <sup>188</sup> Hogemann-Savellano D.; Bos E.; Blondet C.; Sato F.; Abe T.; Josephson L.; Weissleder R.; Gaudet J.; Sgroi D.; Peters P. J.; Basilion J. P.; *Neoplasia* **2003**, 5 (6), 495.
- <sup>189</sup> Kim E. H.; Lee H. S.; Kwak B. K.; Kim B.-K.; *J. Magn. Mater.* **2005**, 289, 328.
- <sup>190</sup> Chastellain M.; Petri A.; Hofmann H.; *J. Colloid Interface Sci.* **2004**, 278, 353.
- <sup>191</sup> Osada Y.; Gong J.; *Polymer Gels Adv. Mater.* **1998**, 10, 827.
- <sup>192</sup> Mornet S.; Vasseur S.; Grasset F.; Duguet E.; *J. Mater Chem.* **2004**,14, 2161.
- <sup>193</sup> Mornet S.; Portier J.; Duguet E.; *J. Magn. Mater.* **2005**, 293,127.
- <sup>194</sup> Duguet E.; Mornet S.; Portier J.; French Patent FR2855315, 2004; *Chem. Abstr.* 2005, 141, 405023.
- <sup>195</sup> Maurizi L.; Bisht H.; Bouyer F.; Millot N.; *Langmuir* **2009**, 25, 8857.
- <sup>196</sup> Basly B.; Felder-Flesch D.; Perriat P., Billotey C.; Taleb J.; Pourroy G; Begin-Colin S.; *Chem. Commun.* **2010**, 46, 985.
- <sup>197</sup> Basly B.; Felder-Flesch D.; Perriat P.; Pourroy G; Begin-Colin S. ; Properties and suspension stability of dendronized iron oxide nanoparticles for MRI applications ; *Cont. Med. & Mol. Ima.* **2010**, papier sous presse.
- <sup>198</sup> Flory P. J.; *J. Am. Chem. Soc.*, **1941**, 63, 3083.
- <sup>199</sup> Flory P.J.; *J. Am. Chem. Soc.*, **1941**, 63, 3091.
- <sup>200</sup> Flory P.J.; *J. Am. Chem. Soc.*, **1941**, 63, 3096.
- <sup>201</sup> Buhleier E.; Wehner W.; Vögtle F., *Synthesis*, **1978**, 155.
- <sup>202</sup> Denkewalter R.G.; J. Kolc; W. J. Lukasavage; *US Patent 4289872*, **1981**.

- 
- <sup>203</sup> Tomalia D.A.; Baker H.; Dewald J.; Hall M.; Kallos G.; Martin S.; Roeck J.; Ryder J.; Smith P.; *Polym. J.* **1985**, 17, 117.
- <sup>204</sup> Newkome G.R.; Yao Z.; Baker G.R.; Gupta V.K.; *J. Org. Chem.* **1983** 50, 2003-2004.
- <sup>205</sup> Tomalia D.A.; Fréchet J.M.J.; *J. Polym. Sci. Part. A* **2002**, 40, 2719.
- <sup>206</sup> Lee C.C., MacKay J.A.; Fréchet J.M.J.; F. Szoka; *Nat. Biotech.* **2005**, 23, 1517.
- <sup>207</sup> Tomalia D.A.; Taylor A.M.; Goddard W.A.; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1990**, 29, 138.
- <sup>208</sup> Brabander-van den Berg E.M.M., Meijer E.W.; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1993**, 32, 1308.
- <sup>209</sup> Fu Y.; Raatschen H-J.; Nitecki D.E.; Wendland M.F.; Novikov V.; Fournier L.S.; Cyran C., Rogut V., Shames D.M., Brasch R.C.; *Biomacromol.* **2007**, 8, 1519.
- <sup>210</sup> Sadler K.; Tam J.P.; *Rev. Mol. Biotechnol.* **2002**, 90, 195.
- <sup>211</sup> Mourey T.H.; Turner S.R.; Rubinstein M.; Fréchet J.M.J.; Hawker C.J.; Wooley K.L.; *Macromolecules* **1992**, 25, 2401.
- <sup>212</sup> Hawker C.J.; Wooley K. L.; Fréchet J.M.J.; *J. Chem. Soc. Perk. Trans. I* **1993**, 1287.
- <sup>213</sup> Ihre H.; Hult A.; Söderlind E.; *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 6388.
- <sup>214</sup> Grinstaff M.W., *Chemistry* **2002**, 8, 2838.
- <sup>215</sup> Turnbull W.B., Stoddart J.F.; *Rev. Mol. Biotechnol.* **2002**, 90, 231.
- <sup>216</sup> Nilsen T.W.; Grayzel J.; Prensky W.; *J. Theor. Biol.*, **1997**, 187, 273.
- <sup>217</sup> Li Y.; Tseng Y.D.; Kwon S.Y.; Espaux L.; Bunch J.S.; McEuen P.L.; Luo D.; *Nat. Mater*, **2004**, 3, 38.
- <sup>218</sup> Caminade A.M., Turrinab C.O.; Majoral J.P.; *New J. Chem.* **2010**, 34, 1512.
- <sup>219</sup> Rolland O.; Griffe L., Poupot M.; Maraval A.; Ouali A.; Coppel Y.; Fournié J.J; Bacquet G.; Turrin C.O., Caminade A.M.; Majoral J.P.; Rémy P.; *Chem. – A Eur. J.* **2008**, 14(16), 4836.
- <sup>220</sup> Reisch A.; Hemmerlé J.; Chassepot A.; Lefort M.; Benkirane-Jessel N.; Candolfi E.; Mésini P.; Letscher-Bru V.; Voegel J.C.; Schaaf P.; *Soft Matter* **2010**, 6, 1503.
- <sup>221</sup> Hofmann A.; Thierbach S, Semisch A.; Hartwig A.; Taupitz M.; Ruhla E.; Graf C., *J. Mater. Chem.* **2010**, 20, 7842.

- 
- <sup>222</sup> Strable E.; M. Bulte J.W.; Moskowitz B.; Vivekanandan K.; Allen M.; Douglas T.; *Chem. Mater.* **2001**, *13*, 2201-2209.
- <sup>223</sup> Damadian R.V.; *Science* **1971**, *19* (171), 1151.
- <sup>224</sup> Lauterbur P.; *Nature* **1973**, *242*, 190.
- <sup>225</sup> Garroway A.N.; Grannell P.K.; Mansfield P.; *US Patent 4,021,726* **1977**.
- <sup>226</sup> Damadian R.V.; *Physiol. Chem. Phys.* **1977**, *9*, 97.
- <sup>227</sup>: Filler A.; *Nature Precedings* : doi:10.1038/npre.2009.3267.3 **2009**.
- <sup>228</sup> Lauffer R .B; *Chem. Rev.* **1987**, *87*, 901.
- <sup>229</sup> Meyers P.H.; Roentgenol Am. J.; *Radium Ther. Nucl. Med.* **1963**, *90*, 1068.
- <sup>230</sup> Alksne J.F.; Fingerhut A.G.; *Bull. LANEurol. Soc.* **1965**, *30*, 153.
- <sup>231</sup> Tumer R.D.; *J. Urology.* **1975**, *113*, 455.
- <sup>232</sup> Séquences réalisées avec un IRM de GENERAL ELECTRIC (1.5 teslas) en pondération T2. Clichés du Dr Laurent Tailboux et du Dr François Goubault (Poitou-Charentes).
- <sup>233</sup> Stanisz G.J.; Odrobina E.E.; Pun J.; Escaravage M.; Graham S.J.; Bronskill M.J.; Henkelman R. M.; *Mag. Res. Med.* **2005**, *54*, 507.
- <sup>234</sup> Forbes R.M.; Cooper A.R.; Mitchell H.H.; *J. Biol. Chem.* **1953**, *203*, 359.
- <sup>235</sup> Casali C.; Janier M.; Canet E.; Obadia J.F.; Benderbous S.; Corot C.; Revel D.; *Acad. Radiol.* **1998**, *5*, (Suppl. 1), 214.
- <sup>236</sup> Xu Z.P.; Kurniawan N.D; Bartlett P.F.,Lu G.Q.; *Chem. Eur. J.* **2007**, *13*, 2824.
- <sup>237</sup> Liebig T.; Stoupis C.; Ros P.R., Ballinger J.R.; Briggs R. W.; *Magn. Reson. Med.* **1993**, *30*, 646.
- <sup>238</sup> Aime S.; Nano R.; Grandi M.; *Invest. Radiol.* **1988**, *23*, (Suppl. 1), 267.
- <sup>239</sup> Aime S.; Carrera C.; Castelli D.D.;Crich S.G.; Terreno E., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 1813.
- <sup>240</sup> Ward K.M.; Aletras A.H.; Balaban R.S.; *J. Mag. Reso.* **2000**,*143*, 79.
- <sup>241</sup> Strijkers ; Gustav J.; Mulder M., Willem J.;Tilborg F., Geralda A.; Nicolay; Klaas; *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry* **2007**, *7* (3), 291.

- 
- <sup>242</sup> Lin Y.S.; Hung Y.; Su J.K.; Lee R.; Chang C.; Lin M.L.; Mou C.Y.; *J Phys Chem. B* **2004**, 10, 15608.
- <sup>243</sup> Caravan P.; Ellison J.J.; McMurry T.J.; Lauffer R.B.; *Chem. Rev.* **1999**, 99 (9), 2293.
- <sup>244</sup> Woods M.; Botta M.; Avedano S.; Wang J.; Sherry A.D.; *Dalton Trans.* **2005**, 3829.
- <sup>245</sup> Jaszberenyi Z.; Sour A.; Toth E.; Benmelouka M.; Merbach A.E.; *Dalton Trans.* **2005**, 2713.
- <sup>246</sup> Burtea C., Laurent S., Vander Elst L., Muller R.N.; *Handbook of Experimental Pharmacology* **2008**, 185/1 II, 165.
- <sup>247</sup> Mendonca Dias M. H.; Lauterbur, P. C.; *Magn. Reson. Med.* **1986**, 3, 328.
- <sup>248</sup> Rocha A., Gossuinb Y., Muller R.N., Gillis P.; *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* **2005**; 293, 532.
- <sup>249</sup> Gillis P.; Koenig, S.H.; *Magn. Reson. Med.* **1987**, 5, 323.
- <sup>250</sup> Roch A. ; *Proc. Soc. Magn. Med. 11th annual meeting, New York* **1992**, 144.
- <sup>251</sup> Roch, A., Thèse de doctortat, Université de Mons-Hainaut, Mons (**1994**).
- <sup>252</sup> Koenig S.H.; Kellar K.E.; **1995**, *Magne. Reson. Med.*, 34, 227.
- <sup>253</sup> Bulte J.W.M.; Brooks R.A.; *Sci. Clin. Appl. Magn. Car.* **2004**, 40, 527.
- <sup>254</sup> Maenosonoa S.; Suzukia T; Saitab S.; *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* **2008**, 320, 79.
- <sup>255</sup> Seo W. S.; Lee J.H.; Sun X.; Suzuki Y.; Mann D.; Liu Z.; Terashima M.; Ang P.C.Y; McConnell M.V.; Nishimura D.G.; Dai H.; *Nat. Mater.* **2006**, 5, 971.
- <sup>256</sup> Willard M.A.; Kurihara L.K.; Carpenter E.E.; Calvin S.; Harris, V.G.; *International materials reviews* **2004**, 49, 125.
- <sup>257</sup> Lee J.H.; Huh Y.M.; Jun Y.w.; Seo J.w.; Jang J.t; Song H.T.; Kim S.; Cho E.J.; Yoon H.G., Suh J.S.; Cheon J.; *Nat. Med.* **2007**, 13, 95.
- <sup>258</sup> R.A. McCurrie, *Ferromagnetic Materials: Structure and Properties*, Academic Press, San Diego, **1994**.
- <sup>259</sup> Jun Y.w., Lee J.H., Cheon J., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, 47, 5122.
- <sup>260</sup> Wagner S.; Schnorr J.; Pilgrim H.; Hamm B.; Taupitz M.; *InVest. Radiol.* **2002**, 37, 167.

- 
- <sup>261</sup> Taupitz M.; Wagner S.; Schnorr J.; Kravec I.; Pilgrimm H.; Bergmann-Fritsch H.; Hamm, B. *Invest. Radiol.* **2004**, 39, 394.
- <sup>262</sup> Bonnemain B.; *J. Drug Target.* **1998**, 6, 167.
- <sup>263</sup> Weissleder, R.; Lee, A.S.; Khaw, B.A.; Shen, T.; Brady, T.J. *Radiology* **1992**, 182, 381
- <sup>264</sup> Shen T.; Weissleder; R.; Papisov M.; Bogdanov A.; Brady T.J.; *Magn. Reson. Med.* **1993**, 29, 599
- <sup>265</sup> Montet X.; Montet-Abou K.; Reynolds F.; Weissleder R.; Josephson L.; *Neoplasia* **2006**, 8 (3), 214.
- <sup>266</sup> Kelly K. A.; Allport J.R.; Tsourkas A.; Shinde-Patil V.R.; Josephson L.; Weissleder R.; *Circ. Res.* **2005**, 96, 327.
- <sup>267</sup> Moore, A.; Marecos, E.; Bogdanov, A. Jr.; Weissleder, R. *Radiology.* **2000**, 214, 568.
- <sup>268</sup> Grimm J.; Karger N.; Lusse S.; Winoto-Morbach S.; Krisch B.; Muller Husbeck S.; Heller M.; *Invest. Radiol.* **2000**, 35, 553.
- <sup>269</sup> Vogtl T.J.; Hammerstingl R.; Schwartz W.; *Radiology.* **1996**, 3, 881.
- <sup>270</sup> Shapiro E.M.; Skrtic S.; Alan P.; *Magn Reson Med*, **2005**, 53(2), 329.
- <sup>271</sup> Hinds K.A.; Hill J.M.; Shapiro E.M.; Laukkanen M.O.; Silva A.C.; Combs C.A.; Varney T.R.; Balaban R.S., Koretsky A.P., Dunbar C.E.; *Blood* **2003**, 102 (3), 867.
- <sup>272</sup> T. Heyon et al.; *Ang. Chem. Intern. Edit.* **2007**, 46, 5397.
- <sup>273</sup> Annabelle B.; Thèse de doctorat, Université de Strasbourg, Strasbourg, **2007**.
- <sup>274</sup> Murray C.B.; Sun S.; Gaschler W.; et al.; *IBM J. Res. Dev.* **2001**, 45, 47.
- <sup>275</sup> J rodriguez carrol, *phys cond matter B* 1993,192, 55
- <sup>276</sup> Le Bail A.; Duroy H.; Fourquet J.L.; *Mater. Res. Bull.* **1988**, 23 (3), 447.
- <sup>277</sup> Yangl J. B.; Zhou1 X.D.; Yelon1 W.B.; James W. J.; Cai Q.; Gopalakrishnan K.V.; Malik S.K., Sun X. C., Nikles D. E.; *J. Appl. Phys.* **2004**, 95, 7540.
- <sup>278</sup> Teillet J.; Varret F.; *unpublished MOSFIT program.* Université du Maine.
- <sup>279</sup> Doriguetto A.C.; Fernandes N.G.; Persian A.I.C.; Filho E.N.; Grenèche J.M.; Fabris J.D.; *Phys. Chem. Min.* **2003**, 30 (5), 249.

- 
- <sup>280</sup> Santoyo Salazar J.; Perez L.; de Abril O.; Truonc Phuoc L.; Ihiwakrim D.; Vazquez M.; Greneche J.M.; Begin-Colin S.; Pourroy G.; Uniform Magnetic Iron oxide nanoparticles in 10-40 nm range: composition in terms of magnetite/maghemite ratio, and effect on the magnetic properties. *Chem. Mater.*, in press **2010**.
- <sup>281</sup> Brunauer S.; Emmett P.H.; Teller E.; *J. A. C. S.* **1938**, 60, 309.
- <sup>282</sup> Wu N.; Fu, L.; Su M.; Aslam M.; Wong K. C.; Dravid V.P.; *Nano Lett.* **2004**, 4 (2), 383.
- <sup>283</sup> Zhang L.; He R.; Gu H.C.; *Appl. Surf. Sci.* **2006**, 253 (5), 2611.
- <sup>284</sup> Pi F.; Shinzawa H.; Czarnecki M. A.; Iwahashi M.; Suzuki M.; Ozaki Y.; *J. Mol. Struct.* **2010**, 974 (1-3), 40.
- <sup>285</sup> Tao Y.T.; *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, 115 (10), 4350.
- <sup>286</sup> Lim M.S.; Feng K.; Chen X.; Wu N.; Raman A.; Nightingale J.; Gawalt E.S.; Korakakis D.; Hornak L.A.; Timperman A.T.; *Langmuir* **2007**, 23 (5), 2444.
- <sup>287</sup> Dormann J.L.; Bessais L.; Fiorani D.; *J. Phys. C: Solid State Phys.* **1988**, 21 (10), 2015.
- <sup>288</sup> Bae C.J.; Angappane S.; Park J.G.; Lee Y.; Lee J.; An K.; Hyeon T.; *Appl. Phys. Lett.* **2007**, 91 (10), 102502.
- <sup>289</sup> Frankamp B.L.; Boal A.K.; Tuominen M.T.; Rotello V.M.; *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127 (27), 9731.
- <sup>290</sup> Urtizberea A.; Natividad E.; Arizaga A.; Castro M.; Mediano A.; *J. Phys. Chem. C* **2010**, 114 (11), 4916.
- <sup>291</sup> Morales M. P.; Veintemillas-Verdaguer S.; Montero M. I.; Serna C. J.; Roig A.; Casas L.; Martinez B.; Sandiumenge F.; *Chem. Mater.* **1999**, 11 (11), 3058.
- <sup>292</sup> Berkowitz, E.; Lahut, J.A.; Jacobs, I.S.; Levinson, L.M. *Phys. Rev. Lett.* **1975**, 34, 594.
- <sup>293</sup> Brice-Profeta S.; Arrio M.A.; Tronc E.; Menguy N.; Letard I.; Cartier dit Moulin C.; Noguès, M.; Chanéac C.; Jolivet J.P.; Sainctavit Ph.; *J. Magn. Mag Mater.* **2005**, 288, 354.
- <sup>294</sup> Morales M.P.; Andres-Verges M.; Veintemillas-Verdaguer S.; Montero M.I.; Serna C.J.; *J. Magn. Magn. Mater.* **1999**, 203, 146.
- <sup>295</sup> Kodama R.H.; Berkowitz A.E.; McNiff E.J.; Foner, S. *J. Appl. Phys.* **1997**, 81, 5552.
- <sup>296</sup> Prodan D.; Chanéac C.; Tronc E.; Jolivet J.P.; Cherkaour R.; Ezzir A.; Noguès M.; Dormann, J.L. *J. Magn. Magn. Mater.* **1999**, 203, 63.
- <sup>297</sup> Wiekhorst F.; Shevchenko E.; Weller H.; Kötzler J.; *Phys. Rev. B* **2003**, 67 (22), 224416.

- 
- <sup>298</sup> Baars M.W.P.L.; Kleppinger R.; Koch M.H.J.; Yeu S.L.; Meijer E.W.; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, 39, 1285.
- <sup>299</sup> Oar M.A.; Serin J.M.; Dichtel W.R.; Frechet J.M.J.; Ohulchansky T.Y.; Prasad P.N.; *Chem. Mater.*, **2005**, 17, 2267.
- <sup>300</sup> Hayek A.; Bolze F.; Nicoud J.F.; Baldeck P.L.; Mely Y.; *Photochem. Photobiol. Sci.* **2006**, 5, 102.
- <sup>301</sup> Snow A. W.; Foos E.; *synthesis* **2003**, 4, 509.
- <sup>302</sup> N.B. Colthup; L.H. Daly; S.E. Wiberley.; *Introduction to infrared and Raman spectroscopy, Third edition.*
- <sup>303</sup> Lee J.; Isobe T.; Senna M.; *Colloids Surf. A* **1996**, 109, 121.
- <sup>304</sup> Ishikawa T.; Kataoka S.; Kandori K.; *J. Mater. Sci.* **1993**, 28, 2693.
- <sup>305</sup> Ishikawa T.; Takeda T.; Kandori K.; *J. Mater. Sci.* **1992**, 27, 4531.
- <sup>306</sup> Kandori K.; Kawashima Y.; Ishikawa T.; *J. Colloid Interface Sci.* **1992**, 152, 284.
- <sup>307</sup> Cornell R.M.; Schindler P.W.; *Colloid Polym. Sci.* **1980**, 258, 1171.
- <sup>308</sup> Daou T.J.; Begin-Colin S.; Grenèche J.M.; Thomas F., Derory A.; Bernhardt P.; Legare P.; Pourroy G.; *Chem. Mater.* **2007**, 19, 4494.
- <sup>309</sup> Persson P., Nilsson N., Berg S.S., *J. Coll. Inter. Sci.* **1996**, 177, 263.
- <sup>310</sup> Zenobi M.C.; Luengo C.V.; Avena M.J.; Rueda E.H.; *Spectrochimica Acta Part A* **2010**, 75, 1283.
- <sup>311</sup> Ganbold E.O.; Lee Y.; Lee K.; Kwon O.; Joo S.W.; *Chem. Asian J.* **2010**, 5, 852.
- <sup>312</sup> Mohapatra S.; Pramanik P.; *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects* **2009**, 339, 35.
- <sup>313</sup> Barja B.C.; Tjedor-Tjedor M.I.; Anderson M.A.; *Langmuir.* **1999**, 15, 2316.
- <sup>314</sup> Mohapatra S.; Mallick S.K.; Maiti T.K.; Ghosh S.K Pramanik P.; *Nanotechnology* **2007**, 18, 385102.
- <sup>315</sup> Zhang F. Zhou Y.; Chen Y.; Shi Z.; Tang Y.; Lu T.; *J. Colloid Inter. Sci.* **2010**, 351, 421.
- <sup>316</sup> Barja B.C.; Herszage J.; dos Santos Afonso M.; *Polyhedron* **2001**, 20, 1821.

- 
- <sup>317</sup> Isabel Tejedor-Tejedor M.; Anderson M.A.; *Langmuir* **1990**, 6 (3), 602.
- <sup>318</sup> Herlinger A.W.; Ferraro J.R.; Chiarizia R.; Horwitz E.P. *Polyhedron* **1997**, 16 (2), 1843.
- <sup>319</sup> Guerrero G.; Mutin P.H.; Vioux A.; *Chem. Mater.* **2001**, 13, 4367.
- <sup>320</sup> Gillot B.; *Vibrational Spectroscopy* **1994**, 6, 127.
- <sup>321</sup> Mohapatra S.; Pramanik N.; Ghosh S.K.; Pramanik P.; *Nanoscience and Nanotechnology* **2006**, 6, 823.
- <sup>322</sup> Raman A.; Dubey M.; Gouzman I.; Gawalt E.; *Langmuir*. **2006**, 15, 6469.
- <sup>323</sup> Guerrero G.; Mutin P.H.; Vioux A. *Chem. Mater.* **2001**, 13, 4367.
- <sup>324</sup> Gaskell K.J.; Smith, M.M.; Sherwood P.M.A.; *J. Vac. Sci. Technol. A*. **2004**, 22, 1331.
- <sup>325</sup> Salim M.A.; Khattak G.D.; Fodor P.S.; Wenger L.E.; *J. Non-Cryst. Solids*. **2001**, 289, 185.
- <sup>326</sup> Adden N.; Gamble L.J.; Castner D.G.; Hoffmann A.; Gross G.; Menzel, H.; *Langmuir*. **2006**, 22, 8197.
- <sup>327</sup> Adolphi B.; Jähne E.; Busch G.; Cai X.; *Anal. Bioanal. Chem.* **2004**, 379, 646.
- <sup>328</sup> Zorn G.; Gotman I.; Gutmanas E.Y.; Adadi R.; Salitra G.; Sukenik C.N.; *Chem. Mater.* **2005**, 17, 4218.
- <sup>329</sup> Muhler M.; Schlögl R.; Ertl G.; *J. Catal.* **1992**, 138, 413.
- <sup>330</sup> Yamashita T.; Hayes P.; *Applied Surface Science* **2008**, 254, 2441.
- <sup>331</sup> Nooney M.G.; Murrell T.S.; Corneille J.S.; Rusert E.I.; Rossner L.R.; Goodman, D.W. *J. Vac. Sci. Technol. A*. **1996**, 14, 1357.
- <sup>332</sup> Poddar P.; Morales M. B.; Frey N. A.; Morrison S. A.; Carpenter E. E.; Srikanth, H.; *J. Appl. Phys.* **2008**, 104 (6), 063901.
- <sup>333</sup> Surface functionalization of magnetic iron oxide nanoparticles for MRI applications-effect of anchoring group and ligands exchange
- <sup>334</sup> Liu Q.; Shen S.; Zhou Z.; Tian L.; *Materials Letters* **2009**, 63, 2625.
- <sup>335</sup> Roonasi P.; Holmgren A.; *Applied Surface Science* **2009**, 255, 5891.
- <sup>336</sup> Stéphane M.; Thèse de doctorat, Université de Bordeaux 1, Bordeaux, **2002**.

- 
- <sup>337</sup> Di Marcoa M.; Guilbertb I.; Portb M.; Robicb C.; Couvreura P.; Dubernet C.; *Inter. J. Pharm.* **2007**, 331(2), 197.
- <sup>338</sup> Kramer P. A.; *J. Pharm. Sci* **1974**, 63, 1646.
- <sup>339</sup> Leslie-Pelecky D. L.; Rieke R. D.; *Chem. Mater.* **1996**, 8 (8), 1770.
- <sup>340</sup> Zijlstra H.; *Ferromagnetic Materials*, **1982**, Vol. 3.
- <sup>341</sup> Brice-Profeta S.; Thèse de doctorat, Université de Paris VI, Paris. **2004**.
- <sup>342</sup> Jeong U.; Teng X. W.; Wang Y.; Yang H.; Xia Y. N.; *Adv. Mater.* **2007**, 19 (1), 33.
- <sup>343</sup> Skumryev V.; Blythe H. J.; Cullen J.; Coey J. M. D. ; *J. Magn. Magn. Mater.* **1999**, 196-197, 515.
- <sup>344</sup> Valstyn E. P.; Hanton J. P.; Morrish A. H.; *Phys. Rev.* **1962**, 128 (5), 2078.
- <sup>345</sup> Dunlop D. J.; Özdemir Ö.; *Rock Magnetism :Fundamentals and Frontiers. Cambridge University Press: Cambridge*, **1997**, 3.
- <sup>346</sup> Bedanta S.; Kleemann W.; *J. Phys. D: Appl. Phys.* **2009**, 42 (1), 013001.
- <sup>347</sup> Bødker F.; Mørup S.; Linderoth S.; *Phys. Rev. Lett.* **1994**, 72 (2), 282.
- <sup>348</sup> Néel L.; *Ann. Géophys.* **1949**, 5, 99.
- <sup>349</sup> Néel L.; *C. R. Acad. Sci.* **1949**, 228, 664.
- <sup>350</sup> Tronc E.; Ezzir A.; Cherkaoui R.; Chanéac C.; Noguès H.K.M.; Fiorani D.; Testa, A.M.; Grenèche J.M.; Jolivet J.P.; *J. Magn. Magn. Mater.* **2000**, 221, 63.
- <sup>351</sup> Morales M. P.; Serna C. J.; Bødker, F.; Mørup S.; *J. Phys.: Condens. Matter* **1997**, 9 (25), 5461.
- <sup>352</sup> Dormann J. L.; Fiorani D.; Tronc E.; *Adv. Chem. Phys.*, **1997**, 98, 283.
- <sup>353</sup> Tronc E.; Prene P.; Jolivet J. P.; Dormann J. L.; Greneche J. M.; *Hyperfine Interact.* **1998**, 112 (1-4), 97.
- <sup>354</sup> Tronc E.; Ezzir A.; Cherkaoui R.; Chanéac C.; Noguès M.; Kachkachi H.; Fiorani D.; Testa A.M.; Grenèche J.M.; Jolivet, J.P.; *J. Magn. Magn. Mater.* **2000**, 221 (1-2), 63.
- <sup>355</sup> Shendruk T.N.; Desautels R. D.; Southern B. W.; Lierop J. v.; *Nanotechnol.* **2007**, 45, 455704.
- <sup>356</sup> Majetich S.A.; Sachan,M.; *J. Phys. D: Appl. Phys.* **2006**, 21, 407.
- <sup>357</sup> Madsen D.E.; Hansen, M.F.; Mørup, S.; *J. Phys.: Condens. Matter* **2008**, 20 (34), 345209.

- 
- <sup>358</sup> Mørup S.; Tronc E.; *Phys. Rev. Lett.* **1994**, 72 (20), 3278.
- <sup>359</sup> Hansen, M. F.; Mørup S.; *J. Magn. Magn. Mater.* **1998**, 184 (3), 262.
- <sup>360</sup> Dormann J. L.; Fiorani D.; Tronc E.; *J. Magn. Magn. Mater.* **1999**, 202 (1), 251.
- <sup>361</sup> Djurberg C.; Svedlindh P.; Nordblad P.; Hansen M.F.; Bødker F.; Mørup S.; *Phys. Rev. Lett.* **1997**, 79 (25), 5154.
- <sup>362</sup> Jonsson T.; Svedlindh P.; Hansen M.F.; *Phys. Rev. Lett.* **1998**, 81 (18), 3976.
- <sup>363</sup> Luo W.; Nagel S.R.; Rosenbaum, T.F.; Rosensweig, R.E.; *Phys. Rev. Lett.* **1991**, 67 (19), 2721.
- <sup>364</sup> O'Grady K.; El-Hilo M.; Chantrell R. W.; *IEEE Trans. Magn.* **1993**, 29 (6), 2608.
- <sup>365</sup> Zhang J.; Boyd, C.; Luo W.; *Phys. Rev. Lett.* **1996**, 77 (2), 390.
- <sup>366</sup> Poddar P.; Telem-Shafir T.; Fried T.; Markovich G.; *Phys. Rev. B* **2002**, 66 (6), 060403.
- <sup>367</sup> Klokkenburg M.; Vonk C.; Claesson E.M.; Meeldijk J.D.; Erne B. H.; Philipse A.P.; *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126 (51), 16706.
- <sup>368</sup> Georgescu M.; Klokkenburg M.; Ern , B.H.; Liljeroth P.; Vanmaekelbergh D.; Zeijlmans van Emmichoven P.A.; *Phys. Rev. B* **2006**, 73 (18), 184415.
- <sup>369</sup> Bae C.J.; Angappane S.; Park J.G.; Lee Y.; Lee J.; An K.; Hyeon T.; *Appl. Phys. Lett.* **2007**, 91 (10), 102502.
- <sup>370</sup> Knobel M.; Nunes W.C.; Winnischofer H.; Rocha T.C.R.; Socolovsky L.M.; Mayorga C.L.; Zanchet D.; *J. Non-Cryst. Solids* **2007**, 353 (8-10), 743.
- <sup>371</sup> Urtizberea A.; Natividad E.; Arizaga A.; Castro M.; Mediano A.; *J. Phys. Chem. C* **2010**, 114 (11), 4916.
- <sup>372</sup> Barbeta V.B.; Jardim R.F.; Kiyohara P.K.; Effenberger, F.B.; Rossi, L.M.; *J. Appl. Phys.* **2010**, 107 (7), 073913.
- <sup>373</sup> B. Kastler, D. Vetter, Z. Patay, P. Germain; *Comprendre l'IRM, Manuel d'auto apprentissage, 6<sup> me</sup>  dition-Masson.*
- <sup>374</sup> E. L. Hahn; *Phys. Rev.* **1950**, 80, 580.
- <sup>375</sup> Bydder G.M.; Young, I.R.; et al.; *J. Comp. Ass. Tomo.* **1985**, 9(6), 1020.
- <sup>376</sup> Bydder G. M.; Young I. R.; et al.; *J. Comp. Ass. Tomo.* **1985**, 9(4), 659.

---

<sup>377</sup> LOUISIANA STATE UNIVERSITY MACROMOLECULAR STUDIES GROUP, *Polarity Index* [en ligne], disponible sur : <<http://macro.lsu.edu/howto/solvents/Polarity%20index.htm>> (consulté en juin 2008).

<sup>378</sup> NANOBIO TECHNOLOGY CENTER, *Zetasizer chapter 14* [en ligne], disponible sur : <<http://www.nbtc.cornell.edu/facilities/downloads/Zetasizer%20chapter%2014.pdf>> (consulté en avril 2008).

<sup>379</sup> PALL CORPORATION, *Diafiltration: A Fast, Efficient Method for Desalting, or Buffer Exchange of Biological Samples* [en ligne], disponible sur : <[http://www.pall.com/pdf/02.0629\\_Buffer\\_Exchange\\_STR.pdf](http://www.pall.com/pdf/02.0629_Buffer_Exchange_STR.pdf)> (consulté en mai 2008).

