



**HAL**  
open science

# Nanoparticules de magnétite fonctionnalisées pour l'imagerie bimodale IRM/TEP

Guillaume Thomas

► **To cite this version:**

Guillaume Thomas. Nanoparticules de magnétite fonctionnalisées pour l'imagerie bimodale IRM/TEP. Chimie-Physique [physics.chem-ph]. Université de Bourgogne, 2015. Français. NNT : 2015DIJOS029 . tel-01250990

**HAL Id: tel-01250990**

**<https://theses.hal.science/tel-01250990>**

Submitted on 5 Jan 2016

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

# Université de Bourgogne Franche-Comté

Laboratoire Interdisciplinaire Carnot de Bourgogne

UMR 6303 CNRS/Université de Bourgogne

Ecole doctorale Carnot-Pasteur

## THESE

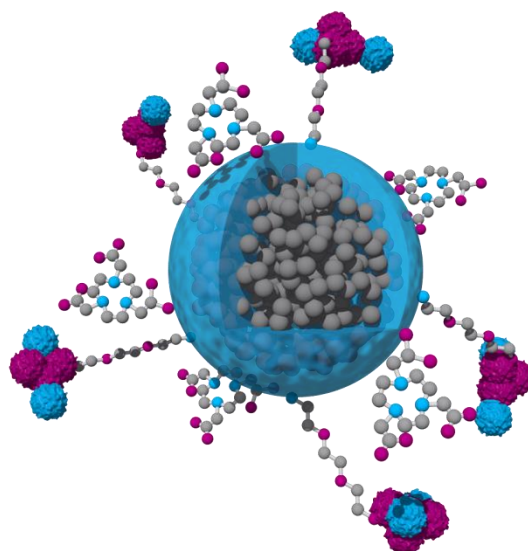
Pour obtenir le grade de

Docteur de l'Université Bourgogne Franche-Comté

Discipline Sciences, spécialité Chimie-Physique

par

**Guillaume THOMAS**



---

### Nanoparticules de magnétite fonctionnalisées pour l'imagerie bimodale IRM/TEP

---

Soutenue le 27 octobre 2015 à Dijon

L. Motte	Prof. Université Paris XIII	Rapporteur
H. Hofmann	Prof. EPFL, Suisse	Rapporteur
S. Bégin-Colin	Prof. Université de Strasbourg	Examineur
F. Denat	Prof. Université de Bourgogne	Examineur
N. Millot	Prof. Université de Bourgogne	Directrice de thèse
F. Demoisson	MCF-HDR. Université de Bourgogne	Co-encadrant









## Remerciements

*L'ensemble des travaux de thèse présenté dans ce manuscrit ont été financés par le CNRS (Centre National de la Recherche Scientifique) et la région Bourgogne. Je tiens donc à remercier tout particulièrement ces organismes, sans qui, cette thèse n'aurait jamais pu aboutir.*

*Je remercie également le Professeur Alain Dereux, actuel directeur du laboratoire ICB (Interdisciplinaire Carnot de Bourgogne) pour m'avoir accueilli au sein de cette structure.*

*Je suis aussi très reconnaissant envers les membres de mon jury de thèse pour m'avoir fait l'honneur d'assister à ma soutenance.*

*J'adresse mes remerciements à Monsieur Heinrich Hofmann, Professeur à l'École Polytechnique Fédérale de Lausanne (EPFL) pour avoir évalué mon travail de thèse en tant que rapporteur.*

*Je remercie également Madame Laurence Motte, Professeur de l'Université Paris 13 pour avoir également jugé l'ensemble de mes travaux de thèse en tant que rapporteur.*

*J'adresse aussi mes plus sincères remerciements à Monsieur le Professeur Franck Denat pour avoir présidé ma thèse en tant que président de jury mais aussi pour sa collaboration dans le projet IMAPPI (Integrated Magnetic resonance And Positron emission tomography in Preclinical Imaging - IRM et TEP couplées en imagerie pré-clinique) sans qui l'aboutissement complet de ce projet n'aurait jamais pu avoir lieu.*

*J'adresse aussi mes remerciements à Madame Sylvie Bégin-Colin, directrice de l'ECPM (École Européenne de Chimie, Polymères et Matériaux), pour être venue examiner ma thèse.*

*Je remercie aussi Monsieur Frédéric Bernard pour m'avoir accueilli au sein de l'équipe MaNaPI (Matériaux Nanostructurés : Phénomènes à l'Interface).*

*J'exprime ma profonde gratitude à ma directrice de thèse Madame Nadine Millot, Professeur, pour m'avoir ouvert les portes du doctorat et du monde de la recherche après avoir réalisé un stage de Master 2<sup>ème</sup> année sous sa direction. Malgré mon parcours diversifié, vous avez su croire en mes*

*capacités d'adaptation dans les domaines que sont la chimie des nanoparticules et leur fonctionnalisation de surface pour des applications biomédicales. Votre esprit critique, votre honnêteté, votre soutien, votre capacité à encadrer efficacement un thésard tout en me laissant une parfaite autonomie de travail sont autant de qualités que j'ai appréciées et qui m'ont permises de progresser. Vous avez su m'offrir un sujet de thèse passionnant et motivant par son côté pluridisciplinaire, novateur et porteur d'avenir. La structure dans laquelle j'ai pu évoluer m'a offert la mise à disposition d'un équipement scientifique varié et complet ce qui fut un réel avantage pour mener cette thèse dans les meilleures conditions possibles. Je vous remercie une fois de plus pour m'avoir offert cette opportunité de travail.*

*J'exprime aussi ma reconnaissance à Monsieur Frédéric Demoisson comme co-encadrant de thèse pour avoir cru également en moi au cours de ces trois années de travail. Tu as su répondre présent à chacune des difficultés rencontrées sur ce projet aussi bien sur le plan humain que sur le plan scientifique. Tu m'as aussi offert la possibilité de réaliser des travaux dirigés et pratiques dans le cadre de mon contrat doctorant contractuel.*

*Je tiens aussi à remercier Monsieur le Professeur François Brunotte pour avoir conduit l'équipex IMAPPI et pour m'avoir permis de réaliser les études *in vivo* de mes nanoparticules sur souris.*

*J'exprime mes remerciements à Monsieur Paul Walker pour les tests IRM ainsi que Monsieur Mathieu Moreau dans la réalisation des tests de radiomarquages et des manipulations *in vivo* sur animaux avec Madame Alexandra Oudot.*

*De la même manière, mes remerciements se destinent aussi à Madame Marie-Laure Léonard, Monsieur Olivier Heintz, Monsieur Rémi Chassagnon, Monsieur Nicolas Geoffroy et Monsieur Maxime Guérineau pour avoir participé aux mesures de mes échantillons.*

*Par ailleurs, je remercie Madame Isabelle Séverin pour sa participation sur l'évaluation de la cytotoxicité des nanoparticules.*

*J'adresse également mes remerciements à Monsieur Julien Boudon, Monsieur Lucien Saviot de l'équipe MaNaPI pour avoir apporté leur savoir-faire et leur connaissance scientifique dans leur domaine d'étude respectif.*

*Je remercie Madame Sophie Le Gallet pour m'avoir offert dans le cadre de mon monitorat des heures de travaux pratiques.*

*Je tiens à remercier Madame Ludivine Minier mais aussi l'ensemble des thésards Madame Clémentine Madec, Monsieur Alexis Loiseau, Monsieur Florent Crevat, Monsieur Sylvain Lorand, Monsieur Romain Piolet que j'ai côtoyé durant ces trois années de thèse et qui ont apporté une bonne convivialité, une bonne ambiance et de grandes parties de fous rires dans le bureau. Je remercie aussi Monsieur Thomas Courant pour son intervention en tant que post-doc durant ma dernière année de thèse mais aussi pour sa sympathie et ses conseils.*

*Plus particulièrement, j'adresse mes remerciements à Monsieur Romaric Collet pour son franc parlé, sa sincérité et avec qui j'ai passé de très bons moments durant cette période de thèse. Nous avons pu nous entraîner ensemble à la musculation (avec un entraînement spécial DC) et à la piscine afin de nous perfectionner dans l'objectif de devenir des dauphins.*

*Je tiens aussi à exprimer à ma compagne Madame Altijana Ganic mon amour profond. Tu étais présente dans les moments difficiles comme dans les meilleurs. Tu as su m'écouter, me comprendre et me soutenir. Encore une fois merci pour ton amour sincère. Je t'aime.*

*J'exprime profondément et tout particulièrement ma gratitude, ma reconnaissance et mon amour à ma mère et à Claude pour m'avoir épaulé et soutenu au cours de ces trois années de thèse et d'avoir cru en moi durant ces longues années d'études. Sans vous je ne serai pas là à écrire ces lignes... Je vous en suis reconnaissant. Enfin je remercie le reste de ma famille.*



## Table des matières

<b>Liste des Figures</b> .....	<b>XII</b>
<b>Liste des Tableaux</b> .....	<b>XX</b>
<b>Liste des Abréviations</b> .....	<b>XXII</b>
<b>Introduction</b> .....	<b>1</b>
<b>Chapitre 1 Etat de l'art sur l'oxyde de fer magnétite Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> : propriétés, voies de synthèse et applications en imagerie médicale</b> .....	<b>7</b>
<b>1.1 Structures et compositions chimiques des principaux oxydes de fer</b> .....	<b>9</b>
1.1.1 Hématite, wüstite et ferrihydrite 2 lignes .....	9
1.1.1.1 Hématite .....	9
1.1.1.2 Ferrihydrite et wüstite .....	10
1.1.2 Magnétite et maghémite .....	11
1.1.3 Chimie de surface des oxydes de fer .....	12
<b>1.2 Les différentes voies de synthèse d'oxydes de fer</b> .....	<b>13</b>
1.2.1 Les différentes synthèses chimiques existantes .....	13
1.2.2 Le cas de la synthèse hydrothermale .....	15
1.2.2.1 Synthèse hydrothermale en réacteur batch .....	16
1.2.2.1.1 Effet de la température et du temps de réaction .....	17
1.2.2.1.2 Effet de la nature et de la concentration des précurseurs .....	18
1.2.2.1.3 Effet du pH .....	20
1.2.2.1.4 Conclusion .....	20
1.2.2.2 Synthèse hydrothermale en continu .....	20
1.2.2.2.1 Influence de la forme du réacteur .....	21
1.2.2.2.2 Effet du temps de résidence .....	22
1.2.2.2.3 Effet de la nature des précurseurs et de leur concentration .....	23
1.2.2.2.4 Influence de la température .....	23
1.2.2.2.5 Influence des agents organiques .....	24
1.2.2.2.6 Particules synthétisées et modifiées en hydrothermal continu en vue d'une application biomédicale .....	25
1.2.2.3 Conclusion .....	27
<b>1.3 Le magnétisme dans les oxydes de fer</b> .....	<b>27</b>
1.3.1 Généralités .....	27
1.3.2 Domaines de Weiss et parois de Bloch : vers le superparamagnétisme .....	28
1.3.3 Superparamagnétisme .....	29
1.3.4 Les principaux paramètres physico-chimiques influençant les propriétés magnétiques .....	31
1.3.4.1 Spin canting .....	31
1.3.4.2 Spin glass .....	32
1.3.4.3 Influence de la taille des nanoparticules .....	32
1.3.4.4 Influence des ligands .....	33
1.3.4.5 Influence de la distribution en tailles des nanoparticules .....	34

1.3.4.6	Influence de l'état d'agglomération des nanoparticules.....	34
1.3.4.7	Influence du champ magnétique appliqué sur la température de blocage .....	35
1.3.5	Avantages de la magnétite.....	35
<b>1.4</b>	<b>Les applications biologiques envisageables des nanoparticules d'oxydes de fer superparamagnétiques.....</b>	<b>35</b>
1.4.1	L'IRM et ses agents de contraste .....	35
1.4.1.1	Principe de l'IRM .....	36
1.4.1.1.1	Temps de relaxation longitudinale $T_1$ .....	37
1.4.1.1.2	Temps de relaxation transversale $T_2$ .....	37
1.4.1.1.3	Relaxivité $r_1$ et $r_2$ .....	37
1.4.1.1.4	Contrastes en IRM.....	38
1.4.1.2	Les agents de contraste en IRM .....	38
1.4.1.2.1	Les agents paramagnétiques.....	38
1.4.1.2.2	Modifications chimiques des agents $T_1$ .....	39
1.4.1.2.3	Les agents superparamagnétiques $T_2$ .....	40
1.4.1.2.4	Intérêt des agents $T_2$ .....	42
1.4.1.2.5	Modifications chimiques des agents superparamagnétiques $T_2$ .....	43
1.4.2	Nécessité de modifier la surface des SPIONs : le PEG, un polymère qui a fait ses preuves.....	44
1.4.2.1	Effet des PEG sur le potentiel $\zeta$ .....	45
1.4.2.2	Effet de la densité et de la longueur de la chaîne carbonée du PEG sur l'adsorption des protéines sur les nanoparticules .....	45
1.4.2.3	Effet des PEG sur le diamètre hydrodynamique des nanoparticules .....	46
1.4.2.4	Effet des PEG sur l'internalisation et la cytotoxicité des nanoparticules .....	47
1.4.2.5	Conclusion .....	48
1.4.3	Agents bi-modaux à base de SPIONs.....	48
1.4.3.1	Imagerie bimodale IRM/TEP, IRM/TEMP .....	48
1.4.3.2	Les agents chélatants de types acycliques et macrocycliques .....	51
1.4.3.3	Critères d'évaluation des agents chélatants.....	52
1.4.3.4	Toxicité des radiométaux .....	52
1.4.3.5	Agents adaptés pour la complexation du $^{64}\text{Cu}$ .....	52
1.4.3.5.1	Choix du cuivre $^{64}$ .....	53
1.4.3.5.2	Les agents chélateurs du $^{64}\text{Cu}$ .....	53
1.4.3.5.3	Choix du NODAGA et du MANOTA.....	55
1.4.3.6	Les SPIONs pour l'IRM/TEP.....	57
1.4.3.7	Les SPIONs pour l'IRM/TEMP .....	59
1.4.4	Agents pour le diagnostic, la thérapie et le théranostique .....	59
<b>1.5</b>	<b>Conclusion .....</b>	<b>60</b>

## **Chapitre 2 Synthèse hydrothermale en continu et en une étape de nanoparticules d'oxyde de fer de type magnétite $\text{Fe}_3\text{O}_4$ fonctionnalisées ..... 61**

<b>2.1</b>	<b>Objectifs et contexte de l'étude .....</b>	<b>63</b>
<b>2.2</b>	<b>Présentation du dispositif et du procédé de synthèse .....</b>	<b>63</b>
<b>2.3</b>	<b>Synthèse en continu et en une seule étape de nanofleurs de magnétite fonctionnalisées .....</b>	<b>66</b>
2.3.1	Résumé de l'article soumis à Nanotechnology .....	66
2.3.1.1	Objectifs.....	66
2.3.1.2	Résultats majeurs .....	66
2.3.2	Publication 1 soumise à Nanotechnology : One-step continuous synthesis of functionalized magnetite .....	68
2.3.3	Reproductibilité de la synthèse de l'échantillon $\text{Fe}_3\text{O}_4$ et $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -LDOPA.....	99

2.3.4	Conclusion et analyse.....	99
<b>2.4</b>	<b>Effet de la température sur la synthèse des nanoparticules de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> modifiées par le DHCA, la LDOPA et l'acide citrique.....</b>	<b>100</b>
2.4.1	Nature de la phase obtenue et degré d'oxydation des nanoparticules.....	101
2.4.1.1	Nature des phases obtenues.....	101
2.4.1.2	Effet sur le degré d'oxydation des nanoparticules synthétisées.....	102
2.4.2	Influence sur la taille des nanoparticules synthétisées.....	103
2.4.3	Présence des molécules organiques à la surface des nanoparticules d'oxydes de fer.....	105
2.4.4	Conclusion.....	108
<b>2.5</b>	<b>Nanoparticules de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> fonctionnalisées : influence du lieu d'ajout du ligand et du pH durant leur synthèse hydrothermale en continu.....</b>	<b>109</b>
2.5.1	Résumé de l'article publié à RSC Advances.....	109
2.5.1.1	Objectifs.....	109
2.5.1.2	Résultats majeurs.....	110
2.5.2	Publication 2 publiée à RSC Advances.....	112
2.5.3	Conclusion et analyse.....	125
<b>2.6</b>	<b>Greffage de l'acide 6-phosphonohexanoïque en milieu hydrothermal continu.....</b>	<b>125</b>
2.6.1	Contexte du greffage de cette molécule.....	125
2.6.2	Nature de la phase synthétisée.....	126
2.6.3	Confirmation du greffage de l'acide 6-phosphonohexanoïque à la surface de l'oxyde de fer.....	128
2.6.4	Estimation de la quantité de PHA à la surface des nanoparticules.....	130
2.6.5	Nature du complexe formé.....	130
2.6.6	Effet sur la dispersion des nanoparticules en suspension.....	133
2.6.7	Influence de la molécule organique sur la taille des nanoparticules.....	134
2.6.8	Conclusion.....	135
<b>2.7</b>	<b>Conclusion.....</b>	<b>136</b>
<b>Chapitre 3</b>	<b>Fonctionnalisation post-synthèse des nanoparticules d'oxyde de fer en vue d'une utilisation en imagerie bimodale IRM/TEP ou IRM/IO.....</b>	<b>137</b>
<b>3.1</b>	<b>Greffages de molécules de PEG<sub>n</sub> (2 000 Da et 10 000 Da) sur les nanoparticules Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-DHCA et Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-LDOPA synthétisées en milieu hydrothermal.....</b>	<b>139</b>
3.1.1	Contexte et objectifs.....	139
3.1.2	Synthèse des nanoparticules Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -DHCA-PEG <sub>n</sub> et Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -LDOPA-PEG <sub>n</sub> (n = 2 000 ou 10 000).....	139
3.1.3	Mise en évidence des PEG <sub>n</sub> à la surface des nanoparticules d'oxydes de fer modifiées par le DHCA et la LDOPA.....	140
3.1.3.1	Formation de la liaison covalente entre les groupements COOH et NH <sub>2</sub> .....	140
3.1.3.2	Présence des molécules de PEG <sub>n</sub> à la surface des nanoparticules d'oxydes de fer.....	145
3.1.4	Influence du tampon d'activation.....	147
3.1.5	Influence de la longueur de la chaîne carbonée sur le greffage.....	149
3.1.6	Influence sur la taille hydrodynamique des nanoparticules modifiées par des chaînes carbonées de PEG <sub>n</sub> .....	149
3.1.7	Mesures r <sub>1</sub> et r <sub>2</sub> .....	152
3.1.8	Conclusion.....	153
<b>3.2</b>	<b>Développement des agents bimodaux IRM/TEP et/ou IRM/TEMP.....</b>	<b>154</b>
3.2.1	Premiers tests de greffage d'un macrocycle sur les nanoparticules Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -LDOPA : le DOTA.....	154
3.2.1.1	Matériels et protocole.....	154
3.2.1.2	Validation du greffage.....	156



3.2.1.3	Stabilité des nanoparticules en suspension .....	158
3.2.1.4	Premiers tests de complexations avec le cuivre $^{64}\text{Cu}$ .....	160
3.2.1.5	Mesures $r_1$ et $r_2$ en IRM .....	161
3.2.1.6	Conclusion .....	162
3.2.2	Conception d'une nanosonde bimodale pour l'imagerie IRM/TEP de type $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -LDOPA-NODAGA- $^{64}\text{Cu}$ ....	162
3.2.2.1	Matériels et protocoles .....	162
3.2.2.1.1	Matériels .....	162
3.2.2.1.2	Protocoles .....	162
3.2.2.2	Validation du greffage .....	163
3.2.2.3	Quantité de macrocycle greffée .....	168
3.2.2.4	Stabilité des nanoparticules .....	168
3.2.2.5	Radiomarquages au $^{64}\text{Cu}$ des nanoparticules $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -LDOPA-NODAGA (DMSO et PBS) et $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -LDOPA-PEG <sub>2000</sub> -NODAGA .....	170
3.2.2.6	Conclusion .....	171
3.2.3	Vers une nanosonde bimodale optimisée pour le radiomarquage du cuivre.....	172
3.2.3.1	Matériels et protocoles de synthèse .....	172
3.2.3.2	Validation du greffage .....	172
3.2.3.3	Taille hydrodynamique des nanoparticules synthétisées : vers une optimisation des conditions expérimentales .....	173
3.2.3.4	Radiomarquages au $^{64}\text{Cu}$ .....	174
3.2.3.5	Mesures $r_1$ et $r_2$ .....	175
3.2.3.6	Conclusion .....	176
<b>3.3</b>	<b>Vers l'imagerie IRM/IO.....</b>	<b>176</b>
3.3.1	Première étape : modification de surface par l'APTES.....	176
3.3.1.1	Procédure de fonctionnalisation des nanoparticules d'oxydes de fer synthétisées en voie hydrothermale par l'APTES ( $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-NH}_2$ ) .....	178
3.3.1.1.1	Protocoles : influence de la température et de la quantité d'APTES .....	178
3.3.1.1.2	Description du protocole n°1 .....	179
3.3.1.1.3	Description du protocole n°2 .....	179
3.3.1.2	Présence des molécules organiques sur les nanoparticules de magnétite et conformation de la molécule d'APTES à la surface des nanoparticules d'oxydes de fer .....	180
3.3.1.3	Influence sur la stabilité et la taille hydrodynamique des nanoparticules de type $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-NH}_2$ .....	184
3.3.1.4	Conclusion .....	186
3.3.2	Greffage de l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC) sur des nanoparticules d'oxydes de fer préalablement modifiées en surface par l'APTES comme agent de contraste bimodal IRM/IO .....	186
3.3.2.1	Contexte de l'étude .....	186
3.3.2.2	Greffage de la FITC sur les SPIONS.....	188
3.3.2.2.1	Matériaux et méthodes.....	188
3.3.2.2.2	Procédure de préparation des nanoparticules $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-NH}_2\text{-FITC}$ .....	188
3.3.2.3	Mise en évidence de la molécule FITC sur les nanoparticules .....	188
3.3.2.4	Conclusion sur la partie greffage de la FITC sur les SPIONS.....	192
<b>3.4</b>	<b>Premiers pas vers les applications biologiques.....</b>	<b>192</b>
3.4.1	Cytotoxicité et génotoxicité des nanoparticules $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-NH}_2$ .....	193
3.4.1.1	Cytotoxicité des nanoparticules $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-NH}_2$ .....	193
3.4.1.2	Génotoxicité des nanoparticules $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-NH}_2$ .....	195
3.4.1.3	Conclusion .....	198
3.4.2	Applications pour la médecine ORL .....	198
3.4.2.1	Protocoles.....	199
3.4.2.2	Résultats .....	200
3.4.2.3	Conclusion .....	201

3.5	Conclusion .....	201
	<b>Conclusion générale et perspectives .....</b>	<b>203</b>
	<b>Annexes .....</b>	<b>205</b>
	Annexe 1 : Tableau récapitulatif des techniques expérimentales .....	215
	Annexe 2 : Supporting Information - Publication 1 : One-step continuous synthesis of functionalized magnetite nanoflowers (Nanotechnology) .....	216
	Annexe 3 : Supporting Information - Publication 2 : Functionalized Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> nanoparticles: influence of ligand addition sequence and pH during their continuous hydrothermal synthesis (RSC Advances) .....	220
	Annexe 4 : Magnétisme .....	229
	Annexe 5 : DLS (Diffusion Light Scattering) ou diffusion dynamique de la lumière .....	232
	Annexe 6 : Microscopie électronique en transmission .....	237
	Annexe 7 : XPS (X-ray Photoelectron Spectrometry) spectrométrie photoélectronique X .....	239
	Annexe 8 : Spectroscopie infrarouge, ATR et Raman .....	241
	Annexe 9 : Zêtamétrie .....	245
	Annexe 10 : BET .....	249
	Annexe 11 : ATG .....	250
	Annexe 12 : DRX .....	251
	Annexe 13 : IRM .....	254
	Annexe 14 : Tests de cytotoxicité et génotoxicité .....	257
	Annexe 15 : Valorisation des travaux de thèse .....	261
	<b>Bibliographie.....</b>	<b>263</b>

# Liste des Figures

Figure 1 : Illustration des principales applications des nanoparticules d'oxydes de fer multifonctionnels.....	4
Figure 2 : Etapes successives de la production de nanoparticules de magnétite à destination de l'imagerie bimodale (IRM/TEP): 1) Synthèse hydrothermale et préfonctionnalisation, 2) Amélioration de la stabilité et de la furtivité des nanoparticules <i>in vivo</i> , 3) Greffage de macrocycles pour une utilisation en imagerie TEP et 4) Greffage de protéines pour le ciblage de pathologies .....	5
Figure 3 : Structure cristalline a) de l'hématite, b) de la ferrihydrite 2 lignes, c) de la wüstite et d) de la magnétite.....	10
Figure 4 : Evolution des compositions (magnétite et maghémite) en fonction de la déviation par rapport à la stœchiométrie en oxygène $\delta$ ( $\square$ représente les lacunes cationiques, A les sites tétraédriques, B les sites octaédriques et x une valeur intermédiaire de $\delta$ comprise entre 0 et $\frac{1}{9}$ ...	12
Figure 5 : Evolution de l'état de surface et du potentiel $\zeta$ des nanoparticules de magnétite en fonction du pH .....	12
Figure 6 : Image MET de particules d'oxydes de fer synthétisées a) $Fe_3O_4$ par coprécipitation, b) $Fe_3O_4$ par décomposition thermique, c) $\alpha-Fe_2O_3$ par sol-gel, d) $Fe_3O_4$ par microémulsion, et e) $Fe_3O_4$ par synthèse hydrothermale batch.....	13
Figure 7 : Diagramme de LaMer représentant la concentration du soluté en fonction du temps et les mécanismes de nucléation et de croissance des particules (inspirée de LaMer <i>et al.</i> ) .....	15
Figure 8 : Diagramme d'état de l'eau en fonction de la température et de la pression et illustration des différents domaines de synthèse .....	17
Figure 9 : Images MET de nanoparticules de $Fe_3O_4$ synthétisées à (a) 10 min, (b) 30 min, (c) 60 min, (d) 90 min, (e) 120 min et (f) image haute résolution MET pour un temps de réaction de 30 min à 250 °C et 30 MPa .....	18
Figure 10 : Diffractogrammes d'échantillons préparés selon différents ratios molaires ( $\alpha$ ) en $Fe^{2+}/Fe^{3+}$ a) avant chauffage, b) après chauffage (120°C) de 4h et c) 20h. Le symbole $\blacksquare$ correspond à la goethite $FeOOH$ .....	18
Figure 11 : Image MET de nanoparticules de $Fe_3O_4$ modifiées par des molécules de diphénylalanine cyclique .....	19
Figure 12 : Image MEB de particules d'oxydes de fer à a) une concentration de 2M et b) 5M en NaOH .....	20
Figure 13 : Exemples de différentes géométries de réacteurs.....	21
Figure 14 : Réacteur hydrothermal développé par l'équipe MaNaPI.....	22
Figure 15 : Images MEB d'hématite synthétisées en milieu hydrothermal (30 MPa) à a) 200°C, b) 250°C, c) 350°C et d) 420°C.....	24
Figure 16 : Nanoparticule de $Fe_3O_4$ modifiée en surface par du DHCA.....	26
Figure 17 : Représentation schématique du processus de synthèse de nanoparticules d'oxydes de fer modifiées en surface par des molécules organiques utilisées en chimie clic .....	27
Figure 18 : Présentation des différents types de matériaux magnétiques avec $\chi$ la susceptibilité magnétique (inspirée de Neamțu) .....	28

Figure 19 : Représentation schématique des parois de Bloch, des domaines de Weiss, du champ coercitif $H_c$ , des aimantations rémanentes $M_r$ (emu/g) (quand H est nul) et à saturation $M_s$ (emu/g) (quand H est maximal) en fonction du champ magnétique appliqué H et leurs évolutions suivant la taille du matériau (inspirée de Schladt <i>et al.</i> ).....	29
Figure 20 : a) Particule d'axe de facile aimantation z et de macrospin $\mu$ ( $\theta$ = angle entre z et $\mu$ ) et b) variation de l'énergie d'anisotropie magnétique de la particule en fonction de l'angle que fait le moment magnétique avec l'axe d'aimantation en l'absence de champ magnétique extérieur H (inspirée de Ciuculescu).....	30
Figure 21 : Evolution de l'état magnétique des nanoparticules en fonction de la température ( $T_B$ : température de blocage, $T_C$ : température de Curie) et $\tau$ (temps de relaxation) (inspirée de Lacroix).....	31
Figure 22 : a) Effet de spin canting de deux spins $S_A$ et $S_B$ séparés par une distance $r_{AB}$ , b) Effet des couches organiques sur les spins et c) Effet de spin-glass.....	32
Figure 23 : Evolution du spin canting en fonction de la taille des nanoparticules et de leur degré d'oxydation.....	33
Figure 24 : Variation du moment magnétique $\mu$ des nanoparticules lors d'un échange de ligand ( $\mu_1 < \mu_2$ ) (inspirée de Basti <i>et al.</i> ).....	33
Figure 25 : Courbes d'aimantation ZFC/FC à 50 Oe de nanoparticules d'oxydes de fer modifiées par des polyamidoamines présentant une distribution en taille a) large et b) étroite.....	34
Figure 26 : Illustration des champs magnétiques en IRM (inspirée de Figuerola <i>et al.</i> ).....	36
Figure 27 : Agents de contraste à base de gadolinium tels que le DOTAREM <sup>®</sup> et le MAGNEVIST <sup>®</sup> .....	39
Figure 28 : Processus de reconnaissance de nanoparticules non modifiées en surface (A) et modifiées en surface par des chaînes de polymères (B). (A) : nanoparticules (A1) recouvertes de protéines opsonines (A2) et associées avec des macrophages (A3) pour faciliter leur circulation et leur internalisation par les macrophages pour aller dans le foie (A4). (B) : Nanoparticules recouvertes par du PEG (B1) empêchant l'opsonisation (B2), réduisant l'accumulation dans le foie (B3) et augmentant ainsi la disponibilité des nanoparticules pour l'imagerie ou la thérapie.....	45
Figure 29 : Extravation des nanoparticules par les tissus spécifiques. A) diffusion des nanoparticules de taille comprise entre 100 et 200 nm est possible par la présence de fenêtré dans les cellules endothéliales sinusoïdales hépatiques. Les nanoparticules de faible taille (10-20nm) sont éliminées du sang rapidement et <i>via</i> le foie alors que les grosses nanoparticules (>200 nm) sont éliminées par les cellules de Kupffer. B) Le sang passe à travers les capillaires discontinus du système veineux splénique et les entités non déformables et de taille supérieure à 200 nm sont éliminées du sang à l'aide du système de filtration de la rate. C) Au niveau des glomérules, des fenêtrés capillaires entre 10 et 100 nm existent mais les lames basales peuvent bloquer la pénétration des nanoparticules de taille supérieure à 5 nm. D) L'endothélium du poumon, les muscles et les capillaires des tissus osseux sont généralement susceptibles de laisser passer des nanoparticules de taille inférieure à 3 nm. Figure inspirée de Wang <i>et al.</i> .....	47
Figure 30 : A) Agent chélatant de type acyclique : Acide DiéthylèneTriamine Penta Acétique (DTPA) et de type cyclique B) macrocycle : DOTA.....	52
Figure 31 : Exemple de cations triphénylphosphonium modifiés par des groupements chimiques (méthoxy, xylène, butylène) sur les chélateurs bifonctionnels DO3A, DO2A et NOTA.....	54
Figure 32 : Différents macrocycles ayant subi des modifications structurales de leur backbone : A) P-NO <sub>2</sub> -Bn-PCTA, B) P-NO <sub>2</sub> -Bn-Oxo, C) TETA, D) NOTA, E) BaMaSar et F) Ma <sub>2</sub> Sar.....	55
Figure 33 : Structure chimique du NODAGA-NHS.....	55
Figure 34 : Images TEP sur des animaux des complexes <sup>64</sup> Cu-DOTA-c(RGDfK) A) 1h après l'injection, et D) 18h après l'injection, <sup>64</sup> Cu-NODAGA-c(RGDfK) B) 1h après l'injection et E) 18h après l'injection,	

<sup>64</sup> Cu-CB-TE2A-c(RGDfK) C) 1h après l'injection, et D) 18h après l'injection sur des tumeurs de souris U87MG (%IA/g = pourcentage d'activité injecté par gramme de tissu).....	56
Figure 35 : Structure chimique du MANOTA-NCS .....	57
Figure 36 : Représentation schématique d'une nanoparticule d'oxyde de fer modifiée en surface par un anticancéreux (DOX), du PEG, du NOTA et un peptide .....	58
Figure 37 : Images TEP de particules d'oxydes de fer après 1h, 4h et 21h d'injection de 3,7 MBq de <sup>64</sup> Cu-DOTA-IO, <sup>64</sup> Cu-DOTA-IO-RGD et <sup>64</sup> Cu-DOTA-IO-RGD avec 10 mg de peptide c(RGDyK) par kilogramme (300 µg d'équivalent en fer par souris) .....	58
Figure 38 : Représentation schématique d'un biphosphonate (BP) et sa conjugaison entre des particules d'oxydes de fer superparamagnétiques (SPIONS) modifiées en surface par du dextran et un traceur TEP ( <sup>64</sup> Cu-(dtcbp) <sub>2</sub> ) .....	59
Figure 39 : a) Illustration représentant la synthèse de binanoparticules (AgNPs@Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -S <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) et du processus antimicrobien et de séparation et b) Illustration du principe de l'hyperthermie (souris placée à l'intérieur d'un solénoïde générant un champ magnétique aux alentours de la tumeur).....	60
Figure 40 : Photo du dispositif hydrothermal en continu développé par l'équipe MaNaPI (version 2012).....	64
Figure 41 : Représentation schématique du dispositif hydrothermal en continu (version 2012).....	65
Figure 42 : Schéma de synthèse des nanoparticules (150°C, 25 MPa et 80 mL.min <sup>-1</sup> ), image MET de nanofleurs (Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -LDOPA) et la corrélation entre le taux de relaxation transverse R <sub>2</sub> (s <sup>-1</sup> ) en fonction de la concentration massique en fer (µg <sub>Fe</sub> /mL) donnant la relaxivité transverse r <sub>2</sub> des nanoparticules Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -LDOPA.....	67
Figure 43 : Figure résumé de la publication soumise à Nanotechnology représentant l'évolution du degré d'oxydation et de la taille moyenne des cristallites Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> , Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -CA, Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -LDOPA et Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -DHCA en synthèse hydrothermale et en continu (150°C, 25 MPa et 80 mL.min <sup>-1</sup> ) .....	67
Figure 44 : Evolution des quantités de molécules organiques à la surface des poudres Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> , Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -CA, Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -DHCA et Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -LDOPA obtenues en conditions hydrothermales et en continu (150°C, 25 MPa et 80 mL.min <sup>-1</sup> ) .....	68
Figure 45 : Réduction des ions Fe <sup>3+</sup> en ion Fe <sup>2+</sup> en milieu acide et en présence de catéchols, transformation de la LDOPA en quinone .....	100
Figure 46 : Diffractogrammes des poudres Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> , Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -CA, Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -LDOPA, Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -DHCA synthétisées à a) 90°C, b) 150°C et c) 250°C à 25 MPa, ([Molécules organiques]/[Fe <sup>2+</sup> +Fe <sup>3+</sup> ]=1 en run 1) .....	101
Figure 47 : Spectres Raman de 1) 200 à 1000 cm <sup>-1</sup> et 2) 1000 à 2000 cm <sup>-1</sup> des nanoparticules Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> , Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -CA, Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -LDOPA, Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -DHCA synthétisées à a) 90 °C, b) 150 °C et c) 250 °C à 25 MPa (ν : étirement, τ : torsion), [Molécules organiques]/[Fe <sup>2+</sup> +Fe <sup>3+</sup> ]=1 en run 1).....	102
Figure 48 : Images MET des nanoparticules a) non modifiées, b) modifiées par l'acide citrique, c) modifiées par la LDOPA et d) modifiées par le DHCA et synthétisées à 1) 90°C, 2) 150°C et 3°C) 250°C (25 MPa et 80 mL.min <sup>-1</sup> et [Molécules organiques]/[Fe <sup>2+</sup> +Fe <sup>3+</sup> ]=1 en run 1) .....	104
Figure 49 : Courbe ATG des molécules CA, DHCA et LDOPA sous N <sub>2</sub> et O <sub>2</sub> (5 °C/min de 25 °C à 800 °C) .....	106
Figure 50 : Caractérisations ATG des poudres Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> , Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -CA, Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -LDOPA, Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -DHCA synthétisées à a) 90 °C, b) 150 °C et c) 250 °C sous N <sub>2</sub> de 25 °C à 800 °C avec une rampe de 5 °C/min ([Molécules organiques]/[Fe <sup>2+</sup> +Fe <sup>3+</sup> ]=1 en run 1) .....	107
Figure 51 : Analyses zétamétriques des nanoparticules Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> , Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -CA, Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -LDOPA, Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -DHCA synthétisées à a) 90 °C, b) 150 °C et c) 250 °C ([Molécules organiques]/[Fe <sup>2+</sup> +Fe <sup>3+</sup> ]=1 en run 1).....	107
Figure 52 : Conformation de la LDOPA sur la surface des nanoparticules de TiO <sub>2</sub> en fonction du pH de fonctionnalisation a) pH = 2 et b) pH = 6 .....	109

Figure 53 : Evolution de la taille des cristallites et de l'état d'oxydation des nanoparticules $Fe_3O_4$ en fonction des runs (1,2 ou 3), des molécules organiques (DHCA ou LDOPA) et du ratio molaire (33, 50 et 100%) à 150°C, 25 MPa et 80 mL.min <sup>-1</sup> .....	111
Figure 54 : Mécanismes et évolutions des ions ferreux et ferriques en run 1, A) sans les catéchols et B) avec les catéchols (LDOPA sélectionné comme exemple) et C) en run 3.....	112
Figure 55 : Schéma d'un nitrocatéchol (nitroDOPA) .....	125
Figure 56 : Schéma de l'acide 6-phosphonohexanoïque .....	126
Figure 57 : a) Diffractogrammes des poudres $Fe_3O_4$ et $Fe_3O_4$ -PHA, b) cliché SAD de l'échantillon $Fe_3O_4$ -PHA et c) image MET de $Fe_3O_4$ -PHA.....	127
Figure 58 : a) et b) Images MET des poudres modifiées par le PHA et c) cliché METHR .....	127
Figure 59 : Analyse thermogravimétrique des poudres non modifiées et modifiées en surface par le PHA sous $N_2$ (25 mL/min avec une rampe de 5°C/min).....	128
Figure 60 : Courbe de zétamétrie des nanoparticules non modifiées en surface $Fe_3O_4$ et modifiées par le PHA.....	129
Figure 61 : IR de la poudre $Fe_3O_4$ -PHA.....	129
Figure 62 : Suggestions de conformation spatiale du PHA à la surface de la nanoparticule : a) conformation bidentée binucléaire, b) conformation bidentée mononucléaire, c) conformation monodenté mononucléaire d) formation de cluster (complexe monodenté type « ester ») et e) PHA allongé (inspirée de Adra) .....	131
Figure 63 : a) Régions C1s et O1s de l'échantillon $Fe_3O_4$ et b) régions C1s, O1s et P2p de l'échantillon $Fe_3O_4$ -PHA .....	132
Figure 64 : Conformations les plus probables et majoritaires du PHA sur les nanoparticules d'oxydes de fer synthétisées en milieu hydrothermal et en continu .....	133
Figure 65 : Mesure DLS à pH = 7,4 (10 <sup>-2</sup> M de NaCl) après traitement ultrasons (canne à US pendant 30 sec à 100%).....	134
Figure 66 : Distribution en taille des cristallites mesurée en MET des a) nanoparticules non modifiées en surface ( $Fe_3O_4$ ) (100 NPs) et b) modifiées en surface par le PHA ( $Fe_3O_4$ -PHA) (100 NPs) .....	135
Figure 67 : Schéma de synthèse des nanoparticules a) $Fe_3O_4$ -DHCA-PEG <sub>2000</sub> et 10000 et b) $Fe_3O_4$ -LDOPA-PEG <sub>2000</sub> et 10000 .....	140
Figure 68 : 1) Spectres IR en mode ATR des poudres a) $Fe_3O_4$ -DHCA, b) $Fe_3O_4$ -DHCA-PEG <sub>2000</sub> et c) $Fe_3O_4$ -DHCA-PEG <sub>10000</sub> réalisées en tampon d'activation PBS ou MES et 2) spectres IR en mode ATR des poudres a) $Fe_3O_4$ -LDOPA, b) $Fe_3O_4$ -LDOPA-PEG <sub>2000</sub> et c) $Fe_3O_4$ -LDOPA-PEG <sub>10000</sub> réalisées en tampon d'activation PBS ou MES .....	141
Figure 69 : Niveau C1s, O1s et N1s des poudres a) $Fe_3O_4$ -DHCA, b) $Fe_3O_4$ -DHCA-PEG <sub>2000</sub> (activation en PBS) et c) $Fe_3O_4$ -DHCA-PEG <sub>10000</sub> (activation en PBS).....	143
Figure 70 : Niveau C1s, O1s et N1s des poudres a) $Fe_3O_4$ -DHCA, b) $Fe_3O_4$ -DHCA-PEG <sub>2000</sub> (activation en MES) et c) $Fe_3O_4$ -DHCA-PEG <sub>10000</sub> (activation en MES) .....	143
Figure 71 : Niveau C1s, O1s et N1s des poudres a) $Fe_3O_4$ -LDOPA, b) $Fe_3O_4$ -LDOPA-PEG <sub>2000</sub> (activation en PBS) et c) $Fe_3O_4$ -LDOPA-PEG <sub>10000</sub> (activation en PBS).....	144
Figure 72 : Niveau C1s, O1s et N1s des poudres a) $Fe_3O_4$ -LDOPA, b) $Fe_3O_4$ -LDOPA-PEG <sub>2000</sub> (activation en MES) et c) $Fe_3O_4$ -LDOPA-PEG <sub>10000</sub> (activation en MES).....	144
Figure 73 : Courbes ATG des poudres a) $Fe_3O_4$ -DHCA-PEG <sub>n</sub> et b) $Fe_3O_4$ -LDOPA-PEG <sub>n</sub> (n = 2000, 10000 Da) (sous flux de $N_2$ = 25 mL.min <sup>-1</sup> à 5°C/min) activées en tampon PBS ou MES et les quantités relatives de chaînes PEG à la surface des nanoparticules .....	147

Figure 74 : Courbes zétamétriques des échantillons a) $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -DHCA-PEG <sub>n</sub> activés en milieu PBS et b) $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -DHCA-PEG <sub>n</sub> activés en milieu MES, c) $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -LDOPA-PEG <sub>n</sub> activés en milieu PBS et d) $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -LDOPA-PEG <sub>n</sub> activés en milieu MES (n = 2 000, 10 000 Da).....	148
Figure 75 : Courbes DLS à pH physiologique et $10^{-2}$ M en NaCl des échantillons préalablement lyophilisés a) $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -DHCA-PEG <sub>n</sub> activés en PBS et b) $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -DHCA-PEG <sub>n</sub> activés en MES, c) $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -LDOPA-PEG <sub>n</sub> activés en PBS et d) $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -LDOPA-PEG <sub>n</sub> activés MES (n = 2000, 10000 Da) ...	150
Figure 76 : Images MET des nanoparticules a) $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -DHCA, b) $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -DHCA-PEG <sub>2000</sub> , c) $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -DHCA-PEG <sub>10000</sub> , d) $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -LDOPA, e) $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -LDOPA-PEG <sub>2000</sub> et f) $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -LDOPA-PEG <sub>10000</sub> . Les suspensions ont préalablement subi un cycle d'ultrason de 10 à 30 secondes. ....	151
Figure 77 : a) Courbes DLS et diamètres hydrodynamiques des nanoparticules $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -LDOPA, b) $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -LDOPA-PEG <sub>2000</sub> et c) $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -LDOPA-PEG <sub>10000</sub> dans du NaCl ( $10^{-2}$ M), PBS 1x et du MEM après ultrasons .....	151
Figure 78 : Images pondérées en T <sub>1</sub> et T <sub>2</sub> des nanoparticules et courbes R <sub>2</sub> (s <sup>-1</sup> ) en fonction de la concentration en fer (μg <sub>Fe</sub> /mL) A) $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -LDOPA et B) $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -LDOPA-PEG <sub>2000</sub> déterminées à partir d'un appareil IRM clinique (3T).....	153
Figure 79 : Evolution de la LDOPA et du DOTA-NHS en fonction du pH .....	155
Figure 80 : Protocole de greffage du DOTA sur les NPs $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -LDOPA-DOTA en milieu PBS et en milieu DMSO.....	155
Figure 81 : A) Courbes ATG et B) IR en mode ATR des échantillons $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -LDOPA, $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -LDOPA-DOTA (PBS) et $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -LDOPA-DOTA (DMSO) .....	156
Figure 82 : Spectres XPS des poudres A) $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -LDOPA, B) $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -LDOPA-DOTA (PBS) et C) $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -LDOPA-DOTA (DMSO) sur les régions C1s, N1s et F1s.....	158
Figure 83 : Courbes zétamétriques des particules $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -LDOPA, $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -LDOPA-DOTA (DMSO) et $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -LDOPA-DOTA (PBS) en présence de NaCl ( $10^{-2}$ M) .....	159
Figure 84 : Courbes DLS des particules $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -LDOPA, $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -LDOPA-DOTA (DMSO) et $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -LDOPA-DOTA (PBS) obtenues a) en milieu salin ( $10^{-2}$ M NaCl) et b) en milieu PBS 1x .....	159
Figure 85 : ITLC des suspensions de A) $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -LDOPA-DOTA (PBS) et B) $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -LDOPA-DOTA (DMSO) radiomarquées au <sup>64</sup> Cu .....	160
Figure 86 : Images pondérées en T <sub>1</sub> et T <sub>2</sub> des nanoparticules et courbes R <sub>2</sub> (s <sup>-1</sup> ) en fonction de la concentration en fer (μg <sub>Fe</sub> /mL) A) $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -LDOPA et B) $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -LDOPA-DOTA déterminées à partir d'un appareil clinique IRM (3T).....	161
Figure 87 : Protocoles de préparation des nanoparticules a) $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -LDOPA-NODAGA et b) $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -LDOPA-PEG <sub>2000</sub> -NODAGA.....	163
Figure 88 : Spectres IR en mode ATR des poudres A) $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -LDOPA, $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -LDOPA-NODAGA (PBS) et $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -LDOPA-NODAGA (DMSO) et B) $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -LDOPA, $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -LDOPA-PEG <sub>2000</sub> et $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -LDOPA-PEG <sub>2000</sub> -NODAGA (PBS).....	164
Figure 89 : ATG des courbes A) $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -LDOPA, $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -LDOPA-NODAGA (PBS) et $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -LDOPA-NODAGA (DMSO) et B) $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -LDOPA, $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -LDOPA-PEG <sub>2000</sub> et $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -LDOPA-PEG <sub>2000</sub> -NODAGA .....	164
Figure 90 : Contributions C1s, N1s, F1s, P2p des poudres A) $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -LDOPA, B) $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -LDOPA-NODAGA (PBS) C) $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -LDOPA-PEG <sub>2000</sub> , D) $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -LDOPA-PEG <sub>2000</sub> -NODAGA et E) $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -LDOPA-NODAGA (DMSO) .....	167
Figure 91 : Courbes zétamétriques des échantillons A) $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -LDOPA et $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -LDOPA-NODAGA (PBS), B) $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -LDOPA, $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -LDOPA-PEG <sub>2000</sub> et $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -LDOPA-PEG <sub>2000</sub> -NODAGA et C) $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -LDOPA et $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -LDOPA-NODAGA (DMSO) dans NaCl ( $10^{-2}$ M).....	168

Figure 92 : Courbes DLS des échantillons $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -LDOPA, $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -LDOPA-NODAGA (PBS), $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -LDOPA-PEG <sub>2000</sub> -NODAGA et $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -LDOPA-NODAGA (DMSO) A) en milieu NaCl ( $10^{-2}\text{M}$ ) et B) en milieu PBS 1M .....	169
Figure 93 : Images MET des nanoparticules (a-c) $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -LDOPA-NODAGA (PBS), (d-f) $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -LDOPA-PEG <sub>2000</sub> -NODAGA et (g-i) $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -LDOPA-NODAGA (DMSO) .....	170
Figure 94 : ITLC des solutions de a) $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -LDOPA-NODAGA (PBS), b) $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -LDOPA-PEG <sub>2000</sub> -NODAGA et c) $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -LDOPA-NODAGA (DMSO) radiomarquées au $^{64}\text{Cu}$ .....	171
Figure 95 : Spectres IR des poudres $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -LDOPA, $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -LDOPA-NODAGA et $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -LDOPA-MANOTA .....	173
Figure 96 : Courbes DLS des suspensions $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -LDOPA, $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -LDOPA-NODAGA et $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -LDOPA-MANOTA en milieu A) NaCl ( $10^{-2}\text{M}$ ) et B) PBS 1x (échantillons soumis aux ultrasons) .....	173
Figure 97 : ITLC des échantillons A) $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -LDOPA-NODAGA a) avant purification et b) après purification et B) $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -LDOPA-MANOTA a) avant purification et b) après purification.....	174
Figure 98 : Images pondérés en $T_1$ et $T_2$ des nanoparticules et courbes $R_2(s^{-1})$ en fonction de la concentration en fer ( $\mu\text{g}_{\text{Fe}}/\text{mL}$ ) A) $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -LDOPA et B) $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -LDOPA-NODAGA .....	175
Figure 99 : Schéma de la molécule APTES .....	177
Figure 100 : Mécanisme de silanisation des nanoparticules par l'APTES (inspirée de Mornet) .....	177
Figure 101 : Différentes configurations possibles de l'aminosilane sur la surface de l'oxyde de fer (inspirée de White <i>et al.</i> ).....	178
Figure 102 : Description des protocoles des synthèses des nanoparticules $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -NH <sub>2</sub> .....	179
Figure 103 : Courbe ATG des poudres $\text{Fe}_3\text{O}_4$ (non modifiée en surface) et $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -NH <sub>2</sub> (modifiée par APTES) selon le protocole 1 et 2.....	180
Figure 104 : Spectres IR (en ATR) des poudres $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -NH <sub>2</sub> (Protocole 1) et $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -NH <sub>2</sub> (Protocole 2) a) de 4000 à 750 $\text{cm}^{-1}$ et b) de 1300 à 800 $\text{cm}^{-1}$ ( $\delta$ : cisaillement; $\nu_{\text{as}}$ : étirement antisymétrique; $\nu_s$ : étirement symétrique).....	182
Figure 105 : Régions C1s, O1s, N1s et Si2s des poudres A) $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , B) $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -NH <sub>2</sub> (Protocole 1) et C) $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -NH <sub>2</sub> (Protocole 2). nd : non déterminé .....	184
Figure 106 : Courbes zétamétriques des particules $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -NH <sub>2</sub> (Protocole 1) et $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -NH <sub>2</sub> (Protocole 2) et clichés MET des particules A) $\text{Fe}_3\text{O}_4$ et B) $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -NH <sub>2</sub> (Protocole 2).....	185
Figure 107 : Diamètres hydrodynamiques déterminés par DLS des nanoparticules d'oxydes de fer non modifiées, modifiées par de l'APTES selon le protocole 1 le protocole 2 à pH physiologique après ultrasons (cane à US durant 30 sec à 100%).....	186
Figure 108 : Différentes parties anatomiques composant l'oreille .....	187
Figure 109 : Préparation des nanoparticules $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -NH <sub>2</sub> -FITC .....	188
Figure 110 : Spectres UV-visible des suspensions de la molécule a) FITC en solution et des suspensions des nanoparticules b) $\text{Fe}_3\text{O}_4$ et c) $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -NH <sub>2</sub> -FITC .....	189
Figure 111 : A) Courbes ATG des poudres $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -NH <sub>2</sub> (Protocole 2) et $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -NH <sub>2</sub> -FITC. B) Courbes zétamétriques des échantillons $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -NH <sub>2</sub> (Protocole 2) et $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -NH <sub>2</sub> -FITC.....	189
Figure 112 : Courbes IR des poudres $\text{Fe}_3\text{O}_4$ et $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -NH <sub>2</sub> et $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -NH <sub>2</sub> -FITC de 4000 à 750 $\text{cm}^{-1}$ ( $\delta$ : cisaillement; $\nu$ : étirement antisymétrique; $\nu_s$ : étirement symétrique; $\sigma$ : déformation) .....	190
Figure 113 : Régions C1s, O1s, N1s et Si2s des poudres A) $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , B) $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -NH <sub>2</sub> et C) $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -NH <sub>2</sub> -FITC .....	192
Figure 114 : Cinétique d'incorporation de l'uridine tritiée sur des cellules de type HepG2 incubées 24h en présence de différentes concentrations en oxydes de fer $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -NH <sub>2</sub> (0,1, 1, 5, 10, 15, 25, 50 et	



100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ), sur des cellules HepG2 sans agents extérieurs (T-) et sur des cellules HepG <sub>2</sub> soumis à du dichromate de potassium (T+) (25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) exprimée A) en Cpm et B) en % de viabilité.....	193
Figure 115 : Concentration inhibitrice IC <sub>50</sub> des nanoparticules d'oxydes de fer Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -NH <sub>2</sub> .....	194
Figure 116 : Tests de la réversibilité de la cytotoxicité des nanoparticules Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -NH <sub>2</sub> sur des cellules HepG2 exposées durant 24h puis exposées uniquement en MEM durant 24h.....	194
Figure 117 : Evaluation de la viabilité des cellules HepG2 incubées 24h en présence de différentes concentrations en oxydes de fer (0,1, 0,5, 1, 5, 10, 15, 25, 50, 100, T- : en l'absence d'agent extérieur et T+ : en présence de dodécylsulfate de sodium NaC <sub>12</sub> H <sub>25</sub> SO <sub>4</sub> ) : test Alamar Blue .....	195
Figure 118 : Images du test comètes des cellules HepG2 exposées aux nanoparticules d'oxydes de fer Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -NH <sub>2</sub> selon différentes concentrations : a) Zoom des cassures d'ADN (pas d'exposition aux nanoparticules : schéma type dans le cas des cassures de l'ADN), b) T- (sans agent), c) 1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , d) 15 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ et e) T+ (présence de C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub> S (25 $\mu\text{M}$ )).....	196
Figure 119 : Evaluation de la génotoxicité des nanoparticules d'oxydes de fer Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -NH <sub>2</sub> à différentes concentrations (0,1 , 0,5 , 1, 5, 10, 15, 25, 50, 75 et 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) sur des cellules HepG2 et sur des cellules témoins sans agents (T-) et en présence de C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub> S (T+).....	196
Figure 120 : (a-b) Clichés MET des cellules HepG2 après 4h d'exposition aux nanoparticules Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -NH <sub>2</sub> .....	197
Figure 121 : Evaluation du stress oxydatif des cellules HepG2 exposées aux nanoparticules Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -NH <sub>2</sub> (T- : cellules HepG2 exposées à aucun agent extérieur et T+ : cellules HepG2 exposées au 7-KC (7-cétocholestérol ou 7-KetoCholesterol en anglais) à une concentration de 150 $\mu\text{M}$ ) .....	198
Figure 122 : Zone d'incision : a) ouverture de la bulle, b) fenêtre ronde, c) fenêtre couverte par le gel de nanoparticules et d) colmatage par un fragment musculaire.....	199
Figure 123 : Positions de l'aimant autour de l'oreille du rat : a) en arrière, b) en bas, c) en avant et d) en haut.....	200
Figure 124 : Seuils auditifs de l'oreille gauche et droite (témoin) 24h avant injection des nanoparticules (Pre) et à J0, J+7 et J+30 après l'injection des nanoparticules. Ils sont mesurés selon différentes fréquences (2,8, 16 et 32 KHz) .....	200
Figure 125 : Présence des nanoparticules a) dans le tour basal de la cochlée, b) dans le tour basal et le modiolus, c) dans le deuxième tour et d) dans la strie vasculaire.....	201
Figure 126 : Protection des groupements a) NH <sub>2</sub> et b) COOH de la nitroDOPA par une molécule chimique .....	208
Figure 127 : Réaction chimique consistant en a) la protection d'une amine par un carboxybenzyle et en b) la déprotection .....	209
Figure 128 : Ajout de nitroDOPA-PEG <sub>n</sub> -MeO en run 1 avec les ions ferreux et ferriques à l'aide du dispositif en continu .....	210
Figure 129 : Greffage <i>in situ</i> en run 3 des molécules PEG <sub>n</sub> sur l'aide du dispositif en continu .....	210
Figure 130 : Greffage de macrocycle clyooctyne sur les nanoparticules Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -LDOPA-PEG-Azide ...	211
Figure 131 : Greffage du DOTA-NHS sur la nitroDOPA pour fonctionnaliser des nanoparticules de Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> .....	212
Figure 132 : Schéma de radiomarquage inverse du NODAGA-NCS suivi du greffage sur les nanoparticules Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -LDOPA.....	213
Figure 133 : Greffage de l'Annexin V sur la surface des nanoparticules Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -nitroDOPA-PEG-OPSS .....	214
Figure 134 : Représentation schématique des parois de Bloch, des domaines de Weiss, du champ coercitif H <sub>c</sub> des aimantations rémanentes M <sub>r</sub> (emu/g) (quand H est nul) et à saturation M <sub>s</sub> (emu/g)	

(quand H est maximal) en fonction du champ magnétique appliqué H et leur évolution suivant la taille du matériau .....	230
Figure 135 : Courbes d'aimantation de nanoparticules a) dans un état superparamagnétique, b) dans un état bloqué.....	231
Figure 136 : A) Schéma du principe de mesure DLS et B) a) illustration de l'intensité mesurée pour des particules de grande taille et de petite taille avec b) la fonction d'autocorrélation correspondante .....	233
Figure 137 : Mode de fonctionnement image et diffraction d'un microscope électronique en transmission .....	237
Figure 138 : Différents modes de fonctionnement : champ clair, champ sombre et METHR .....	238
Figure 139 : Principe de la réflexion totale atténuée (ATR).....	242
Figure 140 : Représentation schématique des différents potentiels présents à proximité de la surface de la particule.....	245
Figure 141 : Schéma représentant les différentes couches ou plan sur une surface d'oxyde de fer. A <sup>-</sup> représentent les anions et C <sup>+</sup> les cations en solution. IHP : plan interne de Helmholtz et OHP : plan externe de Helmholtz .....	247
Figure 142 : Courbe type de la mesure du potentiel zêta en fonction du pH (inspirée de Talero <i>et al.</i> ) .....	247
Figure 143 : Courbe S(T <sub>E</sub> ) déterminé à partir du signal ImageJ en fonction de T <sub>E</sub> en ms.....	254
Figure 144 : Evolution du taux de relaxation R <sub>2</sub> (s <sup>-1</sup> ), en fonction de la concentration C en fer (µg.mL <sup>-1</sup> ) .....	255
Figure 145 : Cartographie T <sub>2</sub> de gels contenant des USPIO à différentes concentrations T <sub>E</sub> =7,9 ms (à gauche) et T <sub>E</sub> =252,8 (à droite).....	255
Figure 146 : Courbe de M <sub>c</sub> en fonction de Tl en ms .....	256

## Liste des Tableaux

Tableau 1 : Tableau récapitulatif des différentes synthèses par voie chimique des oxydes de fer (M(acac) : M caractérisant le type de métal employé, acac caractérise l'acétylacétonate et n représente la charge liée au métal qui est égale à 2 ou 3 ; CTAB : Cetyl TrimethylAmmonium Bromide ; Atm. : atmosphérique ; n.d : non déterminée) .....	14
Tableau 2 : Contrastes IRM de différents organes en images pondérées T <sub>1</sub> et T <sub>2</sub> .....	38
Tableau 3 : Principaux agents de contraste commerciaux et leur relaxivité à 20 MHz (r <sub>1</sub> : relaxivité) 39	
Tableau 4 : Agent de contraste SPIONS (SuperParamagnetic Iron Oxide Nanoparticles) sur le marché (Lab. : laboratoire) .....	40
Tableau 5 : Liste non exhaustive des avantages, des inconvénients et des modifications de surface des oxydes de fer pour des applications bimodales des différentes techniques d'imageries couplées avec l'IRM (CT : Computed Tomography, IO : Imagerie Optique, TEP : Tomographie par Emission par Emission de Positons, TEMP : Tomographie d'Emission MonoPhotonique et US : ultrasons).....	50
Tableau 6 : Données de reproductibilité de synthèse des échantillons Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -LDOPA et Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> . $\phi_{TEM}$ (nm) est le diamètre moyen d'une cristallite obtenu par les mesures MET (au moins 50 nanoparticules), D <sub>H</sub> est le diamètre hydrodynamique à pH=7 en milieu NaCl (10 <sup>-2</sup> M), la perte de masse (%) obtenue par ATG représente les molécules adsorbées ou greffées à la surface des nanoparticules, PIE est le point isoélectrique déterminé à partir des mesures de potentiel $\zeta$ et les concentrations atomiques en % du carbone, de l'azote, de l'oxygène et du fer sont désignées par C, O, N et Fe respectivement .....	99
Tableau 7 : Diamètre DRX des cristallites $\phi_{DRX}$ (nm), diamètre MET $\phi_{TEM}$ (nm) et paramètre de maille a (Å) des nanoparticules déterminés par DRX des échantillons Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> , Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -CA, Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -LDOPA, Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -DHCA synthétisés à 90°C, 150°C et 250°C (n.d signifiant non déterminé), [Molécules organiques]/[Fe <sup>2+</sup> +Fe <sup>3+</sup> ]=1 en run 1.....	103
Tableau 8 : Surface spécifique déterminée à partir de la BET des échantillons Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> , Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -CA, Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -LDOPA et Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -DHCA à 90°C, 150°C et 250°C ([Molécules organiques]/[Fe <sup>2+</sup> +Fe <sup>3+</sup> ]=1 en run 1) .....	105
Tableau 9 : Tableau récapitulatif des diamètres des nanoparticules non modifiées et modifiées par le PHA ( $\phi_{DRX}$ : diamètre DRX des cristallites, $\delta$ : déviation par rapport à la stœchiométrie en oxygène, S <sub>BET</sub> : surface spécifique mesurée par la méthode BET, $\phi_{BET}$ : diamètre calculé à partir de la S <sub>BET</sub> , $\phi_{MET}$ : diamètre mesuré par MET sur 100 cristallites et $\phi_{DLS}$ : diamètre hydrodynamique des NPs en milieu salin (10 <sup>-2</sup> M) à pH physiologique .....	127
Tableau 10 : Concentrations atomiques en % (C, O, Fe et P) déterminées par XPS des poudres Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> non modifiées en surface et Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> modifiées par le PHA .....	130
Tableau 11 : Positions et concentrations des composantes C1s, O1s et N1s des échantillons Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -DHCA-PEG <sub>n</sub> et Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -LDOPA-PEG <sub>n</sub> synthétisés dans les tampons d'activation PBS ou MES (n = 2 000 et 10 000 Da).....	142
Tableau 12 : Concentrations atomiques en C, O, N, Fe et Na des échantillons Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -DHCA-PEG <sub>n</sub> et Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -LDOPA-PEG <sub>n</sub> (n = 2000, 10000 Da) synthétisés en tampon PBS et MES .....	146
Tableau 13 : Nombre de PEG/nm <sup>2</sup> et PEG/agglomérat de 100 nm (taille hydrodynamique observée en DLS) des échantillons Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -DHCA-PEG <sub>n</sub> et Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -LDOPA-PEG <sub>n</sub> (n = 2 000, 10 000 Da) synthétisées en tampon PBS et MES .....	148
Tableau 14 : Diamètre hydrodynamique moyen $\phi_{DLS}$ (nm) des nanoparticules Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -LDOPA et Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -LDOPA-PEG <sub>2000</sub> (MES) en milieu MEM, PBS et NaCl (pH = 7,4 et 10 <sup>-2</sup> M NaCl) et diamètres extrêmes (distribution en taille) .....	152

Tableau 15 : Nombre de DOTA/nm <sup>2</sup> déterminé à partir de la surface spécifique de Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -LDOPA (50 ± 2 m <sup>2</sup> /g), nombre de DOTA/agglomérat (agglomérat de 100 nm) et le rapport DOTA/Fer des échantillons Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -LDOPA-DOTA (PBS) et Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -LDOPA-DOTA (DMSO) .....	156
Tableau 16 : Concentrations atomiques en % déterminées par XPS des échantillons Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -LDOPA, Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -LDOPA-DOTA (PBS) et Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -LDOPA-DOTA (DMSO) .....	157
Tableau 17 : Concentrations atomiques des poudres Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -LDOPA, Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -LDOPA-NODAGA (PBS), Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -LDOPA-NODAGA (DMSO), Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -LDOPA-PEG <sub>2000</sub> et Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -LDOPA-PEG <sub>2000</sub> -NODAGA .....	165
Tableau 18 : Tableau bilan des relaxivités r <sub>2</sub> et r <sub>1</sub> ainsi que des rapports r <sub>2</sub> /r <sub>1</sub> des échantillons Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -LDOPA, Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -LDOPA-PEG <sub>2000</sub> , Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -LDOPA-DOTA et Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -LDOPA-NODAGA et du Clivist <sup>TM</sup> (n.d : non déterminé) mesurées sur un appareil clinique IRM (3T) .....	175
Tableau 19 : Concentration atomique en % des poudres Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> , Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -NH <sub>2</sub> (Protocole 1) et Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -NH <sub>2</sub> (Protocole 2) .....	183
Tableau 20 : Concentrations atomiques en % des poudres Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> et Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -NH <sub>2</sub> et Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -NH <sub>2</sub> -FITC .	191
Tableau 21 : Tableau récapitulatif des techniques expérimentales .....	215
Tableau 22 : Distance cation-anion (nm) selon la nature du cation .....	253

## Liste des Abréviations

7KC	<b>7-KetoCholesterol</b>
ADN	<b>Acide DésoxyriboNucléique</b>
APS	<b>Ammonium PerSulfate</b>
APTES	<b>(3-AminoPropyl)TriEthoxySilane</b>
ATR	<b>Attenuated Total Reflectance</b>
BET	<b>Brunauer, Emmett et Teller</b>
Boc	<b>1,1-diméthyléthoxycarbonyle</b>
CA	<b>Citric Acid (acide citrique)</b>
CB-T2A	<b>2,2'-(1,4,8,11-tetraazabicyclo[6.6.2]hexadecane-4,11-diyl)diacetic acid</b>
Cbz	<b>Carboxybenzyle</b>
CFD	<b>Computational Fluid Dynamics (dynamique computationnelle des fluides)</b>
CLIO	<b>Cross-Linked Iron Oxide</b>
CT	<b>Computed Tomography (tomographie axiale calculée aux rayons X)</b>
CTAB	<b>Cetyl TrimethylAmmonium Bromide</b>
DHCA	<b>3,4-DihydroxyHydroCinnamic Acid</b>
DLS	<b>Diffusion Light Scattering (diffusion dynamique de la lumière)</b>
DOTA	<b>1,4,7,10-tetraazacycloDOdecane-1,4,7,10-Tetraacetic Acid</b>
DPA	<b>DiPicolylAmine(DPA)</b>
DRX	<b>Diffraction des Rayons X</b>
DTPA	<b>Diethylene Triamine Pentaacetic Acid (acide diéthylène triamine penta acétique)</b>
DMSO	<b>DiMéthylSulfOxide</b>
EDC	<b>1-Ethyl-3-(3-Diméthylaminopropyl)Carbodiimide</b>
EDTA	<b>Ethylène Diamine Tétra-Acétique</b>
EPR	<b>Enhanced Permeability and Retention (effet de perméabilité et rétention accrue)</b>
<sup>18</sup> F-FDG	<b>FluDeoxyGlucose F 18</b>
FITC	<b>Fluorescein IsoThioCyanate (isothiocyanate de fluorescéine)</b>
FPG	<b>FormamidoPyrimidine DNA Glycosylase</b>
Gd	<b>Gadolinium</b>
HPF6	<b>Hexafluorophosphoric acid</b>
IO	<b>Imagerie Optique</b>
IRM	<b>Imagerie par Résonance Magnétique</b>
IPA	<b>IsoProPanol</b>
iTLC	<b>instant Thin-Layer Chromatography (chromatographie instantanée sur couche mince)</b>
LDOPA	<b>3,4-Dihydroxy-L-phenylalanine</b>
MANOTA	<b>2,2,2-(2-{{2-(4-Isothiocyanatophenyl)acetamido}methyl}-1,4,7-triazacyclononane-1,4,7-triyl)triacetic Acid</b>
MEB	<b>Microscopie Electronique à Balayage</b>
MES	<b>2-(N-Morpholino)EthaneSulfonic acid sodium</b>
MET	<b>Microscopie Electronique en Transmission</b>
METHR	<b>Microscopie Electronique en Transmission à Haute Résolution</b>
MPIO	<b>Micron-sized Paramagnetic Iron-Oxide (oxydes de fer paramagnétique de taille micrométrique)</b>
MRA	<b>Magnetic Resonance Angiography</b>
MTT	<b>bromure de 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium</b>
NODAGA	<b>2,2'-(7-(1-carboxy-4-((2,5-dioxopyrrolidin-1-yl)oxy)-4-oxobutyl)-1,4,7-triazonane-1,4-diyl)diacetic acid</b>

NOTA	1,4,7-triazacyclononane-N,N',N''-triacetic acid
NHS	<b>N-HydroxySuccinimide</b>
NIRF	<b>Near-InfraRed Fluorescence</b> (fluorescence proche infrarouge)
MNPs	<b>Magnetic NanoParticles</b> (nanoparticules magnétiques)
NPs	<b>NanoParticles</b>
OPSS	ortho-pyridyl disulfide
RMN	<b>Résonance Magnétique Nucléaire</b>
PEA	<b>Potentiels Evoqués Auditifs</b>
PEG	<b>PolyEthylène Glycol</b>
PBS	<b>Phosphate Buffered Saline</b>
PCR	<b>Polymerase Chain Reaction</b> (amplification en chaîne par polymérase)
PET	<b>Positron Emission Tomography</b>
PHDCA	<b>PolyHexaDecyl CyanoAcrylate</b>
PVA	<b>Alcool PolyVinylque</b>
QDs	<b>Quantum Dots</b> (points quantiques)
RSF	<b>Relative Sensitive Factor</b> (facteurs de sensibilité relative)
RITC	<b>Rhodamine B IsoThioCyanate</b>
SATA	<b>N-Succinimidyl S-AcetylThioAcetate</b>
SOD	<b>SuperOxyde Dismutase</b>
SPECT	<b>Single Photon Emission Computed Tomography</b>
SPIONs	<b>SuperParamagnetic Iron Oxide</b> (oxydes de fer superparamagnétiques) <b>Nanoparticles</b>
SRE	<b>Système Réticulo-Endothélial</b>
USPIO	<b>Ultrasmall SuperParamagnetic Iron Oxyde</b> (oxydes de fer superparamagnétique très petits)
TCEP	<b>Tris(2-CarboxyEthyl)Phosphine</b>
TEMED	<b>TEtraMéthylEthylèneDiamine</b>
TEMP	<b>Tomographie d'Emission MonoPhotonique</b>
TEP	<b>Tomoscintigraphie par Emission de Positons</b>
TETA	1,4,8,11- tetraazacyclotetradecane-1,4,8,11-tetraacetic acid
TFA	<b>TriFluoroacetic Acid</b>
TPP	<b>TriPhénylPhosphonium</b>
TMF	<b>Tomographie Moléculaire de Fluorescence</b> (Fluorescence Molecular Tomography)
XPS	<b>X-Ray Photoelectron Scanning</b> (spectroscopie photoélectronique par rayons X)



# **Introduction**





Devenues un domaine multidisciplinaire, les nanotechnologies s'appliquent dans de nombreux secteurs tels que la chimie, les matériaux, le biomédical, la robotique, la micro-électronique *etc.*<sup>1</sup> Les recherches dans le secteur biomédical sont en pleine expansion en raison des propriétés intéressantes des nanoparticules (magnétisme, réactivité de surface, optique)<sup>2</sup> et ce, pour des compositions chimiques variées. Des nanoparticules organiques (à base de polymères ou encore de lipides) ou inorganiques sont utilisées.<sup>3, 4</sup> Pour une application en imagerie, les principaux matériaux employés sont les oxydes de fer et de gadolinium, la silice, le silicium, l'or...<sup>5, 6</sup> Les oxydes de fer, dont la magnétite ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ), font l'objet d'une attention toute particulière en raison de leur faible coût, de leur comportement magnétique<sup>7, 8</sup> et de leur faible toxicité. Le fer est en effet déjà naturellement présent dans l'organisme humain. Le superparamagnétisme (propriété acquise lorsque la taille des nanoparticules est inférieure à une vingtaine de nanomètres) rend les oxydes de fer très prometteurs comme agents de contraste pour l'Imagerie par Résonance Magnétique (IRM).<sup>9, 10</sup> Cette technique d'imagerie médicale, conceptualisée en 1946 par Bloch et Purcell permet l'obtention de vues en deux ou trois dimensions de l'organisme. Elle est basée sur le principe de la Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) et plus précisément sur la relaxation magnétique des moments magnétiques des protons de l'eau très présents dans le corps humain. Cependant, la sensibilité de cette méthode reste encore insuffisante pour certains diagnostics.<sup>11</sup> C'est dans cet objectif que des agents de contraste tels que les oxydes de fer interviennent afin d'améliorer la sensibilité de cette technique.

Les oxydes de fer non fonctionnalisés en surface ne sont pas adaptés à une utilisation directe au sein de l'organisme. Une modification de surface est nécessaire afin notamment d'éviter les phénomènes d'agglomération et de sédimentation en conditions physiologiques.<sup>12</sup> Il est important par ailleurs d'assurer leur biocompatibilité et d'éviter des interactions non spécifiques avec les différents organes ou cellules du corps.<sup>13, 14</sup>

Les oxydes de fer sont de très bons candidats comme agents de contraste multimodaux (Figure 1). Il s'agit dans ce cas de combiner plusieurs techniques d'imageries. Ils sont employés pour de la Tomoscintigraphie par Emission de Positons (TEP, ou Positron Emission Tomography PET en anglais), de la Tomographie d'Emission MonoPhotonique (TEMP, ou Single Photon Emission Computed Tomography SPECT en anglais) ou encore pour de la fluorescence proche infrarouge (ou Near-InfraRed Fluorescence NIRF en anglais)<sup>10</sup> grâce à leur fort potentiel de fonctionnalisation. A l'aide de ligands greffés à leur surface il est en effet possible de piéger des traceurs ou radioéléments, tel que le  $^{64}\text{Cu}$ , nécessaires pour ces techniques d'imageries (TEP/TEMP). Combiner les avantages d'une technique pour pallier aux limites d'une autre fait de l'oxyde de fer nanométrique un outil puissant et prometteur pour l'imagerie médicale.

Toutes ces possibilités de couplages et de greffages, à la surface des nanoparticules d'oxyde de fer, conduisent à la formation d'outils dits théranostiques.<sup>15, 16</sup> Il est en effet possible, en plus d'établir un diagnostic médical *via* l'imagerie, d'apporter des propriétés thérapeutiques (hyperthermie, délivrance de médicaments...),<sup>16</sup>

De plus en plus de recherches sont menées pour mettre au point de tels outils.<sup>17</sup> Cette voie très encourageante a conduit l'équipe MaNaPI (Matériaux Nanostructurés : Phénomènes à l'Interface) du laboratoire Interdisciplinaire Carnot de Bourgogne à développer des bioapplications de ces nanopoudres. Ce travail s'inscrit dans le cadre des projets 3MIM (Marquage de Molécules par les Métaux pour l'Imagerie Moléculaire, convention CNRS/UB/Conseil Régional de Bourgogne), PharmImage® (www.pharmimage.fr) et de l'Equipex IMAPPI (Integrated Magnetic resonance And Positron emission tomography in Preclinical Imaging). Ces projets ont pour mission principale la mise au point de traceurs et la détermination de biomarqueurs capables de suivre l'efficacité de certains traitements (radiomarquage d'anticorps à l'aide de chélates macrocycliques par exemple). Ces projets sont le fruit d'une étroite collaboration avec notamment l'ICMUB (Institut de Chimie Moléculaire de l'Université de Bourgogne), la société CheMatec, le CHU (Centre Hospitalier Universitaire) de Dijon, le CGFL (Centre Georges François Leclerc) et la société NVH Medicinal. Ils ont conduit à initier ce travail de thèse CNRS/Région Bourgogne sur le développement d'oxydes de fer employés comme agents de contrastes pour l'IRM et la TEP/TEMP ainsi que pour le ciblage de maladies cardiovasculaires.

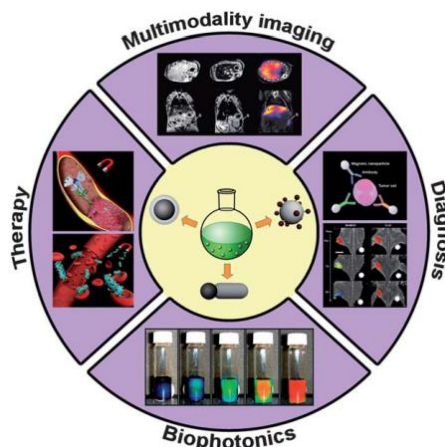


Figure 1 : Illustration des principales applications des nanoparticules d'oxydes de fer multifonctionnels<sup>16</sup>

Durant ce travail de thèse, des nanoparticules de magnétite ont été synthétisées en milieu hydrothermal continu et développées pour de l'imagerie bimodale (IRM/TEP ou IRM/optique). Avant de pouvoir réaliser des tests *in vitro* ou *in vivo*, certains critères chimiques et morphologiques (composition chimique, structure, taille et modification de surface) doivent être pris en compte pour utiliser spécifiquement ces nanoparticules pour ces imageries (Figure 2). Plusieurs étapes sont ainsi nécessaires pour arriver à la conception complète des nanohybrides recherchés :

1) Synthétiser des nanoparticules par voie hydrothermale en continu. Même si un comportement ferrimagnétique peut convenir, un comportement superparamagnétique est recherché (§ 1.3.3) (taille < 20 nm). Cette étape est importante car elle constitue la première étape de l'élaboration de l'agent bimodal (Chapitre 2). La préfonctionnalisation des nanoparticules par des catéchols (DHCA ou LDOPA), par l'acide citrique (CA) ou par l'acide 6-phosphonohexanoïque (PHA) est réalisée conjointement, durant la synthèse, ce qui a constitué un challenge technologique.

2) La deuxième étape consiste en la modification de surface des nanoparticules par des molécules de PolyEthylène Glycol (PEG) dans l'objectif de les rendre plus stables en suspension en conditions physiologiques et d'améliorer leur temps de circulation dans le sang (furtivité) (Chapitre 3).<sup>18</sup>

3) La troisième étape, toute aussi importante, concerne la fonctionnalisation des nanoparticules par des molécules organiques telles que des fluorophores ou des macrocycles pour les utiliser en imageries bimodales (IRM/optique, IRM/TEP ou IRM/TEMP (Chapitre 3).<sup>14, 19-21</sup>

4) Enfin la dernière étape consiste en la bioconjugaison de nanoparticules avec des protéines\* ou des anticorps† pour le ciblage de pathologies.

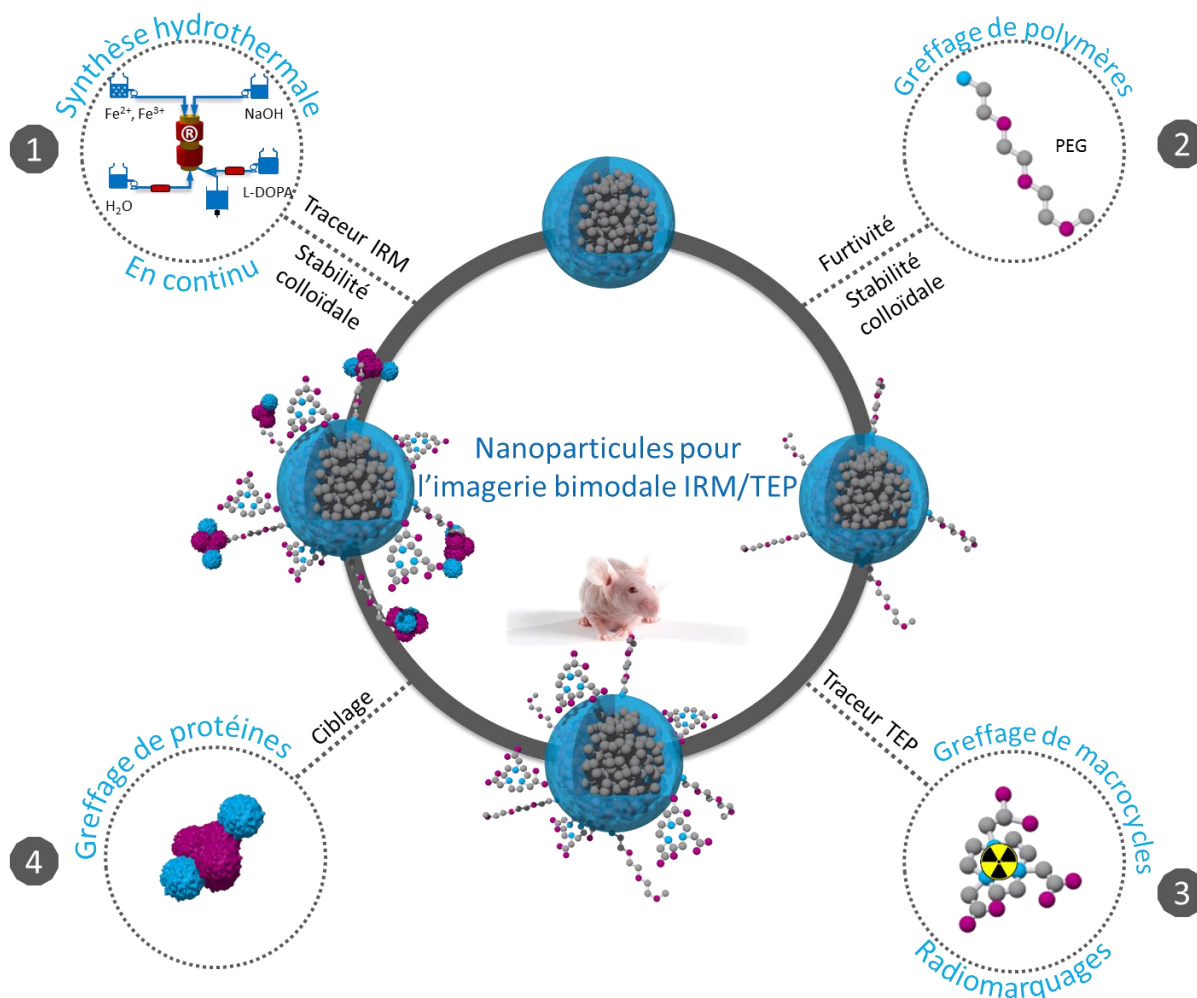


Figure 2 : Etapes successives de la production de nanoparticules de magnétite à destination de l'imagerie bimodale (IRM/TEP) : 1) Synthèse hydrothermale et préfonctionnalisation, 2) Amélioration de la stabilité et de la furtivité des nanoparticules *in vivo*, 3) Greffage de macrocycles pour une utilisation en imagerie TEP et 4) Greffage de protéines pour le ciblage de pathologies

Les travaux de recherches présentés dans ce manuscrit s'organisent en trois chapitres. Le premier chapitre s'intéresse à l'état de l'art des principaux oxydes de fer rencontrés au cours des synthèses en présentant leur structure et leur composition chimique. L'oxyde de fer magnétite  $Fe_3O_4$  est particulièrement abordé en raison de ses caractéristiques magnétiques pour l'IRM. Les différentes voies de synthèse de cet oxyde dont notamment la synthèse hydrothermale en continu sont présentées. Leur

\* Protéine : macromolécule constituée d'au moins 50 acides aminés

† Anticorps : protéine dont le rôle est de lutter contre des agents pathogènes

intérêt biologique comme agent de contraste bimodal, à la fois pour l'IRM (agent T<sub>2</sub>) et la TEP, est également exposé dans ce chapitre. Les principaux agents chélatants qu'il est alors nécessaire de greffer à leur surface sont présentés.

Dans le second chapitre, quatre études portant sur la synthèse et la préfonctionnalisation de nanoparticules de magnétite en conditions hydrothermale et en continu sont abordées. La première étude tente de montrer l'effet de trois ligands organiques (DHCA, LDOPA et CA) sur la structure et la composition chimique des oxydes de fer ainsi que sur leur potentiel de fonctionnalisation en continu et la stabilité des nanoparticules en suspension. Après avoir montré que le DHCA et la LDOPA tendent à améliorer l'ensemble de ces propriétés, une seconde étude s'oriente sur l'effet de la température de synthèse sur les oxydes de fer en comparant les deux ligands LDOPA et DHCA afin d'obtenir la température optimale. La troisième étude porte sur l'effet du lieu d'ajout de ces deux molécules organiques, au cours de la synthèse en continu, afin d'étudier leur impact sur la phase, le degré d'oxydation, la taille, la morphologie des nanoparticules et le taux de recouvrement de la surface de l'oxyde de fer. Enfin la dernière étude tente de transposer ces résultats au greffage en continu d'une autre molécule, l'acide 6-phosphonohexanoïque (PHA).

Le dernier chapitre présente le greffage de molécules d'intérêt (polymères, macrocycles et fluorophores) sur les nanoparticules retenues et préparées préalablement à partir du dispositif hydrothermal en continu. Ces études ont ainsi pour objectif de montrer que les groupements chimiques des deux ligands de départ (DHCA et LDOPA) sont réactifs et fonctionnels. Dans un premier temps, le greffage de polymères de type PEG sur les nanoparticules Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-DHCA et Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-LDOPA est abordé pour améliorer la furtivité des nanoparticules. L'effet du tampon d'activation et de la longueur de la chaîne carbonée du PEG<sub>n</sub> (n = 2 000 et 10 000) sur l'efficacité du greffage et la stabilité des nanoparticules en suspension sont présentés. En seconde partie, des nanoparticules à destination de l'imagerie bimodale IRM/TEP sont élaborées. Trois macrocycles (DOTA, NODAGA et MANOTA) ont été greffés et l'efficacité du radiomarquage comparée. En dernière partie, des premiers essais biologiques sont présentés : des tests de cytotoxicité originaux et des travaux issus d'une collaboration avec une équipe d'otorhinolaryngologistes (ORL) du CHU... en attendant les premières images bimodales IRM/TEP.

Les points forts de ces chapitres sont résumés dans une conclusion générale suivie d'une ouverture sur différentes perspectives envisageables pour améliorer les différentes étapes de ce projet.

# **Chapitre 1**

**Etat de l'art sur l'oxyde de fer magnétite  
 $\text{Fe}_3\text{O}_4$  : propriétés, voies de synthèse et  
applications en imagerie médicale**



Ce chapitre est consacré à une description générale des principales propriétés physico-chimiques des nanoparticules de magnétite  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ . Les principaux et récents travaux concernant la synthèse hydrothermale batch et en continu de ces nanoparticules seront également présentés. Les propriétés magnétiques des oxydes de fer et les principaux paramètres influençant celles-ci seront énoncés. Les applications biologiques générales et théranostiques\* des nanoparticules d'oxydes de fer magnétiques seront décrites et plus particulièrement l'imagerie multimodale IRM/TEP ou IRM/TEMP, constituant la finalité de ces travaux de thèse.

## 1.1 Structures et compositions chimiques des principaux oxydes de fer

De nombreux oxydes de fer se différenciant par leur structure cristalline font l'objet d'études approfondies notamment en biomédecine.<sup>22-24</sup> Cependant, seules la maghémite ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ), la magnétite ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ), l'hématite ( $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ), la ferrihydrite 2 lignes et la wüstite ( $\text{Fe}_{1-x}\text{O}$ ) rencontrées au cours des synthèses hydrothermales réalisées lors de cette étude (§ 1.1.1) seront présentées dans cette partie. Ces oxydes de fer sont aussi les plus communs.<sup>22</sup> Seules la magnétite et la maghémite seront recherchées notamment en raison de leur capacité à être superparamagnétiques dans certaines conditions (§ 1.3.3). Ces particules seront en effet utilisées en IRM grâce à leurs propriétés magnétiques et en TEP/TEMP grâce à la propriété nucléaire du radioélément complexé par des agents organiques greffés à leur surface (§ 1.4.3.1 et Chapitre 3).

### 1.1.1 Hématite, wüstite et ferrihydrite 2 lignes

#### 1.1.1.1 Hématite

L'hématite de formule chimique ( $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ) se démarque des autres oxydes de fer présentés ci-dessous par son aspect rougeâtre. Sa structure cristalline est de type trigonal ( $a = 5,427 \text{ \AA}$  et  $\alpha = 55,3^\circ$ ) ou hexagonale ( $a = 5,038 \text{ \AA}$  et  $c = 13,776 \text{ \AA}$ ).<sup>25</sup> Les ions oxygène forment un arrangement hexagonal avec les ions  $\text{Fe}^{3+}$  situés en site octaédrique (Figure 3-a). Cependant, cet oxyde de fer présente des propriétés magnétiques très faibles.<sup>25</sup> De ce fait, il ne peut être employé comme agent de contraste en IRM et ne doit pas apparaître comme produit lors des synthèses hydrothermales effectuées au cours de cette étude.

---

\* Théranostique : terme résultant de la contraction entre thérapie et diagnostic



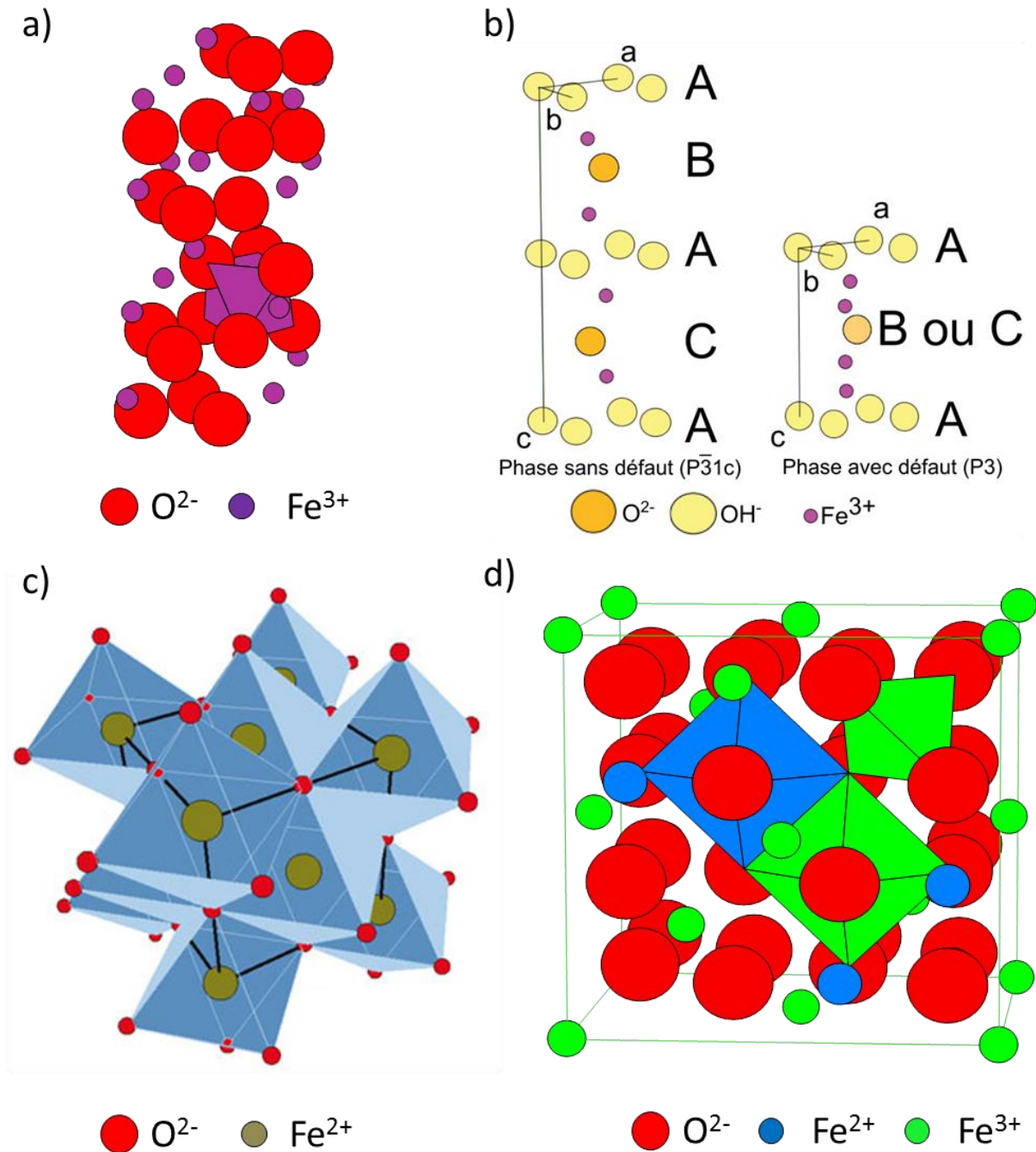


Figure 3 : Structure cristalline a) de l'hématite, b) de la ferrihydrite 2 lignes,<sup>26</sup> c) de la wüstite<sup>27</sup> et d) de la magnétite

### 1.1.1.2 Ferrihydrite et wüstite

La ferrihydrite, précurseur de la goethite et de couleur marron, est un oxyhydroxyde de Fe(III) métastable.<sup>28</sup> Sa structure fait encore débat, elle reste difficile à déterminer en raison de la faible taille des grains (2-4 nm) et des changements de structures rapides en fonction des propriétés et caractéristiques de son environnement.<sup>26, 28</sup> Elle est généralement nommée 2 lignes ou 6 lignes correspondant au nombre de pics observés en DRX.<sup>26</sup> Ce dénombrement de pics est lié à la différence de taille des domaines cohérents plutôt qu'à la structure même du matériau.<sup>29</sup> L'une des dernières structures proposées consiste en une superposition de deux phases dont l'une est une phase sans défaut de groupe d'espace  $P\bar{3}1c$

( $a = 2,955 \text{ \AA}$  et  $c = 9,37 \text{ \AA}$ ). Elle résulte de couches d'ions  $O_2^-$  et  $OH^-$  agencées le long de l'axe  $c$  selon le schéma ABACA (Figure 3-b). La deuxième phase résulte quant à elle de sous unités issues de la première phase mais possédant un groupe d'espace trigonal P3 ( $a = 2,955 \text{ \AA}$  et  $c = 9,37/2 = 4,685 \text{ \AA}$ ). Composée de couches aléatoires (ABA et ACA), cette phase présente des lacunes induisant un désordre plus important.<sup>26</sup>

La wüstite, oxyde de fer(II) de couleur verdâtre, cristallise dans le système cubique dans le groupe d'espace  $Fm\bar{3}m$  ( $a = 4,33 \text{ \AA}$ ).<sup>26</sup> C'est une phase non-stœchiométrique  $Fe_{1-x}O$  (avec  $x$  compris entre 0,83 et 0,95). Une oxydation partielle des ions  $Fe^{2+}$  en ions  $Fe^{3+}$  accompagnée par la formation de lacunes cationiques a souvent lieu (Figure 3-c).

### 1.1.2 Magnétite et maghémite

La magnétite ( $Fe_3O_4$ ) et la maghémite ( $\gamma\text{-}Fe_2O_3$ ) se caractérisent toutes les deux par une structure spinelle inverse décrite par Bragg en 1915 mais se différenciant par la présence ou non d'ions  $Fe^{2+}$  au sein de leur réseau cristallin.<sup>30</sup> Leur formule chimique générale est  $AB_2O_4$  : A et B symbolisant des cations et O représentant les anions oxygène. Cristallisant dans le groupe d'espace  $Fd\bar{3}m$  du système cubique, les cations A sont localisés en sites tétraédriques (entourés de quatre ions  $O^{2-}$ ) et les cations B sont localisés en sites octaédriques (entourés de six ions  $O^{2-}$ ). Au total, 32 atomes d'oxygène constituent la maille caractéristique de ces deux matériaux dans laquelle les cations (ions ferriques ou ferreux) occupent un huitième des sites tétraédriques et un demi des sites octaédriques comme illustré en Figure 3-d.

D'aspect noir, la magnétite peut s'écrire sous la forme suivante :  $[Fe^{3+}]_A[Fe^{2+}Fe^{3+}]_BO_4$  où les ions ferreux ( $Fe^{2+}$ ) sont en sites octaédriques et les ions ferriques ( $Fe^{3+}$ ) sont à la fois en sites octaédriques et tétraédriques. Son paramètre de maille est  $a = 8,396 \text{ \AA}$ .<sup>25</sup>

La maghémite, d'aspect marron, résulte quant à elle de l'oxydation de la magnétite. C'est un oxyde de Fe(III) uniquement. Cette forme induit la présence de lacunes cationiques notées  $\square$  dans les sites octaédriques. Sa formule est :  $[Fe^{3+}]_A[Fe_{5/3}^{3+}\square_{1/3}]_BO_4$ . Si les lacunes sont réparties de façon aléatoire, la maghémite possède le même groupe d'espace que la magnétite  $Fd\bar{3}m$ . A l'inverse, si elles sont réparties de manière organisée dans le réseau, alors la maghémite acquiert une symétrie conduisant au groupe d'espace  $P4_332$  (symétrie cubique) ou  $P4_32_12$  (symétrie tétragonale). Son paramètre de maille est  $a = 8,345 \text{ \AA}$ .<sup>25</sup>

Entre ces deux matériaux, il existe des états intermédiaires résultant d'une oxydation partielle des ions  $Fe^{2+}$  en ions  $Fe^{3+}$  (Figure 4). De même structure que la magnétite mais sous stœchiométrique en fer (II), cette phase est notée  $Fe_{3(1-\delta)}O_4$  ( $\delta$  représente la déviation par rapport à la stœchiométrie en oxygène et est comprise entre  $\delta = 0$  pour de la magnétite non oxydée (magnétite pure) et  $\delta = 1/9$  pour la maghémite de formule  $\gamma\text{-}Fe_2O_3$ ).

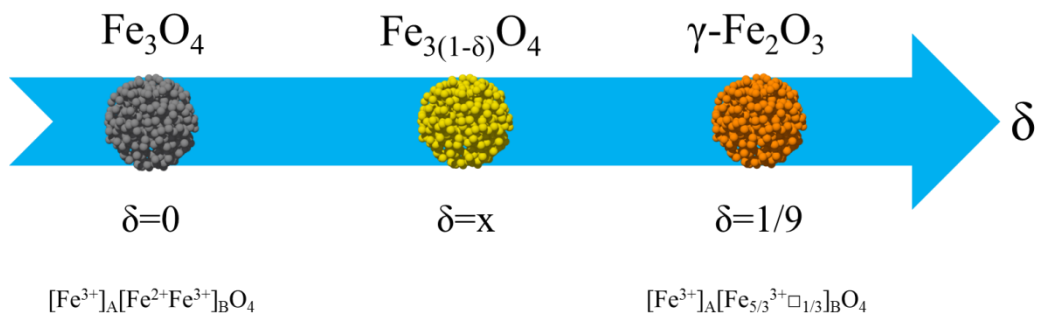


Figure 4 : Evolution des compositions (magnétite et maghémite) en fonction de la déviation par rapport à la stœchiométrie en oxygène  $\delta$  ( $\square$  représente les lacunes cationiques, A les sites tétraédriques, B les sites octaédriques et x une valeur intermédiaire de  $\delta$  comprise entre 0 et  $1/9$ )

Ces deux phases seront privilégiées et souhaitées pour envisager des applications en IRM en raison de leur comportement magnétique (superparamagnétisme : § 1.3.3).

### 1.1.3 Chimie de surface des oxydes de fer

La chimie de surface des nanoparticules de maghémite ou magnétite nues permet, à l'aide d'agents organiques, leur modification de surface. Cette modification est rendue possible grâce à la présence de nombreux groupements  $\text{OH}_2^+$ ,  $\text{OH}$  ou  $\text{O}^-$  sur la surface des nanoparticules. Ces groupements permettent d'établir une coordination entre la molécule organique et la surface de l'oxyde de fer. En fonction du pH, ces groupements influent sur le potentiel  $\zeta$  (Figure 5 et Annexe 9).

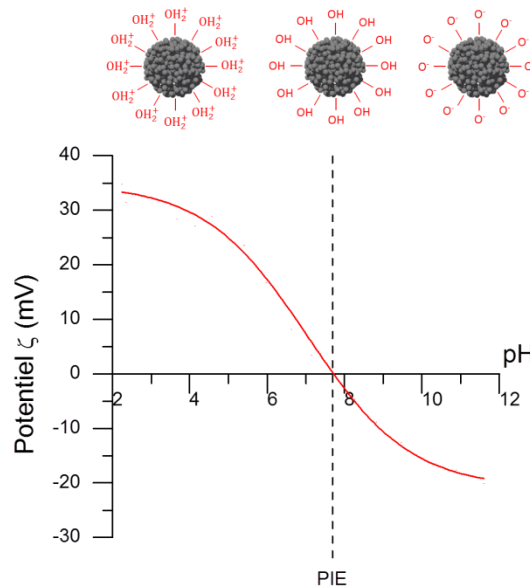


Figure 5 : Evolution de l'état de surface et du potentiel  $\zeta$  des nanoparticules de magnétite en fonction du pH

Différentes voies de synthèse existent pour synthétiser la magnétite. Elles sont évoquées dans la partie suivante.

## 1.2 Les différentes voies de synthèse d'oxydes de fer

### 1.2.1 Les différentes synthèses chimiques existantes

Plusieurs procédés de synthèses chimiques existent pour préparer des nanoparticules d'oxydes de fer telles que la co-précipitation,<sup>31</sup> la décomposition thermique,<sup>32</sup> la méthode sol-gel,<sup>33</sup> la microémulsion<sup>34</sup> et la synthèse hydrothermale<sup>12</sup> ou solvothermale en milieu sous ou supercritique.<sup>35, 36</sup> Chacune de ces synthèses présentent des avantages et inconvénients : facilité de mise en œuvre, rapidité, types de manipulations (traitement thermique ou non par exemple) ou encore pureté du produit et contrôle des paramètres morphologiques et structuraux des nanoparticules produites (Tableau 1, liste non exhaustive). Une illustration MET (Microscopie Electronique en Transmission) des particules obtenues selon les différentes techniques est présentée ci-dessous.

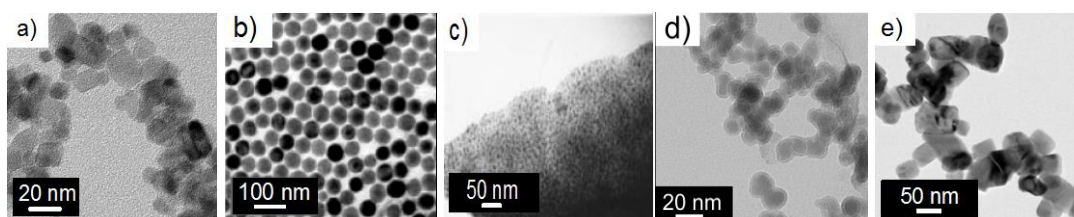


Figure 6 : Image MET de particules d'oxydes de fer synthétisées a) Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> par coprécipitation,<sup>37</sup> b) Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> par décomposition thermique,<sup>38</sup> c) α-Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> par sol-gel,<sup>39</sup> d) Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> par microémulsion,<sup>40</sup> et e) Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> par synthèse hydrothermale batch<sup>37</sup>

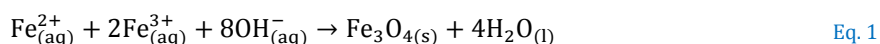
Techniques	Avantages	Inconvénients	Type de réacteur	Taille	Morphologie	Durée de synthèse	Température	Pression	Agents/Précurseurs (exemples)	Réf.
<b>Co-précipitation</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Méthode conventionnelle</li> <li>- Simple</li> <li>- Rapide</li> <li>- Reproductible</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Oxydation facile des ions Fe<sup>2+</sup></li> <li>- Agglomération importante</li> <li>- Influence du pH, du ratio Fe<sup>2+</sup>/Fe<sup>3+</sup> et de la température</li> </ul>	Batch	<20 nm	Polyédrique, sphérique	Minutes	20-90°C	Atm.	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Sels de fer (nitrates, chlorures, sulfates)</li> <li>- Acide citrique</li> <li>- Dextran</li> <li>- Acide thioctique</li> <li>- PEG</li> </ul>	31, 41-46
<b>Décomposition thermique</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Très bon contrôle de la taille et de la morphologie</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Atmosphère inerte</li> <li>- Mise en œuvre compliquée</li> <li>- Température élevée</li> <li>- Synthèse longue</li> <li>- Etapes de purification</li> <li>- Solvant non polaire</li> </ul>	Batch	3 à 20 nm	Sphérique	Heures à quelques jours	100-300°C	Atm. sous reflux	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Composés organométalliques (M(acac))</li> <li>- Agents stabilisants tensio-actifs (oleylamine, acide oléique)</li> </ul>	32, 38, 47-49
<b>Méthode sol-gel</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Possibilité d'obtenir une structure prédéterminée</li> <li>- Phase amorphe pure possible</li> <li>- Bon contrôle de la taille</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Forte agglomération</li> <li>- Nombreux paramètres à contrôler (pH, concentrations, agitation, propriétés et structures du gel, température)</li> <li>- Particules dans des matrices et pollutions</li> </ul>	Batch	20-200 nm	n.d	Heures à quelques jours	Ambiante suivi d'un traitement thermique (400°C)	Atm.	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Nitrates de fer (Fe(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>)</li> <li>- Polymères organiques</li> <li>- Eau, éthanol, acide citrique</li> </ul>	23, 39, 50, 51
<b>Microémulsion</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Bonne cristallinité des particules</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Conditions de synthèse difficiles (mise en œuvre, manipulations, calcination)</li> <li>- Etapes de purifications</li> <li>- Agglomération</li> </ul>	Batch	<50 nm (10-20 nm en moyenne)	Sphérique	Quelques minutes à quelques heures	Calcination à haute température	Atm.et atmosphère inerte	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Deux phases non miscibles (eau/huile)</li> <li>- Sels de fer</li> <li>- Agents NH<sub>4</sub>OH ou NaBH<sub>4</sub></li> <li>- Agent tensio-actif amphiphile (CTAB)</li> <li>- Co-surfactant (n-butanol)</li> </ul>	40, 41, 52
<b>Hydrothermale</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Contrôle de la taille et de la forme</li> <li>- Particules bien cristallisées</li> <li>- Grandes gammes de pression et température accessibles</li> <li>- Distribution en taille étroite</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Agglomération</li> <li>- Risques liés à la manipulation (température, pression)</li> <li>- Temps de synthèse long (en batch) en domaine sous critique</li> </ul>	Batch ou continu	3 nm-3 μm	Sphérique, polyédrique	Quelques heures (batch) Quelques secondes (continu)	100-250°C (batch) 100-400°C (continu)	0,3 à 35 MPa	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Sels de fer</li> <li>- Citrate de fer (Fe(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>H(C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub>)<sub>2</sub>)</li> <li>- Acide décanoïque (C<sub>9</sub>H<sub>19</sub>COOH), n-decylamine (C<sub>10</sub>H<sub>23</sub>N)</li> </ul>	25, 29, 36, 41, 53-65

Tableau 1 : Tableau récapitulatif des différentes synthèses par voie chimique des oxydes de fer (M(acac) : M caractérisant le type de métal employé, acac caractérise l'acétylacétonate et n représente la charge liée au métal qui est égale à 2 ou 3 ; CTAB : Cetyl TrimethylAmmonium Bromide ; Atm. : atmosphérique ; n.d : non déterminée) (liste non exhaustive)

L'une des originalités de notre groupe de recherche est d'avoir développé un dispositif de synthèse hydrothermal fonctionnant en continu.<sup>12, 66-68</sup> La synthèse et une partie de la modification de surface des nanoparticules seront ainsi réalisées *via* ce procédé en vue d'améliorer la stabilité colloïdale, l'état d'agglomération, la taille et le degré d'oxydation des nanoparticules d'oxydes de fer magnétite ( $\text{Fe}_{3(1-\delta)}\text{O}_4$ ) à destination du biomédical. Par ailleurs, les synthèses hydrothermales sont « plus respectueuses de l'environnement » car elles n'utilisent pas de solvants organiques et ne nécessitent aucun post-traitement (calcination) après la synthèse.<sup>25</sup>

## 1.2.2 Le cas de la synthèse hydrothermale

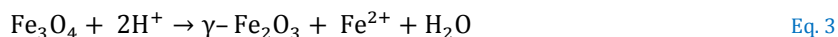
La synthèse hydrothermale résulte de la co-précipitation de sels de fer(II) et fer(III) (en proportion stœchiométrique 1:2) en présence d'une base aqueuse mais à des températures supérieures à 100°C et des pressions dépassant 1 atm. La réaction chimique de formation de la magnétite ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) se déroule selon l'équation suivante :



Cependant, obtenir des nanoparticules de magnétite peu sensibles à l'oxydation (paramètre de maille proche de la magnétite pure  $a = 8.396 \text{ \AA}$ ) peut se révéler difficile (§ 1.1.2). En effet, du fait de la taille et de la réactivité de surface importante de ces nanoparticules, ces dernières se transforment facilement en maghémite ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ) sous environnement oxygène selon la réaction suivante :



Mais l'oxydation sous air n'est pas le seul moyen pour transformer la magnétite en maghémite. Des échanges d'ions ou d'électrons peuvent aussi mener à ce phénomène selon l'équation suivante :



Pour obtenir des nanoparticules avec une faible dispersion en taille, l'étape de nucléation doit être rapide (lorsque la concentration des nanoparticules atteint la sursaturation et la croissance doit être lente. Il est nécessaire de séparer ces deux étapes pour éviter que des tailles différentes apparaissent car la formation de nouveaux germes pendant que d'autres continuent de grossir favorise ce phénomène.<sup>69</sup> Le diagramme de LaMer illustre parfaitement ce phénomène (Figure 7).

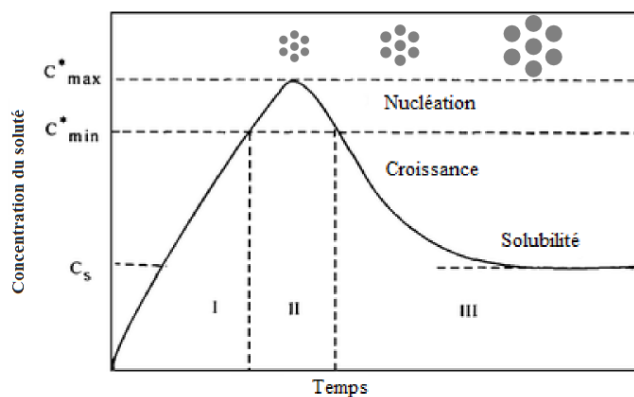
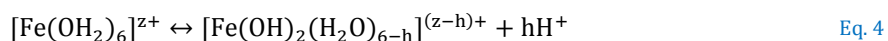
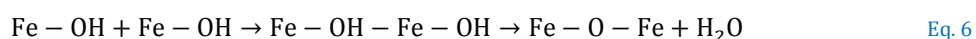
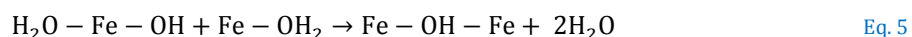


Figure 7 : Diagramme de LaMer représentant la concentration du soluté en fonction du temps et les mécanismes de nucléation et de croissance des particules (inspirée de LaMer *et al.*)<sup>70</sup>

Durant l'étape I a lieu la formation de complexes aqua-hydroxo par une réaction de polycondensation inorganique à partir de ligand aqua (z : charge de l'ion fer) :<sup>71, 72</sup>



Ces précurseurs aqua-hydroxo sont nécessaires pour que la co-précipitation ait lieu. Leur concentration augmente au cours du temps par addition d'une base. Une fois la concentration  $C_{\min}$  atteinte, des germes se forment par l'accélération de la réaction de condensation par olation et oxolation (étape II, Figure 7). Le phénomène d'olation élimine une molécule d'eau tout en formant des ponts hydroxo alors que l'oxolation crée des ponts oxo selon les réactions suivantes :



Ces deux réactions constituent l'étape de nucléation (étape II). Au cours de cette étape, la nucléation se déroule rapidement et les espèces polynucléaires formées sont instables. Une diminution rapide de la concentration en soluté apparaît. Dès que cette concentration est inférieure à  $C_{\min}$ , la nucléation est bloquée. Lors de l'étape suivante (étape III, Figure 7), la croissance continue par incorporation de précurseurs par les réactions d'olation et oxolation. Lorsque la concentration en précurseur de charge nulle est inférieure à la solubilité du précipité, la croissance s'arrête. Une fois cette étape terminée, la diffusion des solutés à la surface du cristal se produit. Ce phénomène est appelé mûrissement d'Ostwald : les particules de petites tailles disparaissent au profit des particules de tailles plus grandes. Jolivet *et al*<sup>73</sup> ont montré que le temps de vieillissement augmente la taille moyenne des nanoparticules. Dans leur étude, cette taille passe de 7,7 nm pour une heure de réaction à 10,6 nm après cinq jours de réaction.

Ces dernières années, les synthèses hydrothermales (solvant eau) ou solvothermales (solvants différents de l'eau) d'oxydes métalliques ont connu un large essor.<sup>53, 54, 57-59, 62, 74-84</sup> Elles sont réalisées dans des réacteurs continu ou batch. Le premier possède l'avantage d'avoir des temps de synthèse courts (quelques secondes), de synthétiser des nanoparticules de faible taille (<50nm) tout en ayant la possibilité de modifier *in situ* la surface des nanoparticules (Tableau 1). Il est difficile d'obtenir à la fois des nanoparticules de magnétite peu oxydée avec une taille inférieure à 20 nm tout en évitant une forte agglomération des nanoparticules.<sup>12, 36, 60</sup>

### 1.2.2.1 Synthèse hydrothermale en réacteur batch

Les réactions sont généralement réalisées dans des autoclaves ou réacteurs fermés avec des températures au-delà de 100°C et des pressions au-delà de 5 bar (0,5 MPa) (Figure 8). L'augmentation de la pression mais aussi de la température présentent plusieurs avantages. Elles génèrent une sursaturation grâce à la faible solubilité des hydroxydes et oxydes métalliques.<sup>25</sup> L'hydrolyse et la déshydratation des sels métalliques se produisent et une importante diffusivité des réactifs apparaît dans le solvant.<sup>25</sup>

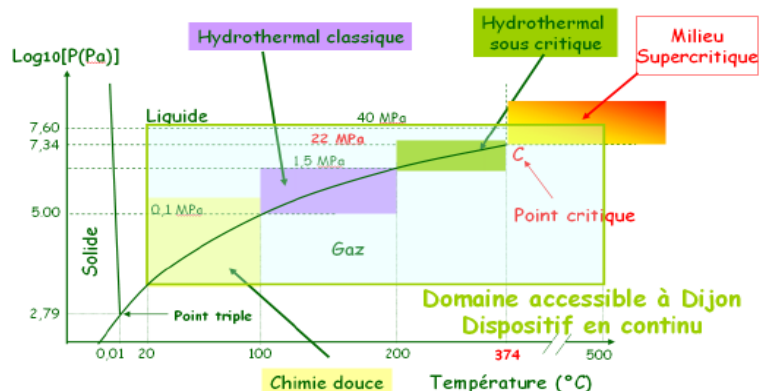


Figure 8 : Diagramme d'état de l'eau en fonction de la température et de la pression et illustration des différents domaines de synthèse<sup>85</sup>

### 1.2.2.1.1 Effet de la température et du temps de réaction

La taille, la nature de la phase et la morphologie des nanoparticules synthétisées en milieu hydrothermal batch sont contrôlées principalement par le temps et la température de réaction. La température influence fortement la taille moyenne des nanoparticules obtenues par ce procédé de synthèse et des tendances opposées sont observées. En effet, une étude relate que lorsque la température de réaction augmente, des particules de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  plus petites en taille apparaissent car l'étape de nucléation peut être plus rapide que l'étape de croissance.<sup>86</sup> Un autre travail de recherche montre que lorsque la température passe de  $100^\circ\text{C}$  à  $180^\circ\text{C}$ , la taille des nanoparticules d'oxydes de fer passe de  $14,5 \pm 4$  à  $29,9 \pm 9$  nm.<sup>87</sup>

Par ailleurs, des temps de synthèse élevés en milieu fortement basique vont accroître la taille des nanoparticules.<sup>65</sup> Une augmentation du temps de synthèse passant de 10 à 120 min en présence de molécules organiques induit la formation de cristallites de taille passant de 20,1 à 22,5 nm et d'agglomérats passant de 50 à 400 nm à  $250^\circ\text{C}$  et 30 MPa (Figure 9).<sup>65</sup> Mizutani *et al.* ont observé ce phénomène en faisant varier les concentrations en ions ferreux et ferriques et les temps de synthèse de 4 à 20 h.<sup>88</sup> De même, en présence d'acide oléique, une augmentation du temps de réaction à  $140^\circ\text{C}$  conduit à une augmentation de la taille des nanoparticules d'oxydes de fer.<sup>78</sup>



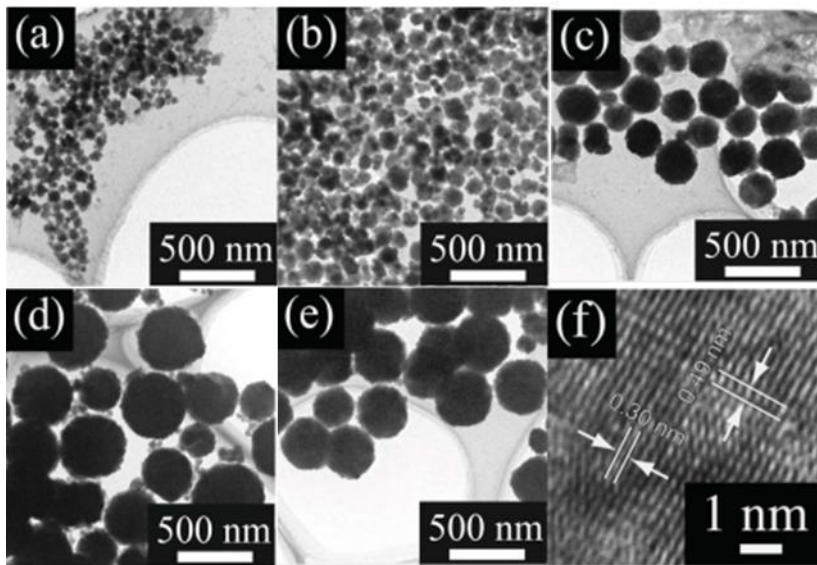


Figure 9 : Images MET de nanoparticules de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  synthétisées à (a) 10 min, (b) 30 min, (c) 60 min, (d) 90 min, (e) 120 min et (f) image haute résolution MET pour un temps de réaction de 30 min à 250 °C et 30 MPa<sup>65</sup>

Ainsi, en toute logique, l'étape de germination favorise la formation de grains de faible taille alors que l'étape de croissance contribue à former des particules de taille plus conséquente. D'autres facteurs jouent un rôle essentiel sur l'aspect final des nanoparticules d'oxydes de fer comme la nature et la concentration des précurseurs.

#### 1.2.2.1.2 Effet de la nature et de la concentration des précurseurs

La nature des précurseurs et leur concentration ont un effet sur la morphologie, la taille et la nature de la phase synthétisée.

- Concentration en ions ferreux et ferriques :

Le rapport ions  $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$  influence la nature de la phase synthétisée. Un faible ratio conduit à l'apparition de goethite  $\text{FeOOH}$  alors qu'un ratio supérieur à  $\frac{1}{2}$  favorise quant à lui la formation de la phase  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  tout en augmentant la taille moyenne des nanoparticules (Figure 10).<sup>88</sup>

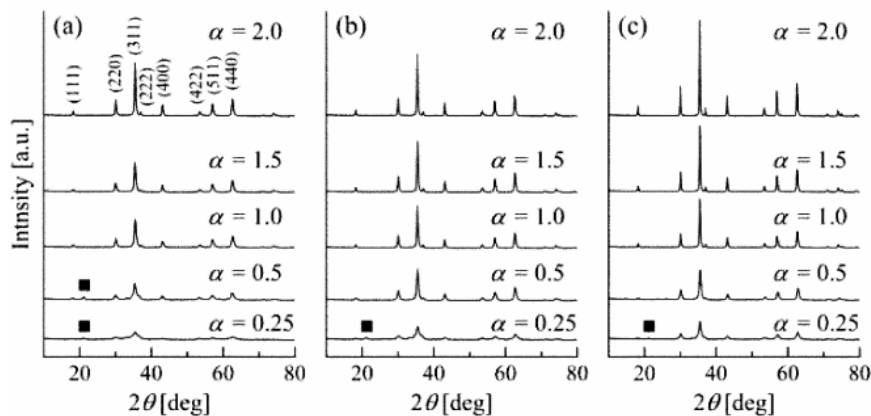


Figure 10 : Diffractogrammes d'échantillons préparés selon différents ratios molaires ( $\alpha$ ) en  $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$  a) avant chauffage, b) après chauffage (120°C) de 4h et c) 20h. Le symbole ■ correspond à la goethite  $\text{FeOOH}$ <sup>88</sup>

- Présence de molécules organiques :

L'ajout de composés organiques au cours de la synthèse tels que l'acide décanoïque ( $C_9H_{19}COOH$ ) et n-decylamine ( $C_{10}H_{23}N$ ) modifient la phase finale.<sup>59</sup> Les auteurs de cette étude ont démontré que la n-decylamine empêche la formation de la phase hématite à une température de 200 °C. D'autres molécules modifient cette fois-ci la forme des nanoparticules. Par exemple, la L-phénylalanine ajoutée lors de synthèses hydrothermales à 220 °C, 22 MPa et durant 30 minutes génère des formes de nanoaiguilles (Figure 11).<sup>61</sup> Des modifications par des catéchols (DHCA et LDOPA) ont aussi été réalisées. Les particules formées ont alors la particularité de former des agglomérats ayant une taille de l'ordre de la centaine de nanomètres.<sup>61, 89, 90</sup>

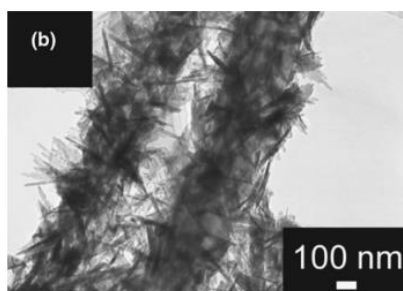


Figure 11 : Image MET de nanoparticules de  $Fe_3O_4$  modifiées par des molécules de diphenylalanine cyclique<sup>61</sup>

- Nature des précurseurs :

La nature des précurseurs (type de contre-ions) influence également la taille et la phase finale des nanoparticules d'oxydes de fer. Par exemple, l'utilisation à une concentration importante de nitrates ferriques entraîne une augmentation du diamètre des particules d'hématite.<sup>56</sup> Aussi, l'emploi de citrate de fer ( $Fe(NH_4)_2H(C_6H_5O_7)_2$ ) conduit à l'obtention de particules de magnétite poreuses et de forme sphérique avec un diamètre moyen compris entre 2 et 3  $\mu m$  à 200 °C durant 24h.<sup>91</sup>

- Modification de la base :

Récemment, il a été montré que la nature et la concentration chimique de la base ont un effet sur la taille et la morphologie des particules de magnétite. En effet, une augmentation de la concentration en soude (NaOH) favorise des formes octaédriques plus ou moins prononcées au lieu de particules sphériques tout en augmentant la cristallinité des particules.<sup>92</sup> Cette forme devient octaédrique à partir d'une concentration donnée ( $C = 5M$ ) (Figure 12). En ce qui concerne la nature chimique de la base, des phénomènes intéressants sont observés. Le thiosulfate de sodium  $Na_2S_2O_3$  favorise par exemple la formation de cristaux de  $Fe_3O_4$  de forme octaédrique.<sup>80</sup> L'augmentation de la longueur de la chaîne alkyl d'une base comme le passage d'une base tetraméthylammonium hydroxyde ( $N(CH_3)_4OH$ ) à une base tetrapropylammonium hydroxyde ( $N(C_3H_7)_4OH$ ) conduit à une diminution drastique du diamètre des nanoparticules passant de 40 nm à 21 nm à concentration égale.<sup>93</sup> L'énergie d'adsorption sur la surface des nanoparticules est plus importante pour des molécules organiques dont la longueur de la chaîne aliphatique augmente.

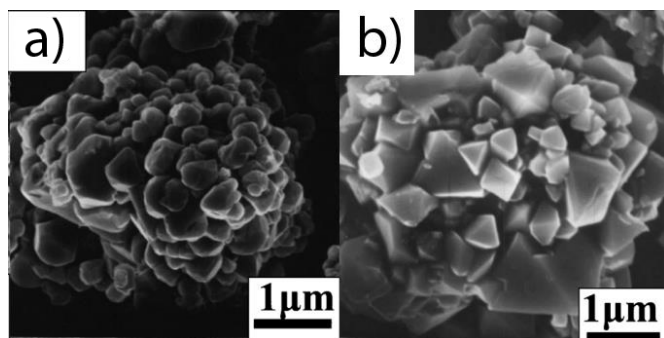


Figure 12 : Image MEB de particules d'oxydes de fer à a) une concentration de 2M et b) 5M en NaOH<sup>92</sup>

Le pH influence également les caractéristiques physico-chimiques des nanoparticules.

### 1.2.2.1.3 Effet du pH

Pour réaliser la synthèse de magnétite, il est important de travailler en milieu basique (Eq. 1). Ces conditions favorisent la co-précipitation et la cristallisation des particules pour assurer une meilleure germination tout en limitant les croissances non homogènes des grains.<sup>93</sup> Une augmentation du pH conduit à une diminution de la taille des nanoparticules.<sup>93</sup> Mais des phénomènes inverses sont aussi observés. En effet, sur des temps de synthèse « courts » (deux heures), une augmentation du pH lors de la synthèse de maghémite conduit à une augmentation de la taille moyenne des nanoparticules alors que sur des temps de synthèse longs, l'inverse se produit.<sup>93, 94</sup>

### 1.2.2.1.4 Conclusion

De nombreux paramètres influencent de manière notable la morphologie, la taille et la phase des nanoparticules d'oxydes de fer synthétisées en milieu hydrothermal batch. Contrôler chacun de ces paramètres est crucial en vue d'obtenir le produit final souhaité. Cependant les synthèses en réacteur batch, même si elles offrent un bon contrôle des tailles, de la cristallinité ou de la morphologie des nanoparticules, souffrent de certains inconvénients. Elles durent généralement longtemps (plusieurs heures) et elles conduisent souvent à la formation de particule de taille supérieure à 20 nm. Une alternative réside dans la synthèse hydrothermale en continu.

### 1.2.2.2 Synthèse hydrothermale en continu

La nécessité de devoir produire de grandes quantités de nanoparticules d'oxydes de fer possédant les caractéristiques désirées telles qu'une taille moyenne de cristallites inférieure à 20 nm (nucléation rapide et croissance limitée), une distribution en taille étroite et une bonne cristallisation font de la synthèse hydrothermale en continu un très bon candidat.<sup>25</sup> Le processus associe à la fois les avantages de la synthèse hydrothermale batch et la volonté industrielle de produire en grande quantité tout en pouvant réaliser une fonctionnalisation *in situ*. Méthode de synthèse relativement récente, peu d'équipes travaillent actuellement sur ce type de dispositif intéressant et innovant : l'université de Nottingham, le laboratoire Adschiri au Japon, l'institut Fraunhofer pour la technologie chimique à Pfintzal en Allemagne et le laboratoire ICB à Dijon notamment.<sup>62, 95, 96</sup> Pareillement au réacteur batch, la température, le temps de synthèse, la nature des réactifs ou encore les concentrations sont des

paramètres clés qui influencent fortement la nature de la phase synthétisée, la taille et la morphologie des grains.

### 1.2.2.2.1 Influence de la forme du réacteur

La synthèse hydrothermale en continu a induit le développement de réacteurs se différenciant par leur géométrie et zone de mélange.<sup>83, 95, 97</sup> Il est préférable d'opter pour un mélange rapide entre les différents réactifs (eau, sels métalliques, base...) avec une zone de mélange homogène. Cela évite une forte accumulation des nanoparticules pouvant mener à une agglomération et une croissance importantes des grains. Une nucléation rapide et une croissance lente sont alors assurées afin d'obtenir des particules cristallines avec une dispersion en taille étroite.

Par simulation et études expérimentales, plusieurs géométries de réacteurs ont été proposées (Figure 13).<sup>83, 95, 97-99</sup>

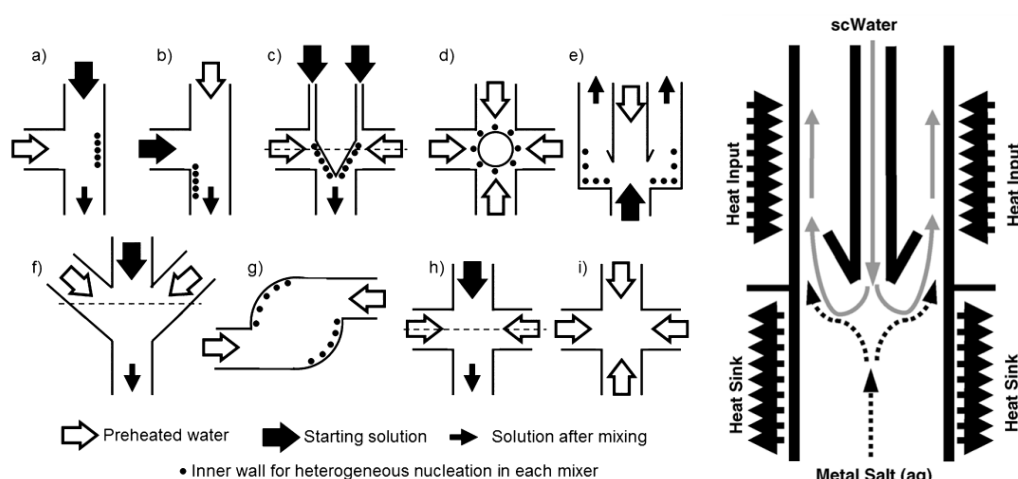


Figure 13 : Exemples de différentes géométries de réacteurs<sup>83, 95</sup>

Il est possible d'injecter à contre-courant l'eau et les réactifs selon différentes possibilités. Lester *et al.* ont mis en place un procédé où l'eau est injectée par le haut du réacteur alors que les réactifs sont injectés par le bas (Figure 13-e). Ce système permet une synthèse rapide de nanoparticules à l'intérieur du réacteur tout en empêchant au maximum la croissance de celles-ci. Dans cette même logique, l'équipe MaNaPI a mis au point un réacteur à partir de simulation CFD (Computational Fluid Dynamics) dans lequel l'eau arrive également à contre-courant par rapport au(x) sel(s) de précurseurs métalliques (Figure 14).<sup>100</sup>



Figure 14 : Réacteur hydrothermal développé par l'équipe MaNaPI<sup>100</sup>

#### 1.2.2.2.2 Effet du temps de résidence

La géométrie et la configuration du réacteur influent aussi sur le temps de séjour qui joue un rôle majeur sur l'oxyde de fer obtenu. Généralement, une modification de taille et de phase sont générées par des variations de durée de synthèse. Sato et *al.* ont synthétisé des nanoparticules de ferrites à 673 K et 30 MPa.<sup>101</sup> D'après leur étude, un temps de résidence long a tendance à augmenter à la fois la taille moyenne des nanoparticules et le rapport molaire Me/Fe dans les nanoparticules de ferrites  $\text{MeFe}_2\text{O}_4$  (Me = Zn, Cu, Ni). Cette même tendance fut aussi notée par Sue et *al.*<sup>82</sup> Une augmentation du temps de résidence de 0,02 à 2 secondes à 673 K et 30 MPa favorise la formation de nanoparticules de ferrites de nickel accompagnée d'une augmentation du ratio molaire Ni/Fe se traduisant aussi par une diminution du paramètre de maille de 8,35 Å à 8,34 Å. Ces résultats montrent qu'à une étape précoce de la réaction, les produits synthétisés ont une structure proche de la maghémite  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  (des nanoparticules de  $\text{NiFe}_2\text{O}_4$  avec une déficience cationique en Ni) alors qu'à une étape tardive de la réaction, les produits de réaction ont une structure proche de  $\text{NiFe}_2\text{O}_4$ . Ils ont aussi mis en évidence, en travaillant à partir de précurseur  $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$  en faible quantité et en augmentant le temps de résidence de 0,1s à 1,0s, une transformation de phase maghémite ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ) vers l'hématite ( $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ). Toujours à partir du même précurseur, une augmentation de 0,1 à 2,0 secondes conduit à une augmentation de la taille moyenne des nanoparticules de 4,0 à 6,7 nm.<sup>99</sup> De même, il est difficile de dissocier temps de résidence et débit. Ils sont intrinsèquement liés. En effet, en augmentant le débit, le temps de résidence des nanoparticules dans le réacteur diminue.<sup>102</sup> Une augmentation du débit de 50 mL/min à 100 mL/min à 300°C conduit respectivement à un temps de résidence de 1,27s et 0,63s dans le réacteur. Cette diminution du débit induit une augmentation de la taille des nanoparticules avec une distribution en taille uniforme.<sup>102</sup>

### 1.2.2.2.3 Effet de la nature des précurseurs et de leur concentration

La composition chimique des précurseurs de fer influence énormément la nature de la phase de l'oxyde de fer synthétisée. Des travaux ont contribué au développement de la synthèse de nanoparticules d'hématite à l'aide d'un réacteur en continu pour le domaine supercritique. En effet, des nanoparticules d'hématite avec une taille inférieure à 10 nm ont été obtenues à partir de nitrate ferriques ou sulfate d'ammonium ferrique.<sup>77</sup> De même, à forte concentration de  $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$ , une transition d'un mélange maghémite et hématite vers l'hématite seule a été observée en utilisant un réacteur de type T-mixer.<sup>83</sup>

D'autres précurseurs ont montré des effets intéressants. Ainsi, des nanoparticules de magnétite ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) sphériques ont été obtenues à partir de citrate d'ammonium ferrique  $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2\text{H}(\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7)_2$  avec une taille moyenne de 50 nm.<sup>96, 103</sup> Toutes ces synthèses ont été réalisées sans l'ajout d'une base forte. Le citrate d'ammonium ferrique joue un rôle majeur dans l'obtention de la phase spinelle. En effet, il a été montré qu'il favorise la réduction du fer(III) en fer(II) par la production de monoxyde de carbone *via* la décomposition thermique du citrate d'ammonium au cours de la synthèse. Dès lors, le gaz étant miscible dans les fluides supercritiques, il est possible de réaliser une atmosphère réductrice ou anti-oxydante à l'intérieur du réacteur par la présence du monoxyde de carbone ou encore du dihydrogène  $\text{H}_2$ . A l'aide de cette atmosphère réductrice, la réduction des ions  $\text{Fe}^{3+}$  en ions  $\text{Fe}^{2+}$  est possible. A partir de cette observation, d'autres molécules ont été étudiées. Par exemple, plus récemment, la décomposition de l'acide formique  $\text{CH}_2\text{O}_2$  en  $\text{H}_2$ <sup>104</sup> sous conditions hydrothermales et hydrothermales supercritiques<sup>105</sup> a été étudiée ; elle favorise l'obtention de la phase magnétite.<sup>36</sup>

De plus, la concentration en précurseurs de fer a un impact sur la nature de la phase synthétisée. En effet, une faible concentration favorise la formation de l'hématite.<sup>83</sup> Il est également possible en diminuant la concentration en nitrates métalliques mais aussi un autre paramètre tel que le temps de résidence des particules dans le réacteur d'obtenir une distribution étroite en taille.<sup>54</sup>

### 1.2.2.2.4 Influence de la température

D'autres études ont montré que la taille, la morphologie et la phase des nanoparticules étaient fortement dépendantes de la température de réaction. Une température importante tend à favoriser la phase hématite.<sup>106</sup> De même, une augmentation de la température de 200°C à 400°C (à partir d'acétate de fer(II) et sous une pression de 25 MPa) s'accompagne d'une croissance de la taille des nanoparticules de l'ordre de 40-60 nm.<sup>55, 79</sup> Cependant, cette tendance s'inverse au-delà d'une certaine température. Par exemple, dans des réacteurs en continu à 30 MPa, le passage de 250°C à 350°C augmente significativement la taille des cristallites d'hématite de 20 nm à 40 nm mais une fois le point supercritique de l'eau atteint, la taille diminue passant ainsi de 40 nm à 35 nm ( $T = 420^\circ\text{C}$ ). Cet inversement de taille des nanoparticules est dû au faible pouvoir solubilisant de l'eau supercritique (chute de la constante diélectrique de l'eau après le passage du point critique) mais aussi à la forte hydrolyse des nitrates de fer dans l'eau supercritique (Figure 15).<sup>81</sup> Ces deux phénomènes ralentissent la croissance des nanoparticules d'oxydes de fer.



Pour modifier la taille, la morphologie, la nature de la phase ou encore la stabilité des nanoparticules en solution, l'ajout d'agents organiques *in situ* au cours de la synthèse a été envisagé.

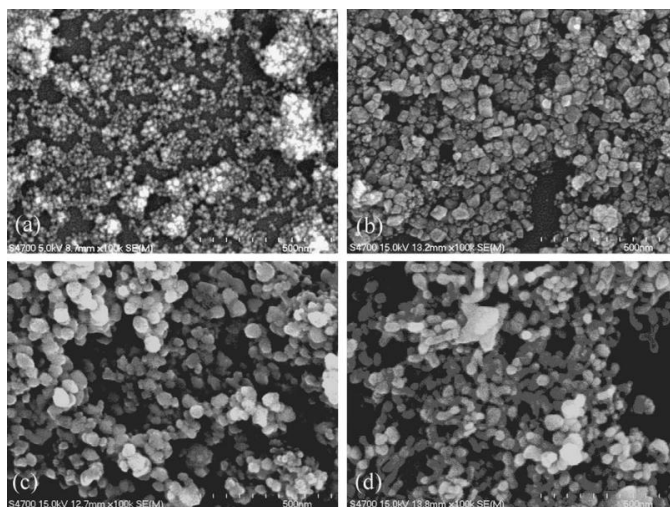


Figure 15 : Images MEB d'hématite synthétisées en milieu hydrothermal (30 MPa) à a) 200°C, b) 250°C, c) 350°C et d) 420°C<sup>81</sup>

#### 1.2.2.2.5 Influence des agents organiques

L'emploi de molécules organiques *in situ* est tout à fait possible sur ce type de synthèse malgré les hautes températures et hautes pressions employées. Des molécules de type acide carboxylique (acide citrique, acide oléique, acide décanoïque), des alcynes, des alcools (hexanol) ou encore des polymères (alcool polyvinylique) ont notamment été ajoutées.<sup>12, 55, 60, 63, 64, 106-108</sup> L'objectif est alors de modifier les particules (taille, morphologie, phase). Ainsi, de nombreuses études sur différents matériaux ont été menées. Des poudres de AlOOH, des oxydes d'indium-étain mais encore Cu/CuO/Cu<sub>2</sub>O, ZnO, CeO<sub>2</sub>, BaTiO<sub>3</sub> ont été fonctionnalisés.<sup>75, 108-110</sup> Par exemple, en l'absence de la molécule 1-hexanethiol, des nanoparticules d'oxydes de cuivre (II) sont obtenues à partir de l'hydrolyse de nitrate de cuivre Cu(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> en milieu supercritique (400°C et 20 MPa) alors qu'en présence du ligand, des nanocristaux de cuivre sont formés. Ce ligand participe au contrôle de l'état d'oxydation des nanocristaux en réduisant le Cu<sup>II</sup> en Cu<sup>0</sup>. Il améliore la stabilité des particules et modifie la croissance des nanocristaux.<sup>109</sup> Par ailleurs, de l'oxyde d'indium-étain a été synthétisé en milieu hydrothermal supercritique et modifié *in situ* avec de l'acide hexanoïque. Celui-ci a conduit à la formation de nanoparticules de forme cubique en modifiant la croissance et la taille finale des nanoparticules ainsi que leur état de dispersion. Enfin, comme autre exemple, des nanobâtonnets de ZnO en conditions hydrothermales supercritiques ont aussi été produits et modifiés par des ligands tels que l'hexanol, l'hexanal et l'hexylamine.

Les molécules présentes à la surface de ces nanoparticules ont pour objectif aussi de fonctionnaliser ces dernières pour modifier leur chimie de surface<sup>12, 106</sup> ceci afin d'envisager par exemple des applications biologiques en réalisant des greffages ultérieurs de biomolécules, de molécules fluorescentes ou encore d'agents complexants.<sup>60, 64</sup> L'effet de ces molécules organiques sur les oxydes de fer n'est pas en reste. L'emploi de ces molécules aide à mieux contrôler différents paramètres tels que taille, morphologie, phase... Contrôler efficacement ces derniers constitue une étape préliminaire pour les applications biologiques (IRM, hyperthermie...).

Très peu de molécules organiques ont été greffées *in situ* au cours de la synthèse d'oxydes de fer en milieu hydrothermal continu.<sup>12, 55, 60, 63, 111</sup> Xu *et al.* montrent rapidement que l'emploi d'un surfactant peut influencer les caractéristiques finales des grains d'oxydes de fer synthétisés. En effet, la présence de l'alcool polyvinylique (PVA) durant la synthèse d'hématite ( $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ) empêche l'agrégation des nanoparticules et conduit à une distribution en taille plus étroite. Ce facteur est d'autant plus important que la concentration en PVA est grande.<sup>55</sup> Cette molécule a la capacité de se fixer à la surface des particules *via* ses nombreux sites hydroxyles de surface (§ 1.2.2).

Un autre agent a montré des résultats très prometteurs. L'ajout de l'acide citrique au cours de la synthèse favorise la formation de la magnétite grâce à un effet antioxydant en empêchant la formation de la phase hématite ( $T = 150^\circ\text{C}$  et  $P = 25\text{ MPa}$ ).<sup>12</sup> La stabilité des nanoparticules en solution est améliorée par la présence des groupements  $\text{COO}^-$  qui évitent le phénomène d'agrégation. Cette molécule par la présence importante de groupements carboxyliques est largement employée en chimie douce par exemple pour greffer d'autres agents organiques.<sup>112-115</sup>

#### 1.2.2.2.6 Particules synthétisées et modifiées en hydrothermal continu en vue d'une application biomédicale

Les nanoparticules magnétiques à destination de l'imagerie médicale doivent être non-toxiques, présenter une aimantation à saturation élevée, avoir une taille inférieure à 20 nm ainsi qu'une bonne stabilité colloïdale dans différents milieux biologiques (selon les milieux de cultures).<sup>15, 18, 116</sup> Cette stabilité et modification de taille passe par une fonctionnalisation de surface des nanoparticules à l'aide de polymères<sup>117, 118</sup> ou encore d'agents électrostatiques.<sup>12, 119, 120</sup> Ces modifications de surface sont nombreuses en fonction des stratégies et domaines d'applications souhaités.<sup>15, 16, 121</sup> Elles peuvent s'effectuer de deux manières : en continu lors de la synthèse des nanoparticules d'oxydes de fer<sup>12, 29, 55, 60, 62, 63, 106</sup> ou post-synthèse.<sup>14, 122, 123</sup>

De récents travaux ont commencé à émerger (tests *in vitro*) sur des applications biologiques éventuelles à partir de particules synthétisées en hydrothermal continu. Togashi *et al.*<sup>60</sup> ont étudié l'impact de l'acide 3,4-dihydroxyhydrocinnamique (DHCA) ( $(\text{HO})_2\text{C}_6\text{H}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H}$ ) sur la synthèse de particules de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ . Il a été noté que cette molécule organique améliore la stabilité des nanoparticules synthétisées par la présence des groupements  $\text{COOH}$  libres et permet de conserver la magnétite jusqu'à des températures de  $350^\circ\text{C}$  alors qu'habituellement l'hématite est la phase observée à de telles températures (Figure 16). Le passage de  $230^\circ\text{C}$  et  $350^\circ\text{C}$  se traduit là encore par une augmentation de la taille moyenne des cristallites passant ainsi de 10,5 à 17,6 nm.



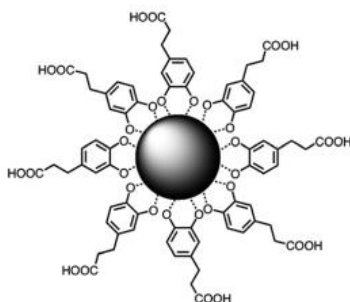


Figure 16 : Nanoparticule de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> modifiée en surface par du DHCA<sup>65</sup>

Ils ont ensuite testé ces nanoparticules afin d'évaluer leur réponse immunologique en mesurant, par exemple, la production de cytokine\* après co-incubation par des cellules dendritiques de la moelle osseuse. Ils ont alors montré l'absence de production de cette molécule soulignant ainsi aucune stimulation du système immunitaire par les nanoparticules modifiées par le DHCA. De plus, ces nanoparticules ont montré des propriétés superparamagnétiques avec une aimantation à saturation de 75,4 emu.g<sup>-1</sup>. D'après les auteurs, elles sont potentiellement utilisables pour des applications biologiques.

Plus récemment, des modifications de surface en continu ont été menées en vue de prévoir une fonctionnalisation secondaire des nanoparticules pour envisager des applications biologiques.<sup>63, 64</sup> Les molécules organiques choisies possèdent des groupements terminaux utilisables en chimie clic<sup>†</sup>.<sup>124</sup> Les nanoparticules d'oxydes de fer ont été synthétisées en présence de l'acide 5-hexynoïque ou 10-undécynoïque (T = 673K, P= 30 MPa) présentant chacun un groupement carboxylique formant une liaison stable avec l'oxyde de fer durant la synthèse et un autre groupement réactif (libre) utilisable pour des fonctionnalisations secondaires (Figure 17). L'utilisation de l'un ou l'autre agent organique influence la nature de la phase obtenue. Par exemple, l'acide 5-hexynoïque conduit à la présence de maghémite et magnétite alors que l'emploi de l'acide 10-undécynoïque conduit à un mélange d'hématite (25%) et de maghémite/magnétite (75%). Par la suite, une molécule fluorescente avec un groupement azoture (R-N=N=N) (dérivée de la rhodamine) a été greffée, montrant ainsi la viabilité de la méthode de greffage et son efficacité.<sup>63, 64</sup>

\* Cytokine : substance soluble de signalisation cellulaire produite par le système immunitaire

† Par définition la chimie clic est simple, efficace et applicable dans différents domaines sans la moindre formation de produits secondaires, faisant ainsi de la chimie clic un outil prometteur dans le domaine de la science colloïdale

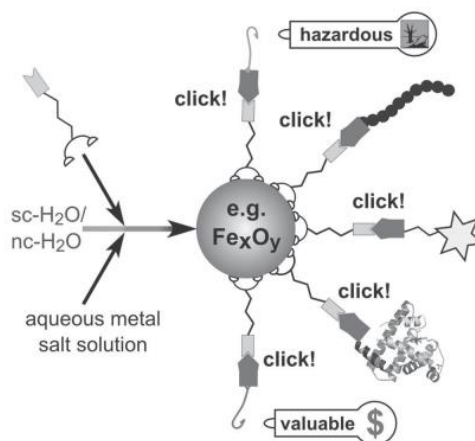


Figure 17 : Représentation schématique du processus de synthèse de nanoparticules d'oxydes de fer modifiées en surface par des molécules organiques utilisées en chimie clic<sup>64</sup>

### 1.2.2.3 Conclusion

Peu d'études se consacrent à la modification de surface de nanoparticules d'oxydes de fer en milieu hydrothermal continu pour améliorer leur état d'oxydation (obtenir de la magnétite), leur stabilité colloïdale et permettre leur fonctionnalisation secondaire sur les groupements chimiques fonctionnels libres.

C'est pour cette raison que l'étude présentée dans ce manuscrit porte sur la mise au point de particules de magnétite modifiées en surface (Figure 1 : étape 1) en milieu hydrothermal continu pour l'imagerie bimodale IRM/TEP ou IRM/TEMP. Cependant, pour être utilisables en IRM notamment, ces particules devront acquérir des propriétés magnétiques spécifiques (être superparamagnétique et avoir une aimantation à saturation importante). Toutes ces considérations sont abordées dans la partie suivante.

## 1.3 Le magnétisme dans les oxydes de fer

Les matériaux qualifiés de ferro- ou ferrimagnétiques (§ 1.3.1) peuvent acquérir un comportement dit superparamagnétique lorsqu'ils sont nanométriques et plus précisément lorsque la taille des nanoparticules est inférieure à 20 nm environ dans le cas des oxydes de fer.<sup>7, 22, 125</sup> Afin d'expliquer plus en détails ce comportement, il est nécessaire d'aborder quelques notions élémentaires du magnétisme dans un matériau dit massif afin de mieux appréhender et comprendre ce qui se déroule à l'échelle d'une nanoparticule.

### 1.3.1 Généralités

A l'échelle de l'atome, les orbitales électroniques ou spin des électrons génèrent des champs magnétiques ou moments magnétiques ( $\mu_{at}$ ). En fonction de leurs propriétés magnétiques (moment magnétique atomique  $\mu_{at}$ ), il est possible de classer les matériaux en plusieurs catégories (Figure 18).

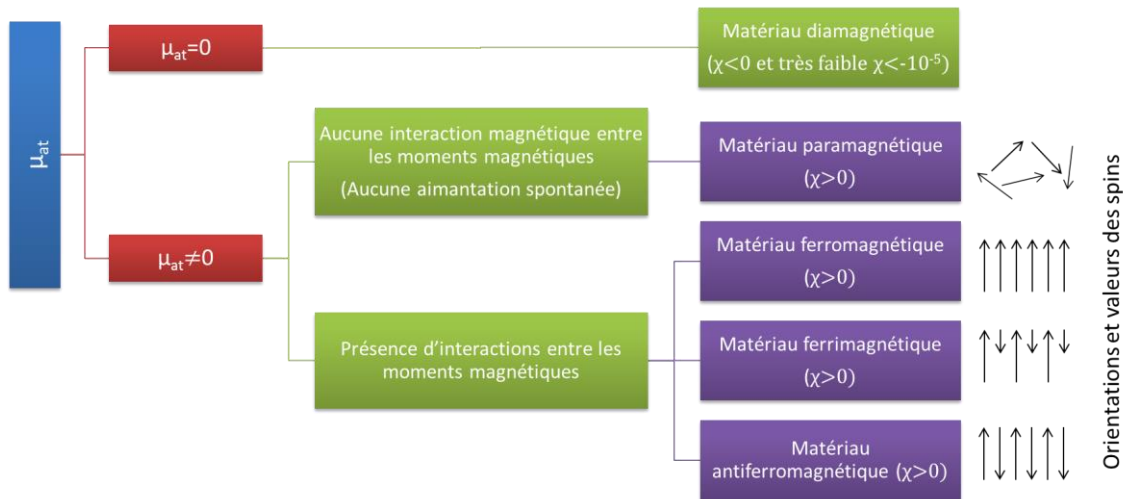


Figure 18 : Présentation des différents types de matériaux magnétiques avec  $\chi$  la susceptibilité magnétique (inspirée de Neamtu)<sup>126</sup>

Ces moments magnétiques, sous l'action d'un champ magnétiques  $\vec{H}$ (A/m), créent une aimantation nucléaire macroscopique  $\vec{M}$ (A/m). Ces deux grandeurs sont reliées entre elles par une grandeur spécifique au matériau : la susceptibilité magnétique  $\chi$  (Eq. 7).

$$\vec{M} = \chi \vec{H} \quad \text{Eq. 7}$$

La susceptibilité magnétique représente la faculté d'un matériau à s'aimanter sous un champ magnétique et permet de distinguer les matériaux paramagnétiques ( $\chi > 0$ ) des matériaux qualifiés de diamagnétiques ( $\chi < 0$ ). Des matériaux avec une susceptibilité magnétique supérieure à zéro et superparamagnétiques sont en général recherchés pour une utilisation en IRM. La magnétite (ferromagnétique) et la maghémite (ferrimagnétique) présentent une susceptibilité positive. Une aimantation rémanente ( $M_r$ ) en l'absence de champ magnétique extérieur qualifie également le matériau (Figure 19).<sup>25</sup> En diminuant la taille des nanoparticules en dessous de 20 nm environ, celles-ci deviennent superparamagnétiques, c'est-à-dire qu'elles ne possèdent aucune aimantation rémanente en l'absence de champ extérieur appliqué (Figure 19). Cette propriété intéressante les conduit à être utilisées en IRM car cette dernière utilise un champ magnétique oscillant (§ 1.4.1.1).

### 1.3.2 Domaines de Weiss et parois de Bloch : vers le superparamagnétisme

Le fait qu'un matériau superparamagnétique ne possède pas d'aimantation rémanente en l'absence dans champ magnétique extérieur est lié à la disparition des domaines de Weiss et parois de Bloch présents dans les matériaux massifs (Figure 19). En effet, un matériau magnétique massif est composé de domaines magnétiques appelés domaines de Weiss. Ils sont séparés par des parois (zones de transition) dites parois de Bloch. Sous l'action d'un champ magnétique extérieur  $H$  (en Tesla), les moments magnétiques contribuant à l'aimantation  $M$  (emu/g) s'alignent au fur et mesure dans la direction du champ appliqué jusqu'à atteindre une valeur maximale dite d'aimantation à saturation  $M_s$ . Si le matériau est massif, une aimantation rémanente ( $M_r$ ) et un champ coercitif  $H_c$  existent.

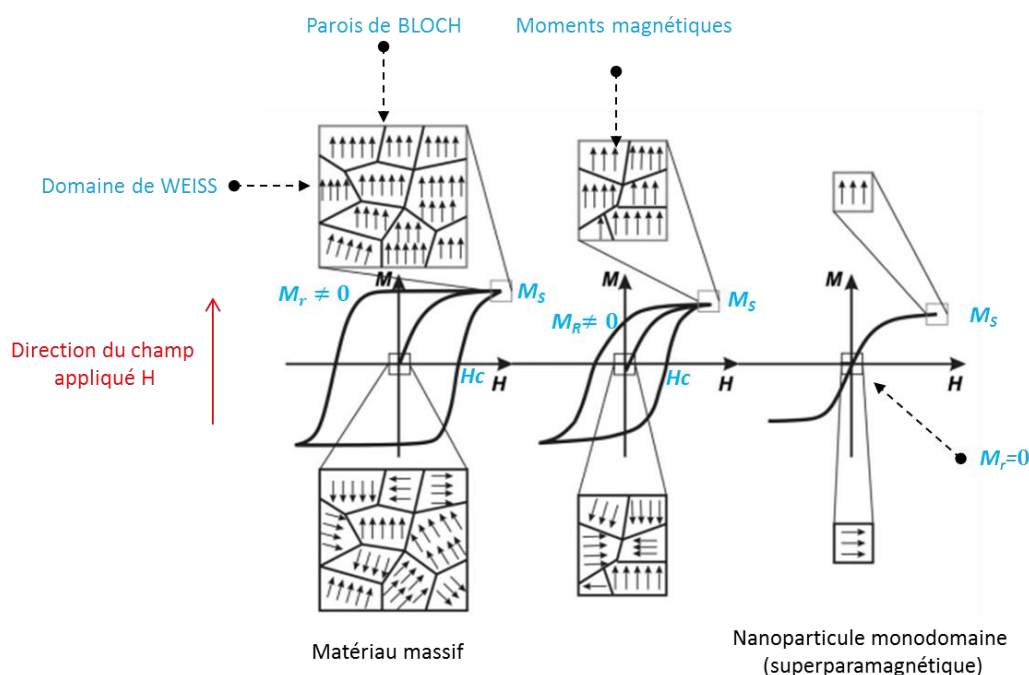


Figure 19 : Représentation schématisée des parois de Bloch, des domaines de Weiss, du champ coercitif  $H_c$ , des aimantations rémanentes  $M_r$  (emu/g) (quand  $H$  est nul) et à saturation  $M_s$  (emu/g) (quand  $H$  est maximal) en fonction du champ magnétique appliqué  $H$  et leurs évolutions suivant la taille du matériau (inspirée de Schladt *et al.*)<sup>24</sup>

Dans le cas de la magnétite, quand la taille de la particule diminue jusqu'à être inférieure à une vingtaine de nanomètre, la particule devient monodomaine (état le plus stable et le moins coûteux en énergie pour la particule) et devient superparamagnétique. Kittel *et al.*<sup>127</sup> a ainsi défini un diamètre critique  $D_c$  d'une sphère à partir duquel la configuration monodomaine est la plus stable (Eq. 8). Ce diamètre critique  $D_c$  dépend de la nature du matériau. Il se situe aux alentours de 20 nm pour les matériaux ferromagnétiques. A titre d'exemple, la maghémite possède une taille critique à 30 nm.<sup>128, 129</sup>

$$D_c = \frac{18\sqrt{AK_{eff}}}{\mu_0 M_S^2} \quad \text{Eq. 8}$$

(avec  $A$  la constante d'échange associée à l'énergie d'échange (J/m),  $K_{eff}$  la constante d'anisotropie uniaxiale ( $K_j/m^3$ ),  $\mu_0$  la perméabilité du vide et  $M_S$  l'aimantation à saturation ( $Am^2/kg$ ))

En résumé, si la particule acquiert une taille trop petite ( $d < 20$  nm pour les matériaux de type ferromagnétique), la particule va alors devenir monodomaine. La particule se comporte alors comme un domaine unique qui fluctue tout seul. Ce diamètre critique donne naissance à la propriété de superparamagnétisme des nanoparticules et aucune aimantation rémanente en l'absence de champ extérieur n'existe.

### 1.3.3 Superparamagnétisme

Le comportement superparamagnétique recherché pour ces travaux apparaît donc quand les nanoparticules sont monodomaines. Sous l'influence de la température et sans champ magnétique extérieur appliqué, l'aimantation peut spontanément se renverser (changer de direction). Ces deux configurations stables « up » and « down » sont alors définies selon l'orientation du macrospin  $\mu$  (sommées

des moments magnétiques des atomes  $\mu_a$  de la nanoparticule tel que  $\mu = n\mu_a$  avec  $n$  le nombre d'atomes présents) de la nanoparticule. Il s'oriente selon un axe dit de facile aimantation (axe d'énergie minimale où l'aimantation s'aligne plus facilement selon certains axes du réseau cristallin)<sup>130</sup> et selon deux positions d'équilibres dites antiparallèle ou parallèle (Figure 20). Le mécanisme de rotation du macrospin a été décrit initialement par Stoner et Woltharth. Ces deux états (up and down) sont séparés par une barrière énergétique.

L'énergie nécessaire pour atteindre le point d'équilibre entre les deux états est faible pour une nanoparticule. Cette énergie est de l'ordre de grandeur de l'énergie thermique  $k_B T$ , où  $k_B$  représente la constante de Boltzmann (J/K) et  $T$  la température (K).

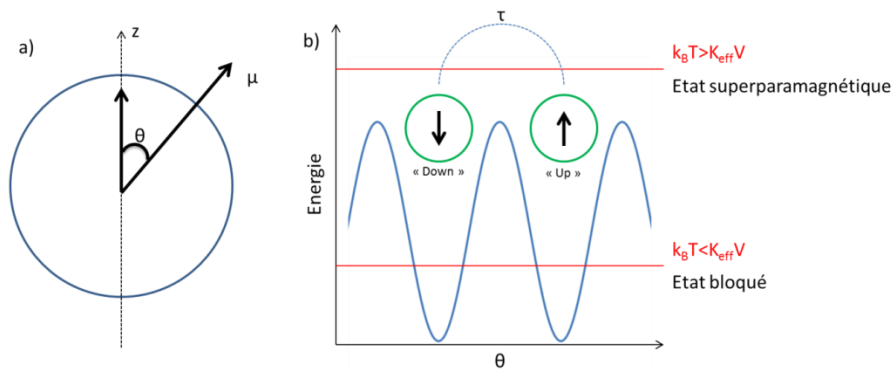


Figure 20 : a) Particule d'axe de facile aimantation  $z$  et de macrospin  $\mu$  ( $\theta$  = angle entre  $z$  et  $\mu$ ) et b) variation de l'énergie d'anisotropie magnétique\* de la particule en fonction de l'angle que fait le moment magnétique avec l'axe d'aimantation en l'absence de champ magnétique extérieur  $H$  (inspirée de Ciuculescu)<sup>131</sup>

Le comportement superparamagnétique a été dévoilé par Néel. Il a alors introduit la notion de temps de relaxation  $\tau_N$  comme le temps moyen nécessaire pour permettre la rotation de l'aimantation (ou temps nécessaire pour franchir cette barrière d'activation) suivant <sup>132</sup> :

$$\tau_N = \tau_0 e^{\frac{E_A}{k_B T}} \quad \text{Eq. 9}$$

(avec  $\tau_N$  le temps de relaxation en s,  $\tau_0$  le temps de relaxation limite de l'ordre de  $10^{-9}$  s,  $k_B$  la constante de Boltzmann (J/K),  $E_A$  l'énergie d'activation (J) et  $T$  la température (K))

Pour des temps de mesure  $\tau_m < \tau_N$ , les moments magnétiques n'ont pas le temps de se retourner spontanément durant cette période et le moment magnétique de la particule apparaît bloqué (particule ferromagnétique). A l'inverse si  $\tau_m > \tau_N$ , plusieurs fluctuations des moments magnétiques peuvent avoir lieu au cours de ce temps de mesure. La somme de ces moments mesurés (aimantation moyenne) apparaît nulle. C'est le superparamagnétisme. Pour pouvoir observer ce comportement, il faut dépasser une énergie d'activation et plus précisément une température dite température de blocage  $T_B$  :

$$T_B = \frac{E_A}{\ln\left(\frac{\tau_m}{\tau_0}\right)k_B} \quad \text{Eq. 10}$$

\* Energie d'anisotropie magnétocristalline ( $E_K$ ) : énergie qui tend à imposer un alignement préférentiel des moments magnétiques du matériau selon certaines directions cristallographiques préférentielles.

En résumé, à cette température, le temps de relaxation est égal au temps de mesure. Au-delà de cette température, la nanoparticule (monodomaine) se trouve dans un état superparamagnétique lorsque le temps de relaxation est plus court que le temps de mesure (Figure 20 et Figure 21). En dessous de cette température, aucun changement (énergie insuffisante) de direction de macrospin n'est possible. Le moment magnétique est bloqué selon l'axe de facile aimantation.

D'autres températures propres au matériau telles que la température de Curie par exemple sont définies. La température de Curie supérieure à  $T_B$  caractérise la transition superparamagnétisme-paramagnétisme (Figure 21). A cette température, le matériau perd son aimantation spontanée (état désordonné) mais l'état reste réversible.

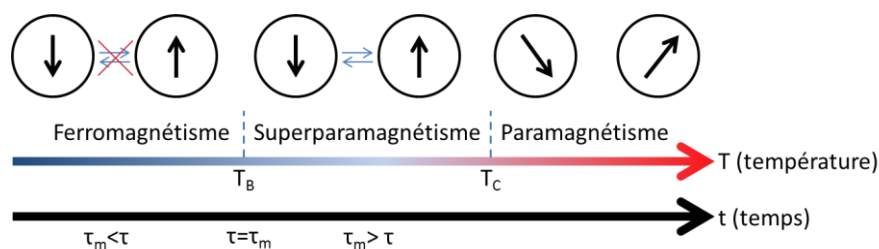


Figure 21 : Evolution de l'état magnétique des nanoparticules en fonction de la température ( $T_B$  : température de blocage,  $T_C$  : température de Curie) et  $\tau$  (temps de relaxation) (inspirée de Lacroix)<sup>127</sup>

Cependant, les distributions en taille des nanoparticules (notamment larges), l'état d'agglomération des grains, l'anisotropie plus ou moins importante de la surface des nanoparticules (entraînant une coercivité importante) ou encore les défauts d'alignements appelés « canting de spin » peuvent modifier les temps de relaxation et par conséquent les températures de blocage des particules.

### 1.3.4 Les principaux paramètres physico-chimiques influençant les propriétés magnétiques

Afin d'estimer et connaître la température de blocage des matériaux, l'aimantation à saturation et la taille des domaines magnétiques des échantillons (taille des domaines magnétiques, distribution en taille...), des mesures Zero Field Cooled (ZFC), Field Cooled (FC) et d'aimantation sont nécessaires (description des techniques en Annexe 4). Plusieurs grandeurs liées aux particules sont à considérer dans les courbes ZFC/FC et d'aimantation : la valeur d'aimantation à saturation (plus faible pour les nanoparticules que pour les matériaux massifs) et la température de blocage ( $T_B$ ).

Une réduction de la taille des grains, une anisotropie de surface importante, une oxydation partielle des nanoparticules, une modification de la forme des nanoparticules ou une interaction ligand-surface des nanoparticules mènent à des modifications des propriétés et des phénomènes magnétiques comme le spin canting ou le spin glass.<sup>130, 132-134</sup>

#### 1.3.4.1 Spin canting

La faible coordination des atomes de surface par rapport aux atomes de volume induit un déséquilibre énergétique qui peut être compensé en créant des lacunes ou des relaxations structurales.<sup>135,</sup>

<sup>136</sup> L'ordre magnétique est modifié et des interactions entre les spins associés apparaissent pour assurer l'équilibre énergétique : c'est le phénomène de spin canting. Il résulte d'un couplage non colinéaire des spins à la surface des nanoparticules.<sup>136</sup> Ils décrivent un angle faible autour de leur axe (Figure 22-a). Il caractérise donc un défaut d'alignement des spins par rapport à la direction globale de la nanoparticule et entraîne une diminution de l'aimantation à saturation.<sup>136</sup> Ce phénomène peut être assimilé à un modèle de type « cœur coquille » où les effets s'appliquent principalement au niveau de la surface des particules. Ces effets de surface deviennent plus faciles à observer à faible température.<sup>132</sup> Cette couche en surface est aussi induite par des défauts et/ou encore des spin canting de volume.<sup>137</sup> Ce phénomène est souvent observé lorsque la surface des nanoparticules est recouverte d'agents organiques qui influent énormément sur les propriétés magnétiques (Figure 22-b) (§ 1.3.4.4).<sup>138, 139</sup>

### 1.3.4.2 Spin glass

D'autres phénomènes tels que le spin-glass sont aussi décrits. Il résulte d'un désordre magnétique 3D où les spins magnétiques ne sont pas alignés selon un motif régulier.<sup>140</sup> Son origine peut être induite par l'existence de rupture de symétrie de translation de la maille.<sup>141</sup> Le terme glass fait analogie au verre qui est un matériau amorphe. Ce phénomène induit des interactions et distorsions dans l'arrangement des liaisons atomiques. Tout comme le verre (matériau bloqué dans un état métastable de basse énergie), le spin-glass se trouve lui aussi bloqué dans un état métastable de faible énergie (Figure 22-c).<sup>132</sup>

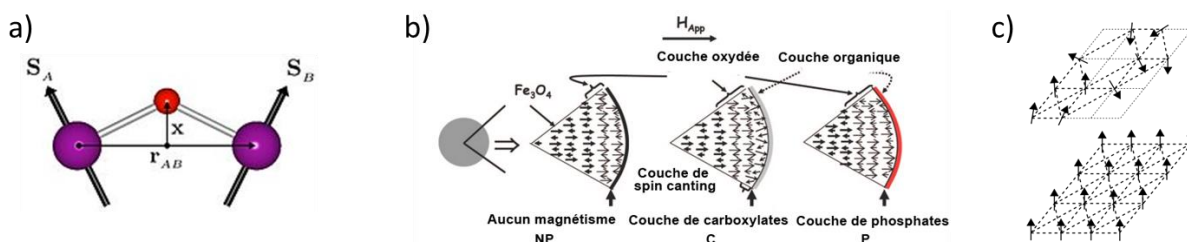


Figure 22 : a) Effet de spin canting de deux spins  $S_A$  et  $S_B$  séparés par une distance  $r_{AB}$ ,<sup>142</sup> b) Effet des couches organiques sur les spins<sup>139</sup> et c) Effet de spin-glass<sup>143</sup>

### 1.3.4.3 Influence de la taille des nanoparticules

La forme et la taille réduite des particules d'oxydes de fer accentuent ces phénomènes à la surface des nanoparticules. L'allure de la courbe d'aimantation  $M(H)$  peut être la même selon certaines études pour différentes formes de particules.<sup>144-146</sup> Les atomes se réarrangent et induisent des effets de spins canting et spin-glass-like : les valeurs d'aimantations  $M_s$  sont alors plus faibles que celles observées dans les matériaux massifs.<sup>147</sup> D'autres études relatent que l'aimantation varie en fonction de la taille moyenne des nanoparticules. Lorsque celle-ci diminue, l'aimantation suit la même tendance.<sup>148</sup> Cette observation est attribuée à un effet de spin canting qui augmente quand la taille des nanoparticules diminue.<sup>133</sup> Une oxydation de la surface des particules souvent associée à une diminution de la taille joue également un rôle majeur (Figure 23).<sup>137</sup>

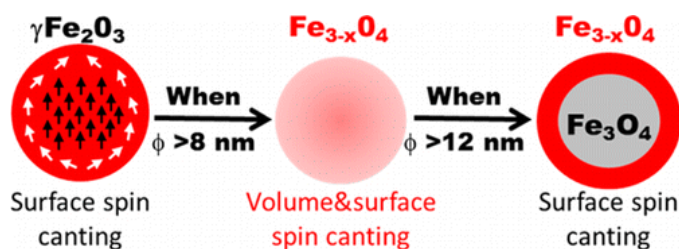


Figure 23 : Evolution du spin canting en fonction de la taille des nanoparticules et de leur degré d'oxydation<sup>137</sup>

Cependant, ces modifications magnétiques sont liées également en partie à la présence de molécules organiques à la surface des grains.

#### 1.3.4.4 Influence des ligands

Le ligand joue lui aussi un rôle important dans ces effets de spin canting de surface (Figure 24). Cet effet a été mis en évidence notamment par des procédures d'échanges de ligands qui consistent à remplacer les groupements chimiques par d'autres comme des carboxylates par des phosphonates ou des catéchols. Ces derniers tendent à réaligner les spins à la surface des particules (Figure 24).<sup>139, 149</sup> Les groupements carboxylates ont tendance quant à eux à provoquer un phénomène de spin canting sur la couche oxydée réduisant ainsi l'aimantation à saturation alors que les groupements phosphonates ne modifient pas la structure magnétique de la surface du matériau quand ils sont liés de manière covalente. L'anisotropie magnétique de surface se retrouve diminuée et l'aimantation à saturation  $M_S$  augmentée dans ce cas (Figure 22).<sup>139</sup>

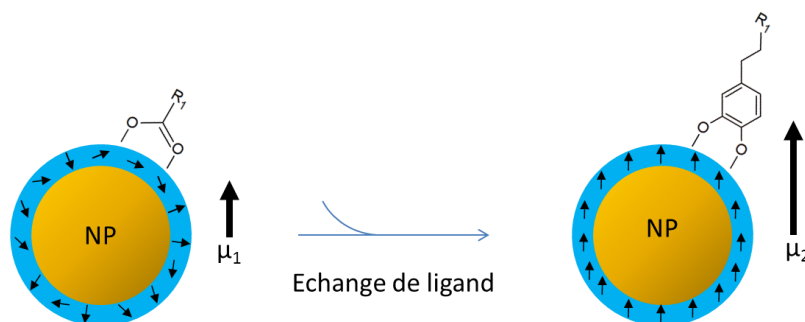


Figure 24 : Variation du moment magnétique  $\mu$  des nanoparticules lors d'un échange de ligand ( $\mu_1 < \mu_2$ ) (inspirée de Basti *et al.*)<sup>138</sup>

En plus de montrer une variation de  $M_S$ , une augmentation de la température de blocage est observée et cela malgré le fait que l'état d'oxydation et la taille restent constants.<sup>149</sup> Plusieurs études ont tenté de mettre en évidence ces variations de propriétés magnétiques en fonction des ligands employés au cours des synthèses. En effet, des particules modifiées en surface par des alkyl-phosphonates et -sulfonates présentent des valeurs de  $M_S$  de l'ordre de 5-13  $\text{emu.g}^{-1}$  et des températures de blocage de l'ordre de 110-120 K alors que des particules recouvertes d'alcool et de carboxylates possèdent des valeurs de  $M_S$  comprises entre 55-85  $\text{emu.g}^{-1}$  avec une température de blocage de 255-280 K.<sup>147</sup> D'autres molécules telles que des oléates ou octylamine sont étudiées et donnent des valeurs d'aimantation à saturation proches des précédentes (carboxylates et alcools).<sup>150, 151</sup> En effet, à partir de synthèses par décomposition thermique (en présence d'acide oléique et triocylamine), des particules de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  ont montré des valeurs d'aimantation à saturation variant de 36  $\text{emu.g}^{-1}$  à 94  $\text{emu.g}^{-1}$  lorsque la taille des



nanoparticules passe de 5 nm à 22 nm.<sup>150</sup> De même, des particules de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  préparées par synthèse solvothermale montrent des valeurs de  $M_s$  passant de 38,9 à 68,7  $\text{emu.g}^{-1}$  en présence d'ocytalamine.<sup>151</sup> Plusieurs suppositions ont été faites pour expliquer ces variations. Une étude suggère qu'il pourrait s'agir d'une forte interaction des groupements d'accroches des molécules organiques avec les orbitales d du fer conduisant ainsi à une séparation des orbitales  $t_{2g}$  et  $e_g$ .<sup>152</sup> Une autre étude suggère qu'un taux de recouvrement important et un effet antioxydant des molécules organiques sur la surface des nanoparticules favoriseraient cette augmentation de  $M_s$ .<sup>139, 153</sup> Les liaisons covalentes établies entre la surface de la nanoparticule et l'acide oléique engendrent, par exemple, un désordre de spin de surface dû à un réarrangement octaédrique des atomes de fer à la surface.<sup>138</sup>

Dans certains cas, un champ magnétique plus important peut être requis pour aligner les moments magnétiques quand les particules ont une structure « cœur-coquille ». Ce phénomène est observé quand l'épaisseur de la couche organique est importante. Ces couches peuvent contribuer au désordre magnétique.<sup>154</sup>

### 1.3.4.5 Influence de la distribution en tailles des nanoparticules

Une distribution large en taille des nanoparticules entraîne une distribution en température de blocage.<sup>131, 155-157</sup> L'établissement d'une température de blocage moyenne pour s'approcher au maximum de la taille moyenne de l'échantillon peut être utile.<sup>156</sup> Enfin, un décalage des maximums des courbes ZFC/FC traduit aussi l'existence d'une distribution en taille. Cet écart sera d'autant plus important et éloigné de la température de blocage que la distribution en volume est importante (Figure 25).<sup>131, 157</sup>

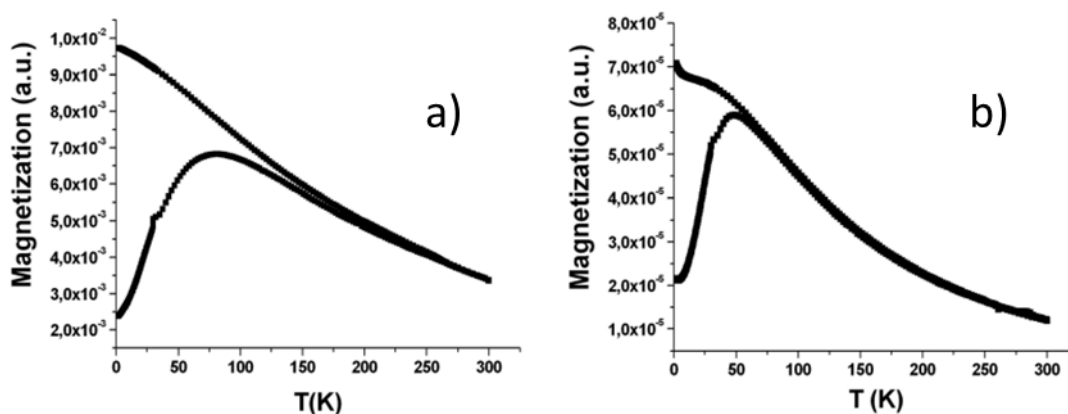


Figure 25 : Courbes d'aimantation ZFC/FC à 50 Oe de nanoparticules d'oxydes de fer modifiées par des polyamidoamines présentant une distribution en taille a) large et b) étroite<sup>157</sup>

### 1.3.4.6 Influence de l'état d'agglomération des nanoparticules

D'autres résultats indiquent une dépendance de  $T_B$  en fonction de l'état d'agglomération de l'échantillon. Dormann *et al.*<sup>158</sup> ont montré un déplacement de la température de blocage en fonction de l'état d'agglomération des nanoparticules. Plus cet état d'agglomération est important, plus la température de blocage augmente. Enfin, quand les particules forment des petits agglomérats (quelques nanoparticules seulement), l'aimantation est diminuée à cause des interactions dipolaires.<sup>154</sup>

### 1.3.4.7 Influence du champ magnétique appliqué sur la température de blocage

La température de blocage dépend aussi du champ magnétique appliqué durant les mesures ZFC/FC. Dans la littérature, des champs allant de 5 à 500 Oe sont utilisés. Il a été démontré théoriquement et expérimentalement, que les variations dans les mesures de  $T_B$  sont moins importantes quand les champs appliqués sont supérieurs à 200 Oe.<sup>159, 160</sup> Les barrières d'énergie efficace pour réorienter les spins sont abaissées lorsque les champs appliqués sont plus puissants.<sup>160</sup> Ce phénomène est induit par des interactions entre les particules (dipôle-dipôle).

### 1.3.5 Avantages de la magnétite

Au vu des caractéristiques et nombreux paramètres évoqués précédemment, il est préférable de synthétiser uniquement de la magnétite de taille nanométrique pour une application en IRM en raison de son aimantation magnétique élevée ( $M_{S(\text{Magnétite})} = 92\text{-}100 \text{ A.m}^2/\text{kg}$  et  $M_S (\text{Maghémite}) = 60\text{-}80 \text{ A.m}^2/\text{kg}$  à  $T = 300\text{K}$ ).<sup>25</sup> La magnétite et la maghémite possèdent une susceptibilité bien supérieure aux agents paramagnétiques et, pour les particules de taille inférieure à 20nm, aucune aimantation rémanente en absence de champ magnétique extérieur n'existe. En effet, la présence de milliers d'ions fer ( $\text{Fe}^{2+}$  et/ou  $\text{Fe}^{3+}$ ) dans une seule nanoparticule en comparaison à un unique ion  $\text{Gd(III)}$  utilisé comme agent paramagnétique, conduit, inévitablement à une susceptibilité magnétique plus importante. Les agents superparamagnétiques sont en mesure de répondre aux problèmes rencontrés avec les agents paramagnétiques classiques utilisés en IRM notamment (faible contraste, concentration...)<sup>161</sup>

## 1.4 Les applications biologiques envisageables des nanoparticules d'oxydes de fer superparamagnétiques

Les nanoparticules d'oxydes de fer magnétiques sont aujourd'hui utilisées notamment en IRM grâce à leur comportement magnétique et leur temps de circulation long offert par la modification de leur surface. Des agents commerciaux existent.<sup>162</sup> Ces oxydes de fer sont aussi employés dans d'autres techniques d'imageries comme en imagerie nucléaire.

### 1.4.1 L'IRM et ses agents de contraste

L'IRM est une technique d'imagerie utilisée quotidiennement en milieu clinique et basée sur le principe de la RMN (Résonance Magnétique Nucléaire) et plus précisément sur la relaxation magnétique des spins nucléaires (moments magnétiques) des protons des molécules d'eau abondamment présents dans le corps humain. Un aimant supraconducteur\* va générer un champ magnétique puissant qui influence les ions hydrogène. Sous l'action de champs magnétiques oscillants (dits radiofréquences), les spins nucléaires sont perturbés. Un phénomène de précession (rotation des spins) se produit et un signal électromagnétique est généré puis mesuré.

---

\* Supraconducteur : matériau ne présentant aucune résistance électrique

Aujourd’hui très utilisée (environ 75 millions d’examen dans le monde), l’IRM a l’avantage d’être non invasive, non radioactive et d’avoir une très bonne résolution spatiale.<sup>163</sup> Dans certains cas, afin d’améliorer le contraste de certaines images (régions difficiles à visualiser) et le temps d’acquisition (et donc le temps d’examen), il est utile d’avoir recours à des agents de contrastes comme les complexes paramagnétiques d’ions gadolinium Gd(III) ou des agents à base d’oxydes de fer<sup>164, 165</sup> pour augmenter les vitesses de relaxation magnétiques des protons ( $1/T_1$  et  $1/T_2$ ) de l’eau (§ 1.4.1.2). La mesure ne s’effectue pas sur l’agent lui-même mais sur l’effet qu’il donne à son entourage (molécules d’eau). Son principe est expliqué dans le paragraphe suivant.

### 1.4.1.1 Principe de l’IRM

Sous un champ magnétique externe donné ( $B_0$ ), les spins nucléaires des protons s’alignent avec le champ conduisant à une aimantation nucléaire  $M_0$ . Les moments magnétiques décrivent alors un angle de  $54,7^\circ$  par rapport à la direction de  $B_0$  et s’orientent selon deux sens opposés (spin parallèle et anti parallèle). Le sens parallèle étant plus stable, un excès de spin parallèle est retrouvé. Les protons tous dirigés dans la même direction ne sont toujours pas synchrones. Ils se retrouvent déphasés : ils ne tournent pas tous ensemble. Pour corriger cet état, une énergie sous forme d’onde radiofréquence identique à la fréquence de rotation des protons excités est appliquée dans le but de leur apporter suffisamment d’énergie pour qu’ils s’alignent tous en phase. Ainsi, une impulsion  $B_1$  de radiofréquence transversale est appliquée perpendiculairement au plan ( $B_0$ ) et les spins nucléaires se retrouvent déséquilibrés (la direction de leur axe magnétique est différente de celui de l’aimant). Une fois l’impulsion stoppée, les spins nucléaires reviennent graduellement à leur état d’équilibre, c’est-à-dire parallèle à ( $B_0$ ). Le retour à l’équilibre se fait *via* deux types de relaxation différents : la relaxation longitudinale ( $T_1$ ) et transversale ( $T_2$ ) qui correspondent respectivement aux agents  $T_1$  et  $T_2$  (Figure 26). Une fois le retour à l’équilibre atteint, une énergie électromagnétique restituée par les protons et sous la forme d’une onde est mesurable avec une antenne.

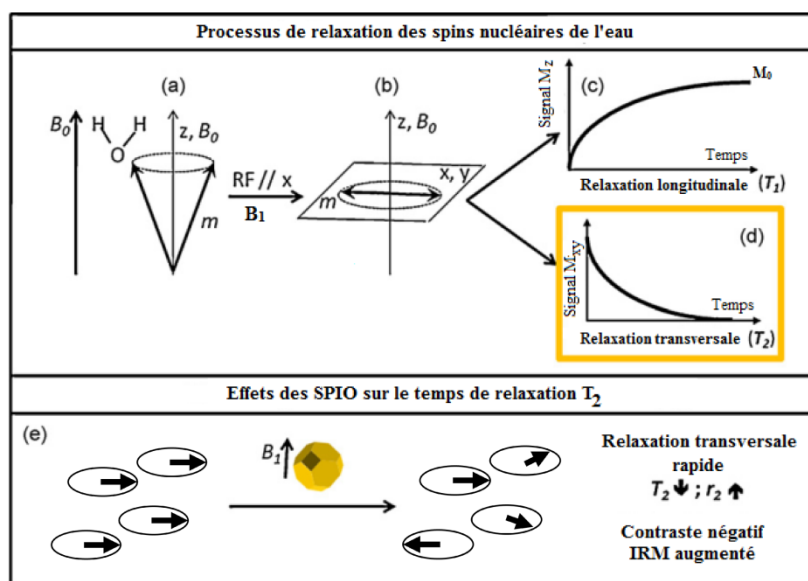


Figure 26 : Illustration des champs magnétiques en IRM (inspirée de Figuerola *et al.*)<sup>166</sup>

#### 1.4.1.1.1 Temps de relaxation longitudinale $T_1$

Lors de l'application de l'impulsion de radiofréquence  $B_1$  orientée à  $90^\circ$  par rapport à  $B_0$ , la composante  $M_z$  (dirigée selon l'axe z ou  $B_0$ ) de l'aimantation est nulle et la composante  $M_{xy}$  (aimantation dans le plan perpendiculaire à  $B_0$ ) est maximale (Figure 26). Après l'arrêt de cette impulsion  $B_1$ , l'aimantation longitudinale  $M_z$  augmente jusqu'à atteindre la valeur  $M_0$ .  $T_1$  est défini alors comme le temps de relaxation longitudinale, c'est-à-dire le temps que la composante  $M_z$  met pour atteindre 63% de sa valeur maximale. Le retour de  $M_z$  à sa valeur initiale suit une loi exponentielle :

$$M_z(t) = M_0 \left(1 - e^{-\frac{t}{T_1}}\right) \quad \text{Eq. 11}$$

#### 1.4.1.1.2 Temps de relaxation transversale $T_2$

A l'inverse, directement après l'arrêt de  $B_1$ , l'aimantation transversale  $M_{xy}$  est maximale et les spins sont en phase (Figure 26). Il s'en suit alors une diminution de cette valeur. Le retour de  $M_{xy}$  vers zéro suit alors une loi exponentielle :

$$M_{xy}(t) = M_0 e^{-\frac{t}{T_2}} \quad \text{Eq. 12}$$

$T_2$  est défini comme le temps de relaxation transversale ou « spin-spin », c'est-à-dire le temps au bout duquel  $M_{xy}$  diminue jusqu'à 37% de sa valeur initiale. Cette décroissance est généralement plus rapide que le retour à l'équilibre de la composante longitudinale. Cette relaxation transversale provient de la désynchronisation des aimantations élémentaires dans leur mouvement autour du champ magnétique  $B_0$ . Elle est liée aux interactions entre les aimantations nucléaires de noyaux voisins. Elles sont à l'origine de modifications locales du champ magnétique et sont donc responsables de ces déphasages conduisant à la diminution et à la disparition de la composante transversale. Par ailleurs, les inhomogénéités du champ magnétique extérieur provenant de l'appareil IRM lui-même ou du corps du patient mènent à un déphasage supplémentaire et à une chute rapide de  $M_{xy}$  avec une constante de temps  $T_2$ .

Le degré de performance des agents  $T_2$  dépend fortement de la taille moyenne des nanoparticules (notamment taille hydrodynamique), de la distribution en taille et de la composition chimique.<sup>167-169</sup> La taille hydrodynamique joue un rôle important. En effet, les distributions en taille des nanoparticules de maghémite sont rarement homogènes dans les tissus ou cellules, ce qui conduit à des agglomérations. Cette taille d'agglomérat induite par ces différents milieux influence les relaxivités  $r_2$  (vitesse de relaxation transversale normalisée par la concentration de l'agent IRM) : elle augmente au début de l'agglomération jusqu'à une valeur maximale puis diminue.<sup>169</sup>

#### 1.4.1.1.3 Relaxivité $r_1$ et $r_2$

Pour définir l'efficacité d'un agent de contraste IRM, deux grandeurs sont utilisées : la relaxivité  $r_1$  et  $r_2$  en  $L \cdot mmol^{-1} \cdot s^{-1}$ . Elles sont reliées respectivement au temps de relaxation  $T_1$  et  $T_2$ . Plus précisément, elles sont déterminées à partir de la relaxation longitudinale ( $R_1=1/T_1$  en  $s^{-1}$ ) et transversale ( $R_2=1/T_2$  en  $s^{-1}$ ) par les relations suivantes :

$$R_2 = r_2 \times C + R_2^0 \quad \text{Eq. 13}$$

$$R_1 = r_1 \times C + R_1^0 \quad \text{Eq. 14}$$

(avec respectivement  $R_1$  ( $s^{-1}$ ) et  $R_2$  ( $s^{-1}$ ) la relaxation longitudinale et transverse,  $R_1^0$  et  $R_2^0$  la relaxation longitudinale et transverse en l'absence des agents d'oxydes de fer et  $C$  la concentration en fer ( $mmol.L^{-1}$ )

Cette relaxivité reflète la manière dont les taux de relaxation varient en fonction de la concentration en agent de contraste (Annexe 13).

#### 1.4.1.1.4 Contrastes en IRM

Les agents de contraste IRM sont utilisés en vue de modifier le champ magnétique local et ainsi influencer les propriétés de résonance des tissus. Les contrastes en IRM sont principalement déterminés par trois caractéristiques : la densité de protons et les temps  $T_1$  et  $T_2$  des tissus. Alors que la densité de protons est fonction de la nature chimique et physique des tissus, l'utilisation d'agents de contraste peut favorablement améliorer à la fois les contrastes  $T_1$  et  $T_2$ . Généralement, il est préférable d'avoir un temps de relaxation court car cela améliore les différences d'intensité du signal et donne un meilleur contraste sur les images. Dans les images pondérées en  $T_1$ , l'intensité du signal repose sur la vitesse de retour de  $M_z$ . Après un temps donné  $\tau$  suivant l'excitation des protons,  $M_z$  revient à une valeur  $M_z'$  si aucun agent de contraste n'est appliqué. En présence d'un agent paramagnétique, l'excédent d'énergie des protons est relâché plus efficacement et par conséquent l'aimantation sera plus importante  $M_z''$  ( $M_z'' > M_z'$ ). Il en résulte une amélioration du signal  $T_1$ , conduisant à un contraste positif plus brillant sur l'image obtenue. Les gammes de pondération entre les images  $T_1$  et  $T_2$  sont différentes (Tableau 2).

Types d'organes	Gamme de pondération $T_1$	Gamme de pondération $T_2$
Graisse	Blanc (hypersignal)	Gris Clair
Tissus	Gris	Gris
Eau	Noir-Gris	Blanc (hypersignal)
Air / Os compact	Noir (hyposignal)	Noir (hyposignal)

Tableau 2 : Contrastes IRM de différents organes en images pondérées  $T_1$  et  $T_2$

Concernant les images pondérées en  $T_2$ , l'intensité du signal repose sur la diminution de  $M_{xy}$ . Ainsi en présence d'agents de contraste IRM et après un temps donné  $\tau$  ( $M_{xy}' < M_{xy}''$ ), il en résulte un assombrissement de l'image comparé au cas où l'agent de contraste est absent.

#### 1.4.1.2 Les agents de contraste en IRM

Différents agents de contraste utilisés en IRM ont été développés selon deux catégories. La première concerne les agents paramagnétiques (chélates ayant un centre paramagnétique) et les agents superparamagnétiques à base d'oxydes de fer sous forme nanométrique. Pour mesurer l'efficacité de ces agents, la relaxivité  $r_1$  ou  $r_2$  exprimée en  $L.mM^{-1}.s^{-1}$  est utilisée respectivement pour les temps de relaxation  $T_1$  ou  $T_2$ .

##### 1.4.1.2.1 Les agents paramagnétiques

Les agents paramagnétiques les plus utilisés sont principalement constitués de gadolinium(III) ( $Gd^{3+}$ ) appartenant à la famille des lanthanides. De nombreux agents de contraste à base de gadolinium

ont été développés et commercialisés après l'aval des autorités de santé européennes et américaines (Tableau 3).<sup>170</sup> Ces agents sont dits de première génération et leur efficacité est déterminée à partir de la relaxivité  $r_1$  ou  $r_2$  en fonction de l'agent employé ( $T_1$  ou  $T_2$ ).

Biodistribution	Nom	Laboratoire	$r_1$ (L.mmol <sup>-1</sup> .s <sup>-1</sup> )
Extracellulaire	Dotarem®	Guerbet	4,2
	Prohance®	Bracco	4,4
	Gadovist®	BayerSchering	5,3
	Magnevist®	BayerShering	4,3
	Omniscan®	Amersham	4,6
	OptiMark®	Mallinckrodt	5,6
Hépatobiliaire /Extracellulaire	Multihance®	Bracco	6,7
Hépatobiliaire	Primovist®	BayerSchering	7,3
Vasculaire	Vasovist®	EPIX/Shering	19

Tableau 3 : Principaux agents de contraste commerciaux et leur relaxivité à 20 MHz ( $r_1$  : relaxivité)<sup>170</sup>

#### 1.4.1.2.2 Modifications chimiques des agents $T_1$

Sous forme libre (ions Gd seuls), ces ions ne peuvent pas être injectés par voie intraveineuse car ils sont toxiques. Par exemple, ils interagissent dans certains cas avec le système physiologique comme le Système RéticuloEndothélial (SRE)\* en se substituant au calcium  $Ca^{2+}$  très largement présent dans le corps humain (son rayon ionique est proche de celui du calcium(II) (114 pm pour le calcium(II) et 107.8 pm pour le gadolinium(III)). Il diminue la vitesse d'assimilation du calcium par le système tout en inhibant l'activité de certaines enzymes ( $Ca^{2+}/Mg^{2+}$ -ATPase).<sup>171, 172</sup> Pour réduire et éviter ces risques, des ligands de type organique tels que des polyamino-carboxylates macrocycliques (DOTA) ou des polyamino-carboxylates acycliques (DTPA) ont été développés. Ils ont pour rôle de complexer le  $Gd^{3+}$  de manière très stable. Le métal est relié à huit atomes donneurs (Figure 27).

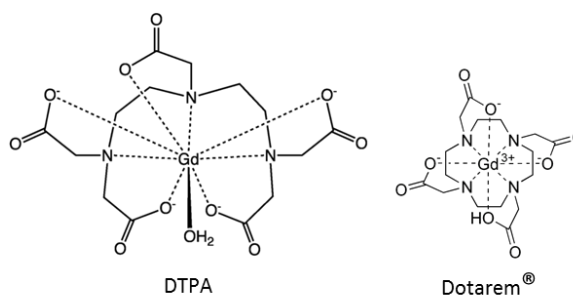


Figure 27 : Agents de contraste à base de gadolinium tels que le DOTAREM® et le MAGNEVIST®<sup>173</sup>

Ces agents ont aussi des inconvénients. Ils diffusent rapidement dans le milieu extracellulaire (temps de demi-vie plasmatique se situant aux alentours de 90 min) et des cas de dermopathies fibrosantes néphrogéniques (NFD)<sup>†</sup> ont été observés.<sup>174, 175</sup> Ces cas sont généralement observés chez des

\* SRE : groupes de cellules (macrophages, cellules réticulaires provenant de la rate ou encore des ganglions lymphatiques et cellules endothéliales présentes dans la rate, le foie et la moelle osseuse) impliqués dans l'élimination des éléments pathogènes (indésirables) à l'organisme

† NFD : formation de plaques sur la peau au niveau des extrémités des membres (jambes, avant-bras) accompagnée de fibrose (destruction substantielle des tissus ou transformation de certains tissus en un tissu composé de fibres)

patients souffrant d'insuffisance rénale. Aussi, des phénomènes de transmétallation\* et de libération du gadolinium(III) par son chélate provoquent des maladies rénales.<sup>171, 173</sup> Pour pallier à ce problème, de nouveaux travaux de recherche sont portés sur le remplacement du gadolinium par d'autres métaux comme le manganèse  $Mn^{2+}$  (élément biogène) et sur la recherche de chélates assurant une complexation stable.<sup>176</sup>

#### 1.4.1.2.3 Les agents superparamagnétiques $T_2$

De nombreux paramètres tels que la taille hydrodynamique, la fonctionnalisation et le mode d'administration régissent la biodistribution des agents commerciaux  $T_2$  (Tableau 4). Quand leur taille hydrodynamique diminue, les nanoparticules sont éliminées plus lentement par les défenses immunitaires. Plus ce temps est long, plus l'effet EPR (Enhanced Permeability and Retention effect)<sup>†</sup> est important et plus l'accumulation des nanoparticules dans les tissus cancéreux sera importante. L'hyper-vascularisation accompagnant les tumeurs, la perméabilité plus grande des parois des vaisseaux sanguins dégradées en leur sein mais aussi les canaux lymphatiques peu reliés aux tumeurs décrivent ce phénomène.<sup>177</sup>

Nom commercial (Europe)	Lab.	Diamètre hydrodynamique (nm)	Couche organique	Type de particules	Biodistribution	$r_2$ ( $L \cdot mmol^{-1} \cdot s^{-1}$ )
Feridex	Guerbet	120-180	Dextran	SPIONs	Foie	111 à $4,7T^{178}/148$ à $3,0T^{17,162}$
Lumirem®	Guerbet	300 nm (composé de cristaux de 10 nm)	Siloxane	SPIONs	Gastro-intestinale	$3,8^{162,170}$ (champ non déterminé)
Cliavist™‡	Schering	60	Dextran	SPIONs	Foie	$197^{162,170}/189$ à $1,5T^{179}$
Clariscan™	GE-Healthcare	20 nm (cristaux de 5-7 nm)	Carbohydate PEG	USPIO	Ganglion lymphatique, foie, angiographie	n.d <sup>162</sup>
Combidex®	Guerbet	20-40 nm	Dextran	USPIO	Ganglion lymphatique, foie, angiographie	65 à $1,5T^{162,179}$
Supravist™	Schering	21 nm	Carboxy-dextran	USPIO	Sang	38 à $1,5T^{162,179}$

Tableau 4 : Agent de contraste SPIONs (SuperParamagnetic Iron Oxide Nanoparticles) sur le marché (Lab. : laboratoire)

Les agents superparamagnétiques  $T_2$  sont classés selon trois catégories définies par leur taille hydrodynamique (elle comprend la particule inorganique en elle-même mais aussi toute la structure organique organisée à la surface de l'oxyde de fer) :

\* Transmétallation : processus d'échanges de cations métalliques au sein d'agent chélatant

† EPR : certaines particules ou molécules en raison de leur faible taille (inférieur à 200 nm) s'accumulent préférentiellement dans les tissus tumoraux en raison d'un effet de perméabilité et de rétention accrus

‡ Cliavist™: aussi appelé Resovist®

- Les SPIONs (SuperParamagnetic Iron Oxide Nanoparticles), les plus courants, ont un diamètre hydrodynamique supérieur à 40 nm.<sup>169</sup> Ils peuvent être à l'état de monograins ou à l'état de petits agglomérats. Ils sont administrés par voie intraveineuse ou orale si la taille dépasse 150 nm.<sup>170</sup> Ces nanoparticules sont captées spécifiquement par le Système Phagocytaire Mononucléé (SPM)\*. La plupart sur le marché ont une taille comprise entre 60 nm et 300 nm : par exemple, Endorem® (retiré en juin 2012 du marché), Lumirem® (modifiés en surface par des siloxanes) et Cliavist™ (modifiés en surface par du dextran et production abandonnée en 2009) (Tableau 4). Ils sont rapidement assimilés par le SRE et s'accumulent donc dans le foie et la rate (organes chargés de la purification du sang). Cette forte accumulation dans ces deux organes fait que les SPIONs sont largement employés dans la détection de lésions et tumeurs du foie.<sup>180</sup> Mais leur temps de demi-vie plasmatique (de quelques minutes à quelques heures) empêche leurs utilisations dans le ciblage spécifique de tissus tumoraux.<sup>181</sup> C'est pour cette raison qu'une biofonctionnalisation par des anticorps et des peptides est nécessaire pour garantir une forte accumulation dans les régions malades grâce un temps de séjour suffisamment long.<sup>16, 178</sup>
- Les USPIO (Ultrasmall SuperParamagnetic Iron Oxide) de taille bien inférieure aux SPIONs (diamètre hydrodynamique inférieur à 40-50 nm) ne s'accumulent pas dans le SRE car ils ne sont pas assimilés rapidement et massivement par les macrophages du SPM. Leur temps de circulation sanguin est par conséquent prolongé après une administration par voie intraveineuse.<sup>182, 162</sup> Ces particules font aussi l'objet de modification de surface (PEG, anticorps...). Ils ont montré des améliorations sur le temps de relaxation T<sub>2</sub> et de très bons résultats dans la détection de maladie de types dégénératives ou inflammatoires associés à la diffusion des macrophages. Ils sont aussi employés par exemple dans la détection de métastase dans les nœuds lymphatiques ou d'athérosclérose†.<sup>183</sup> De même, certains agents à base d'oxyde de fer sont retirés du marché. Par exemple, le Combidex® est retiré par Guerbet en 2007 et le développement du Clariscan™ est actuellement stoppé. D'autres agents sont en cours de développement comme le Supravist™ (développé par Bayer Shering Pharma AG) pour le diagnostic vasculaire (angiographie par résonance magnétique ou en anglais Magnetic Resonance Angiography (MRA)).<sup>184</sup>
- Les MPIO (Micron-sized Paramagnetic Iron-Oxide Particles) sont des particules ayant des tailles de l'ordre du µm, proche de celles des globules rouges (de l'ordre de 1,6 µm).<sup>161, 185</sup> De nombreux avantages leurs sont attribués. Leur quantité en fer est plus importante que celle contenue dans les USPIO. Ils émettent un champ magnétique homogène rendant leur détection (contraste visible) possible sur une distance supérieure à 50 fois leur diamètre et une fois dans l'endothélium, ils restent dans le milieu intravasculaire.<sup>161</sup> Ces agents ont été fonctionnalisés par du tosyl sur lesquels sont greffés des anticorps. Ils sont par exemple employés comme agents de contraste en IRM pour la détection de molécules d'adhésion endothéliales chez la souris.<sup>161, 186</sup> Compte tenu de la taille importante de ces nanoparticules, il serait intéressant de s'intéresser à leur stabilité.

---

\* SPM : groupe de cellules répandu dans l'organisme impliqué dans une activité immunitaire et dans la phagocytose

† Athérosclérose : l'accumulation de corps gras favorise l'apparition d'une pathologie (sclérose) qui conduit à la perte de l'élasticité des artères



La taille hydrodynamique des particules est un facteur clé dans le processus de circulation des nanoparticules. En effet, des tailles supérieures à 200 nm entraînent une réponse rapide des phagocytes de la rate, les nanoparticules sont alors piégées par le système réticuloendothélial. A l'inverse, des particules de taille hydrodynamique inférieures à 10 nm entraînent une élimination rapide de ces nanoparticules par les reins.<sup>24, 187</sup> Elles se retrouvent principalement dans ces organes car ils sont responsables de la purification du sang. La nature des agents se trouvant à la surface des nanoparticules influence fortement la manière dont le système immunitaire réagit face à ces dernières. Selon la charge des nanoparticules (chargées négativement ou positivement), certaines protéines peuvent s'adsorber spécifiquement sur la surface des nanoparticules.<sup>173</sup> Il est préférable de travailler avec des nanoparticules ayant une charge neutre (offerte par la présence de PEG) car l'internalisation dans le SRE est plus lente avec une faible quantité de nanoparticules dans le foie.<sup>18, 188</sup> Il est donc important de combiner une taille entre 10 et 200 nm et des particules de charge neutre afin d'éviter l'opsonisation\* et les réponses immunologiques menant à la phagocytose des nanoparticules.<sup>11</sup> Cela augmente leur furtivité et leur temps de circulation.

Les nanoparticules doivent donc répondre à des critères stricts : particules stables en suspension, biocompatibles et elles doivent posséder une aimantation élevée. La taille ne doit pas être trop importante, sinon les nanoparticules sont piégées par le SRE ni trop faible pour éviter une élimination rénale trop rapide, le tout dans des conditions physiologiques.

#### 1.4.1.2.4 Intérêt des agents T<sub>2</sub>

Les nanoparticules d'oxydes de fer représentent un vrai intérêt comme agent de contraste T<sub>2</sub>. En effet, le fer n'est pas totalement étranger à notre organisme car celui-ci contient en naturellement. De plus, les oxydes de fer modifiés sont connus pour être stables et non toxiques à des doses modérées (concentration en oxydes de fer inférieure à 100 µg/mL).<sup>189</sup>

Par exemple, en ajoutant une biomolécule cible avec l'agent de contraste IRM, il est possible de cibler des pathologies cardiovasculaires et de les diagnostiquer *via* cette technique d'imagerie. En effet, le sang étant majoritairement composé d'eau apparaît blanc dans une gamme de pondération T<sub>2</sub>. Si une pathologie est présente, les agents IRM vont alors se fixer sur cette dernière et assombrir la zone ciblée mettant en évidence la pathologie cardiovasculaire.

Ils peuvent aussi être utilisés comme agents T<sub>1</sub> en appliquant des techniques de mesures spécifiques, en réduisant le diamètre des particules (modifiant ainsi les moments magnétiques relatifs aux particules) ou encore en greffant des complexes de gadolinium sur des nanoparticules de magnétite.<sup>14, 190</sup> Par ces nombreuses propriétés (magnétiques, fonctionnalisation de surface), les agents superparamagnétiques représentent une solution alternative aux agents commerciaux classiques de par leur facilité de synthèse, leur aspect théranostique (l'hyperthermie notamment) et leur fort potentiel magnétique en IRM.

---

\* Opsonisation : processus biochimique par lequel une molécule recouvre la membrane d'une cellule cible pour favoriser sa phagocytose

#### 1.4.1.2.5 Modifications chimiques des agents superparamagnétiques T<sub>2</sub>

Ces agents couvrent un large domaine d'applications allant de l'imagerie du cancer, du système cardiovasculaire et nerveux à l'explication de mécanismes biologiques tels que l'apoptose<sup>\*</sup>.<sup>184, 191</sup> De nombreuses études relatent la conception de particules multifonctionnelles en conjuguant les particules avec des polymères, des anticorps et des peptides.<sup>15</sup> Des modifications par du PEG et un anticorps monoclonal rch 24<sup>†</sup> pour détecter des tumeurs cancéreuses xénogreffées du colon,<sup>192</sup> par du PEG et un peptide (chlorotoxine (CTX)) pour mettre en évidence les gliomes<sup>‡193</sup> ou encore par des PEG et des catéchols sont relatées.<sup>20</sup> Des encapsulations avec des phospholipides conjugués avec un anticorps RT1 anti-MHC Class II (Major Histocompatibility Class II)<sup>§</sup> ou encore des encapsulations avec des liposomes se sont révélées très efficaces pour détecter des maladies relatives aux reins.<sup>194, 195</sup> D'autres études portent sur la composition même des nanoparticules à base de ferrites (MnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>, CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> et NiFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>) qui joue un rôle majeur dans la détection de tumeur de faible taille.<sup>196</sup> La conception d'agents de contrastes doubles c'est-à-dire à la fois T<sub>1</sub> et T<sub>2</sub> (définis dans § 1.4.1.1.1 et § 1.4.1.1.2) est relatée : les SPIONs sont couplées avec des particules d'oxydes de manganèse MnO.<sup>197</sup> Il est très important de modifier la surface des nanoparticules. En effet, des particules non modifiées en surface sont rapidement éliminées par le SRE<sup>\*\*</sup> à travers les reins et le foie *via* les phagocytes mononucléés<sup>††</sup>.<sup>198</sup> Les nanoparticules qui restent en circulation sont rapidement recouvertes de protéines de type opsonine<sup>‡‡</sup>. Elles recouvrent les particules afin de favoriser leur reconnaissance et leur dégradation par les macrophages. Les nanoparticules sont alors piégées par les cellules de Kupffer (macrophages spécifiques du foie) et dans la rate. Pour éviter ce problème, les nanoparticules ont été fonctionnalisées par différents agents organiques. En apportant une couche organique à la surface des nanoparticules, il est possible de changer leur comportement dans le milieu d'exposition. Mais selon la charge présente à la surface des nanoparticules, celles-ci interagissent différemment avec les nombreuses protéines présentes dans le milieu biologique.<sup>18, 198, 199</sup> Par exemple, des nanoparticules chargées positivement sont rapidement reconnues par les opsonines et par conséquent éliminées par le SRE.<sup>199</sup> Cependant, les nanoparticules chargées négativement n'apportent pas forcément la solution à ce problème. En effet, elles génèrent tout de même à leur surface une attraction avec les protéines du sérum qui une fois au contact de la surface des nanoparticules tend à conduire à un potentiel  $\zeta$  nul. Cette modification de potentiel est lié à la formation de la corona protéique<sup>§§</sup> qui elle-même améliore la stabilité des nanoparticules.<sup>199</sup> Mais d'autres paramètres influencent la furtivité comme la taille des nanoparticules, la longueur des chaînes des molécules organiques ou encore leur nature.<sup>188, 200</sup>

\* Apoptose : processus qui déclenche la mort cellulaire programmée par auto-destruction

† Anticorps monoclonal rch 24 : anticorps contre l'antigène carcinoembryonnaire

‡ Gliome : tumeur cérébrale

§ Anticorps RT1 : anticorps spécifiques aux molécules MHC Class II (présentes sur les cellules possédant des antigènes) présentes dans le rein

\*\* SRE : groupes de cellules (macrophages, cellules réticulaires provenant de la rate ou encore des ganglions lymphatiques et cellules endothéliales présentes dans la rate, le foie et moelle osseuse) impliqués dans l'élimination des éléments pathogènes (indésirables) à l'organisme

†† Phagocyte mononucléé : monocyte (globule blanc) circulant dans le sang et intervenant dans les réactions inflammatoires

‡‡ Opsonine : protéine qui se lie à la surface des nanoparticules et qui facilite leur phagocytose par des cellules possédant de récepteurs spécifiques à ces opsonines

§§ Corona protéique : couche de protéines adsorbées à la surface des nanoparticules jouant un rôle important dans l'interaction avec les organismes cellulaires

Même en ayant recourt à certains polymères comme le l'alcool polyvinylique (PVA) ou le Dextran dont la charge a été modifiée, certaines protéines s'adsorbent préférentiellement à la surface des nanoparticules. Selon les travaux de Sakulku *et al.*,<sup>188</sup> la couronne résultante de protéines du sérum<sup>201</sup> aussi appelée corona protéique\* est plus conséquente quand les nanoparticules sont modifiées par du PVA que du dextran. Les protéines ont une interaction forte avec la surface des nanoparticules chargées négativement et modifiées par du PVA. De plus, il a été observé que l'affinité de certaines protéines avec la charge du polymère (négative ou positive) est plus importante. Par exemple, l'apolipoprotéine a une forte affinité avec le dextran chargé positivement sans aucune affinité avec le PVA alors que l'alpha-1-antiprotéinase se retrouve sur les nanoparticules d'oxydes de fer recouvert par du dextran chargé négativement.

### 1.4.2 Nécessité de modifier la surface des SPIONs : le PEG, un polymère qui a fait ses preuves

Pour éviter notamment les phénomènes d'opsonisation, les nanoparticules sont recouvertes de polymères de type PEG.<sup>199</sup> De nombreuses études relatent la fonctionnalisation de nanoparticules d'oxydes de fer par des PEG.<sup>14, 18, 115, 122, 123, 202, 203</sup> Le greffage de PEG à la surface de nanoparticules est en effet rapidement devenu essentiel pour améliorer la stabilité colloïdale en milieu biologique et la furtivité des nanoparticules (temps de circulation dans l'organisme).<sup>203, 204</sup> Les molécules de PEG influencent l'interface particule/milieu. Les chaînes polymériques modifient la charge de surface des nanoparticules vers des valeurs nulles. Elles créent également un encombrement stérique qui limite le processus d'opsonisation (Figure 28). En effet, il suffit de quelques minutes pour observer une élimination des nanoparticules non modifiées alors que les particules PEGylées ont des demi-vies† de l'ordre de 18-24 heures.<sup>198</sup> Ce temps de demi-vie doit être suffisamment élevé pour assurer le ciblage de la zone souhaitée afin d'acquies les images et/ou délivrer des molécules thérapeutiques.<sup>204</sup> En imagerie, une demi-vie de 2 à 6h est suffisante pour permettre l'injection, le ciblage et l'acquisition des images. En thérapie, un temps plus long est préférable (de l'ordre de quelques jours) mais conduit à un risque accru de toucher les organes sains.<sup>204</sup>

---

\* Corona protéique : couche de protéines adsorbées à la surface des nanoparticules jouant un rôle important dans l'interaction avec les organismes cellulaires

† Temps de demi-vie : temps au bout de lequel une substance (molécule ou particule notamment) a perdu la moitié de son activité physiologique ou pharmacologique

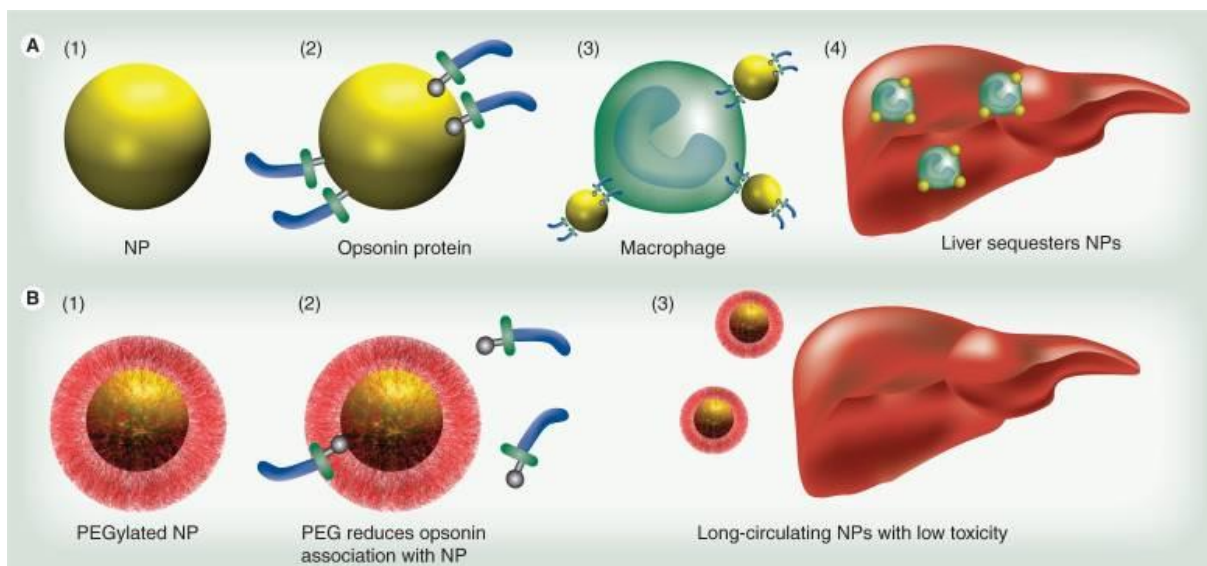


Figure 28 : Processus de reconnaissance de nanoparticules non modifiées en surface (A) et modifiées en surface par des chaînes de polymères (B). (A) : nanoparticules (A1) recouvertes de protéines opsonines (A2) et associées avec des macrophages (A3) pour faciliter leur circulation et leur internalisation par les macrophages pour aller dans le foie (A4). (B) : Nanoparticules recouvertes par du PEG (B1) empêchant l'opsonisation (B2), réduisant l'accumulation dans le foie (B3) et augmentant ainsi la disponibilité des nanoparticules pour l'imagerie ou la thérapie<sup>204</sup>

#### 1.4.2.1 Effet des PEG sur le potentiel $\zeta$

Les travaux de Maurizi *et al.*<sup>18</sup> ont indiqué que l'ajout de PEG à la surface des nanoparticules d'oxyde de fer écrante la charge. L'ajout de PEG<sub>2000</sub> tend à conduire à une charge nulle favorable à une internalisation moins importante dans le foie. Une autre étude montre aussi des modifications du potentiel  $\zeta$  selon la nature terminale des polymères (dendrimère basé sur l'éthylène glycol et PEG linéaires) greffés sur des nanoparticules d'oxydes de fer.<sup>205</sup> Il a été observé en effet que les macromolécules ayant une conformation en dendrimère présentaient un potentiel  $\zeta$  plus important (négatif) que les PEG linéaires. Cette différence trouve en partie son origine dans l'épaisseur de la couche de polymère en comparant des PEG linéaires et des macromolécules en dendrimère de masse molaire identique ( $\sim 2\ 500\text{g.mol}^{-1}$ ). L'épaisseur de la couche organique dans le cas des dendrimères est plus faible que dans le cas des PEG linéaires. Mais ces effets peuvent aussi s'expliquer en parallèle par la densité de molécules greffées en surface.

#### 1.4.2.2 Effet de la densité et de la longueur de la chaîne carbonée du PEG sur l'adsorption des protéines sur les nanoparticules

Des études relatent que la densité du PEG à la surface des nanoparticules joue un rôle essentiel sur l'adsorption de protéine.<sup>206</sup> En effet, en comparant deux densités de PEG ( $1\ \text{PEG/nm}^2$  et  $0,5\ \text{PEG/nm}^2$ ) de masses molaires différentes (2kDa et 5kDa) sur des nanoparticules d'or, des tendances opposées émergent. Une forte densité de PEG ( $1\ \text{PEG/nm}^2$ ) réduit les interactions entre les nanoparticules d'or et leur environnement. Au contraire une densité plus faible en PEG ( $0,5\ \text{PEG/nm}^2$ ) favorise l'adsorption non spécifique de protéines qui tend à éliminer les nanoparticules du corps en les marquant.<sup>206</sup> Au cours de cette étude, il a été conclu qu'il était préférable de travailler avec des densités élevées de PEG courts (2kDa) afin de réduire l'adsorption de protéines non spécifiques. En effet, le PEG long (5kDa) réduisant

fortement l'adsorption de protéine peut poser des problèmes de clairance dans le corps (trop furtive). Une autre étude tend à montrer que le PEG<sub>2000</sub> est le meilleur compromis pour éviter l'opsonisation le comparants à d'autres masses molaires (1 000 Da et 5 000 Da).<sup>207</sup>

### 1.4.2.3 Effet des PEG sur le diamètre hydrodynamique des nanoparticules

En plus de modifier la charge de surface des nanoparticules, l'ajout des molécules de PEG sur leur surface induit une modification de leur diamètre hydrodynamique. En effet, le PEG<sub>2000</sub>, une fois greffé, conduit à une augmentation de ce diamètre. Il passe par exemple de  $23 \pm 1$  nm (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>) à  $38 \pm 5$  nm (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-PEG<sub>2000</sub>).<sup>18</sup> Cette tendance s'observe aussi sur des nanoparticules d'oxydes de fer fonctionnalisées par l'APTES sur lesquelles sont greffées des PEG diacides de masses molaires différentes (2 000 Da, 6 000 et 20 000 Da). Le diamètre hydrodynamique des nanoparticules modifiées par le PEG augmente avec la taille du PEG.<sup>208</sup> Cet effet s'explique par le remplacement de l'effet électrostatique par l'effet stérique généré par les molécules de PEG. Ces molécules créent une couche à la surface des nanoparticules qui s'accroît avec la longueur de la chaîne carbonée du PEG. Cette couche est intéressante pour tenter d'optimiser le diamètre hydrodynamique des nanoparticules.

Il a été retenu que des nanoparticules PEGylées et de taille inférieure à 100 nm réduisaient l'adsorption des protéines plasmatiques tout en réduisant la filtration hépatique.<sup>209</sup>

Cette étude rejoint aussi d'autres travaux qui indiquent que des nanoparticules possédant une taille inférieure à 5 nm sont rapidement éliminées par les reins. Alors que des nanoparticules alors que des nanoparticules d'oxyde de fer de taille comprise entre 10 et 200 nm sont internalisées par le foie. Des nanoparticules de tailles supérieures à 200 nm sont filtrées quant à elles par les capillaires sinusoides ou fenêtres présents respectivement dans la rate ou le foie (Figure 29). Il est donc recommandé de travailler avec des nanoparticules de taille comprise entre 20 et 200 nm pour éviter une élimination trop rapide ou une internalisation trop importante des nanoparticules par le système immunitaire.<sup>210-214</sup>

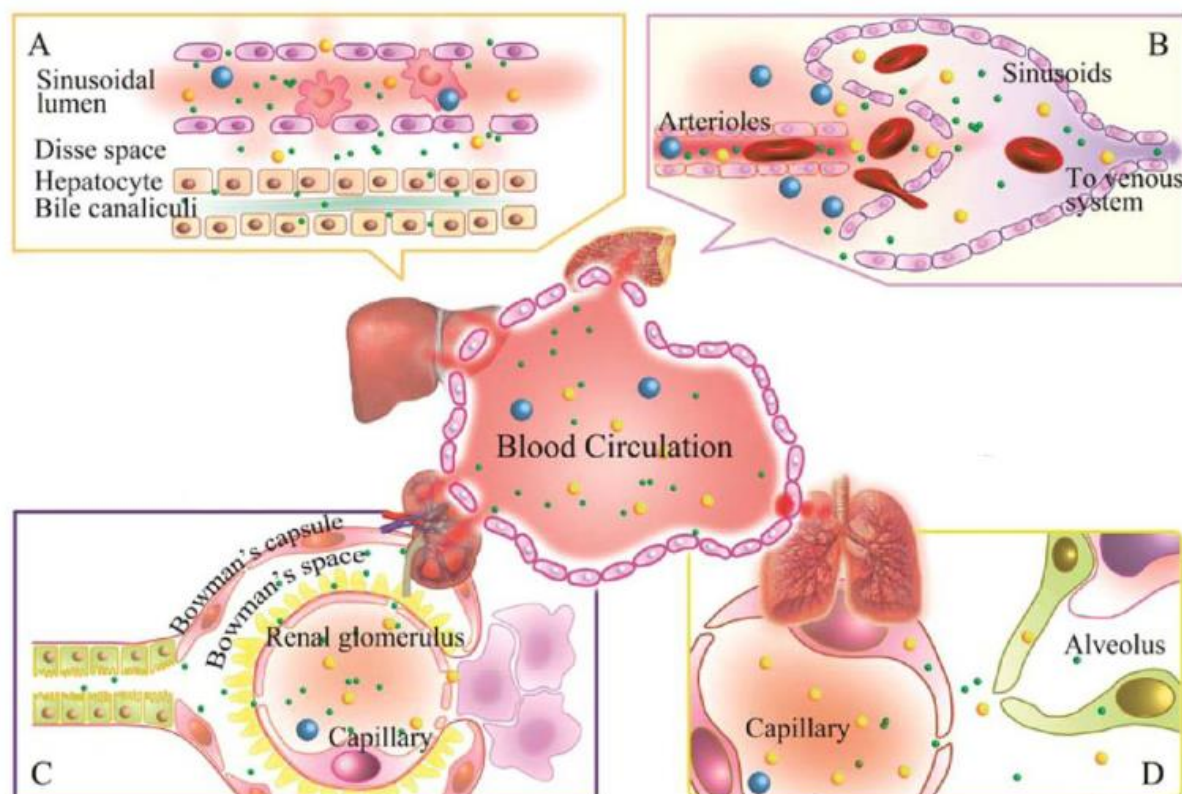


Figure 29 : Extravation\* des nanoparticules par les tissus spécifiques. A) diffusion des nanoparticules de taille comprise entre 100 et 200 nm est possible par la présence de fenêtrage dans les cellules endothéliales sinusoidales hépatiques†. Les nanoparticules de faible taille (10-20nm) sont éliminées du sang rapidement et *via* le foie alors que les grosses nanoparticules (>200 nm) sont éliminées par les cellules de Kupffer‡. B) Le sang passe à travers les capillaires discontinus du système veineux splénique et les entités non déformables et de taille supérieure à 200 nm sont éliminées du sang à l'aide du système de filtration de la rate. C) Au niveau des glomérules§, des fenêtrages capillaires entre 10 et 100 nm existent mais les lames basales\*\* peuvent bloquer la pénétration des nanoparticules de taille supérieure à 5 nm. D) L'endothélium du poumon, les muscles et les capillaires des tissus osseux sont généralement susceptibles de laisser passer des nanoparticules de taille inférieure à 3 nm. Figure inspirée de Wang *et al*<sup>210</sup>

Par ailleurs, il est important de préciser que la mesure seule du diamètre hydrodynamique ne suffit pas à décrire de manière efficace le comportement des nanoparticules avec les différents milieux de l'organisme.<sup>177</sup> Il est important de vérifier leur comportement vis-à-vis des protéines. D'autres paramètres comme la forme ou la flexibilité du ligand influencent leur comportement et modifient leur élimination et leur filtration rénale.<sup>177</sup>

#### 1.4.2.4 Effet des PEG sur l'internalisation et la cytotoxicité des nanoparticules

L'ajout de PEG sur des nanoparticules d'oxydes de fer modifiées préalablement par de l'acide citrique joue un rôle important sur l'internalisation et la cytotoxicité des nanoparticules.<sup>215</sup> En effet, en

\* Extravation : passage des nanoparticules d'un liquide vers les milieux environnants tels que les tissus ou encore les organes

† Cellules endothéliales sinusoidales hépatiques : cellules du foie faisant partie de l'endothélium (couche interne des vaisseaux sanguins en contact avec le sang) dont leur rôle primordial est de retenir le sang dans les vaisseaux sanguins tout en permettant l'échange de substances nutritives. Les sinusoides sont des vaisseaux capillaires très spécialisés dont leur rôle est d'assurer la vascularisation du lobule hépatique (unité fonctionnelle du foie)

‡ Cellules de Kupffer : macrophages (cellules d'origine sanguine dotées de phagocytose) spécifiques et présents dans le foie et particulièrement dans le lobule hépatique

§ Glomérule : partie proche du néphron (structure du rein nécessaire à la formation de l'urine)

\*\* Lame basale : matrice extracellulaire sur laquelle repose les cellules épithéliales



présence de cellules musculaires lisses vasculaires, les nanoparticules modifiées par du PEG<sub>2000</sub> montrent une toxicité réduite comparées aux particules non PEGylées ou celles PEGylées par du PEG<sub>10000</sub> tout en diminuant l'internalisation par ces mêmes cellules. D'autres études montrent aussi que les nanoparticules d'oxydes de fer PEGylées (PEG biphosphonates) diminuent l'internalisation par le SRE tout en améliorant le temps de circulation sanguin. De plus ces nanoparticules présentent une très bonne application IRM/TEMP.<sup>216</sup>

### 1.4.2.5 Conclusion

L'ajout de PEG à la surface des nanoparticules se révèle être important pour maintenir la stabilité des nanoparticules en suspension tout en réduisant l'opsonisation de celles-ci. De plus, de telles idées de couplages ou greffages ont permis d'élaborer par la suite des particules bi- ou multifonctionnelles en combinant cette fois-ci des techniques d'imageries différentes (IRM, TEP, CT, TEMP...).

### 1.4.3 Agents bi-modaux à base de SPIONs

La combinaison de plusieurs techniques d'imagerie constitue un réel atout (Tableau 5). Il est possible de combiner les avantages de chacune des techniques sans avoir leurs inconvénients. Cette combinaison permet de tirer profit d'une complémentarité à tous les niveaux : chimique, physique et médicale.

#### 1.4.3.1 Imagerie bimodale IRM/TEP, IRM/TEMP

La combinaison IRM/TEP ou IRM/TEMP est possible.<sup>16</sup> Le couplage de ces deux techniques se traduit par une complémentarité parfaite en combinant une résolution spatiale et temporelle élevées (IRM), une sensibilité et une pénétration tissulaire importante (TEP et TEMP) ainsi qu'une disponibilité clinique importante pour les deux techniques. La réalisation technique et le prix peuvent encore constituer des obstacles à la mise en place de tels procédés. Le projet IMAPPI (Integrated Magnetic resonance And Positron emission tomography in Preclinical Imaging IRM/TEP) a pour but de développer un imageur hybride combinant deux techniques d'imagerie médicale que sont l'IRM et la TEP.

Cette imagerie bimodale est par exemple bien supérieure à l'imagerie TEP/CT en terme de différence de contraste et de résolution spatiale.<sup>16</sup> Elle est préférée dans l'évaluation de maladies spécifiques dans le domaine de la pédiatrie ou dans l'observation de régions anatomiques car l'exposition aux radiations est moins importante qu'en imagerie TEP/CT.<sup>217</sup> Elle est aussi de plus en plus utilisée en cardiologie, en neurologie ou dans la détection de nombreux cancers (poumons, sein, prostate, gastrique...) dans une optique théranostique.<sup>217</sup> Les dernières avancées technologiques dans ce domaine sont très prometteuses et offrent de nouvelles possibilités.

Les imageries TEP ou TEMP sont similaires et basées sur l'émission de positons à partir de radionucléides. En TEP, le traceur (radionucléide ou atome radioactif) émet des positons dont l'annihilation produit deux photons. C'est la détection en coïncidence de ces deux photons qui est mesurée afin de connaître le lieu d'émission du radiotraceur. En TEMP, un seul photon est détecté et cette technique d'imagerie est intéressante car la désintégration des traceurs généralement employés est plus

lente.<sup>218</sup> Choisir l'une ou l'autre technique d'imagerie se fait selon des critères biologiques et anatomiques. En effet, l'imagerie TEMP est largement appliquée en neurologie et en oncologie mais aussi en cardiologie. D'autres études révèlent que la TEP serait préférable en raison de sa précision et sensibilité (sensibilité de  $10^{-11}$  à  $10^{-12}$  mol.L<sup>-1</sup> en traceur en TEP contre  $10^{-10}$  à  $10^{-11}$  en TEMP).<sup>219, 220</sup> Les corrections d'atténuations sont plus faciles en TEP qu'en TEMP. Cependant d'autres considérations telles que la nature de l'isotope et la facilité de synthèse de ce dernier sont aussi des choix pris en considérations. Généralement, l'imagerie TEP est préférée à l'imagerie TEMP selon ce dernier critère même si les radio-isotopes TEMP offrent un meilleur ciblage spécifique.



## Chapitre 1

	Avantages	Inconvénients	Modification de surface des oxydes de fer	Applications	Refs.
<b>IRM</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Aucune radiation</li> <li>- Haute résolution spatiale 3D</li> <li>- Technique d'imagerie très développée et mature</li> <li>- Accès clinique facile</li> <li>- Bonne résolution temporelle</li> <li>- Aucune limite de profondeur de tissus</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Faible sensibilité</li> <li>- Peu adaptée pour l'imagerie moléculaire</li> <li>- Confusion entre les signaux sombres des agents de contrastes et les zones hypointense en pondération T<sub>2</sub> telles que l'air, le sang, l'os cortical et les tendons</li> <li>- Prix important</li> <li>- Temps d'acquisition élevé</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Fonctionnalisation par du dextran</li> <li>- Fonctionnalisation par des copolymères</li> <li>- Ciblage actif à l'aide d'anticorps monoclonaux</li> <li>- Ciblage de lipoprotéines</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Lymphographie</li> <li>- Imagerie de l'os, du foie, gastro-intestinale</li> <li>- Diagnostic de thrombose</li> </ul>	6, 167, 184, 217, 221, 222
<b>IO</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Suivi en temps réel possible</li> <li>- Coût faible</li> <li>- Facile d'accès</li> <li>- Information cellulaire et moléculaire possible</li> <li>- Non invasif</li> <li>- Aucune radiation</li> <li>- Imagerie multicolore</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Bruit de fond important</li> <li>- Autofluorescence et photoblanchiment</li> <li>- Résolution spatiale faible mais comparable aux dimensions cellulaires</li> <li>- Faible pénétration optique dans les tissus biologiques</li> <li>- Propriétés optiques qui dépendent des tissus environnants</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Fonctionnalisation d'oxyde de fer par un alkosilane pour greffer le fluorophore Rhodamine B isothiocyanate (RITC) et l'anticorps EPCAM</li> <li>- Fonction de l'oxyde de fer par un copolymère pour greffer de la cyanine5.5 (Cys 5.5) sur des groupements amines</li> <li>- Des QDs de type CdSe ou CdTe par exemples sont couplés avec de l'oxydes de fer pour remplacer les fluorophores sensibles au photoblanchiment</li> <li>- Fonctionnalisation de l'oxyde de fer par l'epichlo-hydrin et copolymères pour greffer l'anticorps (anti-VCAM-1)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Amélioration du diagnostic</li> <li>- Détection de cancer (cellules panc-1 pancréatique)</li> <li>- Carcinome</li> <li>- Délivrance de médicaments</li> </ul>	6, 16, 221
<b>TEP</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Technique mature</li> <li>- Adaptée pour l'imagerie moléculaire</li> <li>- Utilité clinique confirmée</li> <li>- Technique très sensible et spécifique</li> <li>- Technique quantitative</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Faible disponibilité clinique</li> <li>- Faible résolution spatiale</li> <li>- Faible résolution temporelle</li> <li>- Invasif (radiations possibles)</li> <li>- Coût élevé</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Greffage d'un anticancéreux doxorubicine DOX, sur l'oxyde de fer modifié par un polymère</li> <li>- Modification de surface par des macrocycles (DOTA, NOTA)</li> <li>- Greffage de peptides (cRGD) sur des oxydes de fer modifiés par des PEG</li> <li>- Fonctionnalisation de l'oxyde de fer par de la LDOPA, des acides polyaspartiques, des PEG</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Comprendre la physiologie et les mécanismes liés aux maladies</li> <li>- Amélioration du diagnostic</li> <li>- Cancer du sein/poumon</li> </ul>	6, 16, 19, 178, 217, 221, 223-225
<b>TEMP</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Détection simultanée de plusieurs sondes possible comparée à la TEP</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Faible résolution spatiale</li> <li>- Sensibilité plus faible que la TEP</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Marquage de l'oxyde de fer avec le <sup>99m</sup>Tc-dipicolylamine(DPA)-alendronate</li> <li>- Greffage d'anticorps</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Radiomarquage en une seule étape et directement sur la surface des oxydes de fer</li> <li>- Cancer (pancréas), applications en neurologie, oncologie et cardiologie</li> </ul>	6, 19, 221, 226
<b>CT</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Reconstruction 3D facile</li> <li>- Haute résolution</li> <li>- Profondeur d'analyse importante</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Faible sensibilité</li> <li>- Taux de contraste faible</li> <li>- Irradiation</li> <li>- Technique non quantitative</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Utilisation d'un agent de contraste CT (Iodine, biphosphonate radiomarqué ou encore de l'or)</li> <li>- Modification de surface de l'oxyde de fer par des PEG, des oléates ou oleylamine</li> <li>- L'or est utilisé pour remplacer le iode (biocompatible)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Cancer du foie</li> </ul>	6, 16, 221, 226-228
<b>US</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Suivi en temps réel</li> <li>- Faible coût</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Faible résolution</li> <li>- Aucune réflexion des US par les os</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Conception de microcapsules contenant des polymères (poly-n-butylcyanoacrylate, poly(lactic-co-glycolic acid))</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Délivrer des médicaments</li> </ul>	182, 183 190, 191 6, 16, 229, 230

Tableau 5 : Liste non exhaustive des avantages, des inconvénients et des modifications de surface des oxydes de fer pour des applications bimodales des différentes techniques d'imageries couplées avec l'IRM (CT : Computed Tomography, IO : Imagerie Optique, TEP : Tomographie par Emission de Positons, TEMP : Tomographie d'Emission MonoPhotonique et US : ultrasons)

Dans un premier temps, des molécules qui chélatent les radioéléments sont greffées sur les nanoparticules. Ces agents chélatants ont pour rôle de complexer efficacement les radiosotopes libres (toxiques en l'état) et éviter la transmétallation\* possible de ces derniers. De nombreux agents chélatants et radioisotopes ont été développés. Parmi les radioisotopes, il existe le  $^{44}\text{Sc}$ ,  $^{64}\text{Cu}$ ,  $^{68}\text{Ga}$ ,  $^{86}\text{Y}$ ,  $^{89}\text{Zr}$  utilisables en PET et le  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ,  $^{67}\text{Ga}$ ,  $^{111}\text{In}$  et  $^{177}\text{Lu}$  en TEMP.<sup>220, 231</sup> Une faible quantité en radio-isotopes (nM ou pM) est nécessaire pour obtenir des images TEP ou TEMP. Puis, dans un second temps des peptides ou encore des anticorps sont conjugués sur la surface des nanoparticules pour les utiliser comme agents ciblant.<sup>178, 224</sup> Les molécules chélatant les radioéléments sont développées spécifiquement en fonction des propriétés chimiques de coordination des radio-isotopes. Cette chélation est nécessaire car à l'état libre, ces ions sont toxiques pour l'organisme.<sup>231</sup> Ainsi, de nombreuses molécules complexant les radioéléments (DOTA (1,4,7,10-tetraazacyclododecane-N,N',N'',-tetraacétique acide), NOTA (2,2'-(7-(2-((2,5-dioxopyrrolidin-1-yl)oxy)-2-oxoethyl)-1,4,7-triazonane-1,4-diyl)diacetic acid), TETA (2-(4-nitrobenzyl)-1,4,8,11-tetraazacyclotetradecane N,N',N'',N'''-tetraacetic acid)...) ont été créés, modifiées (modification de la structure chimique comme les bras de complexation) et utilisées avec plusieurs radio-isotopes.<sup>231</sup> Le DOTA est l'un des agents le plus couramment utilisé en images TEP et TEMP grâce à son potentiel élevé à complexer de nombreux radio-isotopes et à sa facilité à être modifié pour s'adapter aux différentes maladies. En effet, il est possible de greffer des peptides sur ce dernier pour cibler spécifiquement des cellules.<sup>165</sup>

#### 1.4.3.2 Les agents chélatants de types acycliques et macrocycliques

Il existe deux types d'agents chélatants classés selon leur structure : les chélateurs acycliques et les macrocycles (Figure 30). Les agents de type acyclique possèdent une cinétique de coordination avec les radiométaux plus rapide (15 min à température ambiante) à celle des macrocycles (30-90 minutes à 60-95°C).<sup>231</sup> Ils sont donc très employés lorsque des complexations sont réalisées sur des nanoparticules comportant à leur surface des anticorps ou protéines. En effet ces molécules sont très sensibles au pH et à la température. Cependant, les macrocycles sont généralement préférés dans de nombreux cas. Ils montrent une meilleure stabilité *in vitro* et *in vivo* même si leur stabilité thermodynamique reste proche des chélateurs acycliques dans certains cas. De même, le phénomène de transmétallation est fortement réduit lorsque des macrocycles sont utilisés pour complexer les radiométaux. Par ailleurs, la complexation de ces derniers, selon la nature de l'agent employé, est plus ou moins facile. Il est là aussi préférable de travailler avec des macrocycles car les manipulations requises pour complexer l'ion métallique sont plus faciles et fortement réduites en raison de la géométrie des chélateurs cycliques. Une structure de type linéaire demande de fortes réorganisations géométriques de la molécule pour permettre la coordination des radiométaux.

---

\* Transmétallation : processus qui se traduit par un échange de deux cations métalliques au sein d'agent chélatant

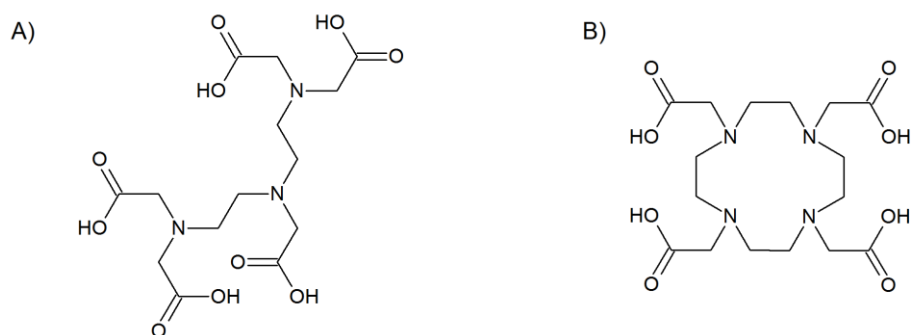


Figure 30 : A) Agent chélatant de type acyclique : Acide DiéthylèneTriamine Penta Acétique (DTPA) et de type cyclique B) macrocycle : DOTA

### 1.4.3.3 Critères d'évaluation des agents chélatants

Les agents chélatants sont conçus dans un premier temps pour complexer spécifiquement et efficacement un cation. Ils doivent avoir une haute affinité avec ce dernier et ne pas montrer de réponse immunitaire. De nombreux paramètres tels que le rendement de radiomarquage, les températures et les temps de réactions sont importants pour définir l'affinité d'un ligand avec le radioélément. Pour cela deux valeurs sont déterminées :  $K_{ML} = [ML]/([M][L])$  et  $pM = -\log[M]_{\text{Libre}}$  avec  $[M]$  la concentration du métal,  $[L]$  la concentration du ligand et  $[ML]$  la concentration du complexe radioélément-ligand. Elles représentent respectivement les constantes de stabilité thermodynamique et le logarithme négatif de la concentration en radioélément libre. Avoir des informations sur la demi-vie de dissociation se révèle être plus important afin d'estimer les taux de dissociations des complexes ligand-radioélément et les phénomènes de transmétallation. La demi-vie de dissociation est mesurée en réalisant des manipulations de dissociations en conditions acides et/ou des expériences de radiomarquages compétitifs par des ions non radioactifs afin de tester la stabilité de du complexe ligand-radiométal face à la transchélation.

Les températures et les temps de radiomarquage devront être minimaux pour des raisons biologiques (dénaturation des protéines, temps de demi-vie des ions métalliques). A noter que des cinétiques trop rapides ont l'inconvénient de favoriser une libération du radiométal dans le milieu. Il est alors nécessaire de trouver un juste compromis entre ces différents paramètres pour obtenir les conditions optimales de radiomarquage.

### 1.4.3.4 Toxicité des radiométaux

La dissociation des radiométaux des agents chélatants est à éviter. A l'état libre, ces ions métalliques sont fortement toxiques pour l'organisme. Ils se retrouvent dans de nombreux organes et leur distribution est large. Elle dépend des propriétés physico-chimiques et biologiques du cation métallique. Par exemple, le galium 68 ( $^{68}\text{Ga}$ ) s'accumule dans les os alors que le cuivre 64 ( $^{64}\text{Cu}$ ) se retrouve préférentiellement dans le foie.<sup>231</sup>

### 1.4.3.5 Agents adaptés pour la complexation du $^{64}\text{Cu}$

De nombreux chélateurs tels que 1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7,10-tetraacetic acid (DOTA), 1,4,7-triazacyclononane- $N,N',N''$ -triacetic acid (NOTA), 1,4,8,11-tetraazacyclotetradecane-

1,4,8,11-tetraacetic acid (TETA), 2,2'-(1,4,8,11-tetraazabicyclo[6.6.2]hexadecane-4,11-diyl)diacetic acid (CB-T2A) or 2,2'-(7-(1-carboxy-4-((2,5-dioxopyrrolidin-1-yl)oxy)-4-oxobutyl)-1,4,7-triazonane-1,4-diyl)diacetic acid (NODAGA) sont couramment utilisés pour former des complexes stables avec de nombreux radiométaux en imagerie TEP.<sup>165</sup>

#### 1.4.3.5.1 Choix du cuivre <sup>64</sup>Cu

Ces dernières années, l'isotope radioactif <sup>64</sup>Cu (émetteur  $\beta^+$ ) a gagné en intérêt dans les procédures de radiomarquages en imagerie TEP et ciblage thérapeutique.<sup>232-234</sup> Son temps de demi-vie (12,7h) et sa production en grande quantité sur des cyclotrons à partir d'irradiation de nickel <sup>64</sup>Ni (réactions <sup>64</sup>Ni (p,n))<sup>165</sup> en fait un parfait candidat pour les agents TEP à base de peptides, protéines ou anticorps. En effet, ces derniers nécessitent des conditions de radiomarquages particulières et des temps de circulations importants pour assurer un ciblage et une accumulation optimale. Ainsi, il est possible de faire des acquisitions d'image entre 12h et 18h après l'injection.<sup>235</sup> Il offre aussi un très bon contraste sur les images.<sup>234</sup> Ses nombreux avantages font que de nombreuses études se sont portées sur le développement d'agents chélateurs spécifiques à ce radiométal.<sup>165, 232, 236</sup>

#### 1.4.3.5.2 Les agents chélateurs du <sup>64</sup>Cu

Les agents classiquement utilisés comme le DOTA ou le NOTA ont été testés pour complexer le cuivre.<sup>165</sup> Ces agents ne sont pas les mieux adaptés pour complexer rapidement et de façon stable le cuivre radioactif *in vitro* et *in vivo*. De récents travaux ont montré des cas de démétallation et transmétallation sur les complexes Cu(II)-DOTA ou TE2A.<sup>232, 233</sup> Un problème de stabilité intervient *in vivo* car une réduction du complexe de Cu(II) en Cu(I) est possible pouvant mener au final à une démétallation suivie d'une transchélation vers la superoxyde dismutase (SOD)\*.<sup>237</sup> Dans ce cas, le cuivre est métabolisé par voie hépatique (voie classique de métabolisation du cuivre). Ces phénomènes conduisent à des accumulations importantes dans le foie et les reins.<sup>233, 234, 237, 238</sup> Par ailleurs, le contraste tumeur/non-tumeur est diminué. De nombreuses stratégies ont été développées pour trouver des chélateurs adaptés au <sup>64</sup>Cu, optimiser la cinétique de complexation et le ciblage spécifique des zones pathologiques.

- La première stratégie fut de greffer des peptides comme le RGD (Acide arginylglycylaspartique, tripeptide composé de la L-arginine, la glycine, et de l'acide L-aspartique) afin de favoriser l'affinité avec l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$  (surexprimée par les cellules endothéliales des néo-vaisseaux tumoraux). Ces agents ont montré une meilleure affinité avec les cellules tumorales tout en montrant une assimilation rapide, importante et un taux de contraste important (ratio tumeur/bruit).<sup>165</sup>
- La deuxième stratégie fut de rajouter et modifier des groupements fonctionnels aux agents chélatants.<sup>239</sup> Des molécules composées de phénylphosphonium ont montré des résultats intéressants sur les clairances et les ratios tumeurs/organes. En ajoutant, par exemple, des groupements méthoxy (Figure 31) sur les cations TriPhénylPhosphonium (TPP), la clairance du foie et des poumons

\* Superoxyde dismutase : métalloprotéine ayant une activité enzymatique (en mesure de catalyser des réactions chimiques)

(organes sains) sont améliorées mais en parallèle, une diminution de l'internalisation par la tumeur apparaît.

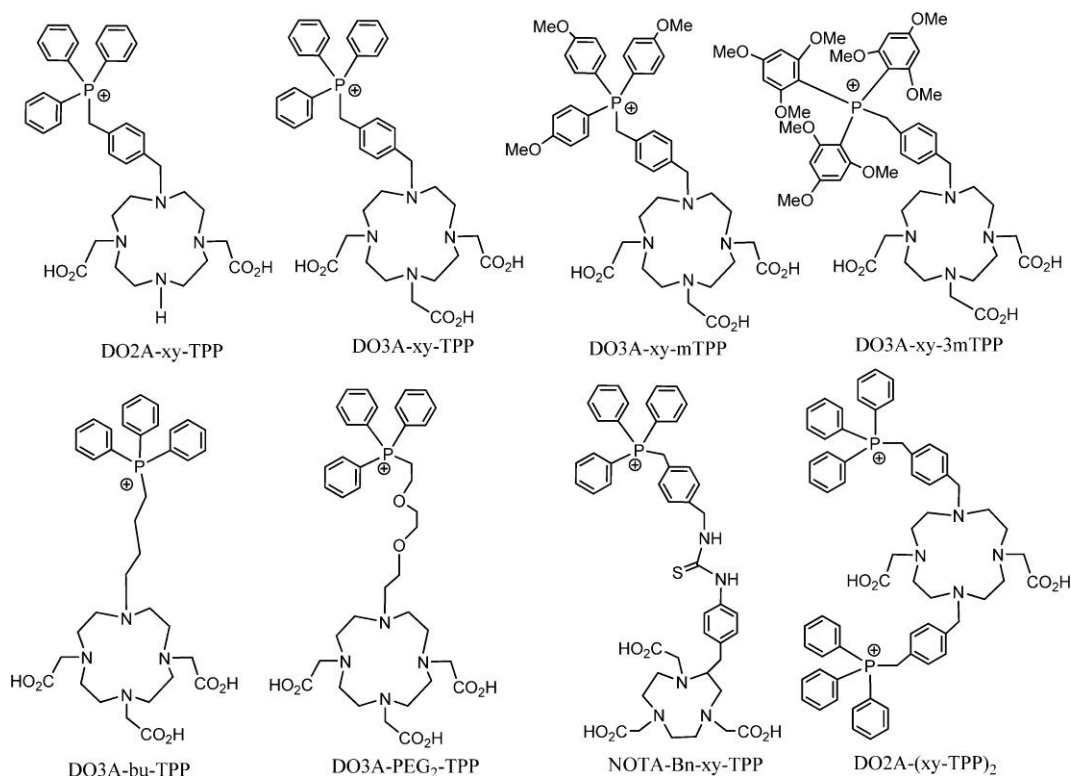


Figure 31 : Exemple de cations triphénylphosphonium modifiés par des groupements chimiques (méthoxy, xylène, butylène) sur les chélateurs bifonctionnels DO3A, DO2A et NOTA<sup>239</sup>

- La troisième stratégie consiste à changer la structure même du macrocycle (nombre de bras coordinants, ponts intramolécules à l'intérieur du macrocycle notamment). Différents types de macrocycles ont été modifiés en se basant sur le squelette du cyclène et du cyclame.<sup>240</sup> Le TETA (Figure 32-C)), le p-NO<sub>2</sub>-Bn-Oxo<sup>241</sup> et le p-NO<sub>2</sub>-Bn-PCTA<sup>241</sup> (Figure 32-A) et -B)) sont par exemples plus stables que le DOTA pour complexer le <sup>64</sup>Cu avec des conditions de complexations simples (25 °C, 60 min à pH compris entre 5 et 7).<sup>231</sup> Le p-NO<sub>2</sub>-Bn-Oxo et le p-NO<sub>2</sub>-Bn-PCTA ont montré des rendements radiochimiques élevés (>98%) à température ambiante avec une cinétique de réaction rapide (~5min). Leur stabilité à pH = 2 est préservée contrairement au DOTA. Le NOTA, un autre agent couramment employé dans de nombreuses chélation (<sup>67/68</sup>Ga<sup>3+</sup>) a aussi été testé pour complexer ce radioélément. Ses conditions de radiomarquages (température ambiante durant 30 minutes à pH compris entre 5,5 et 6,5) sont très intéressantes pour envisager l'utilisation d'anticorps.

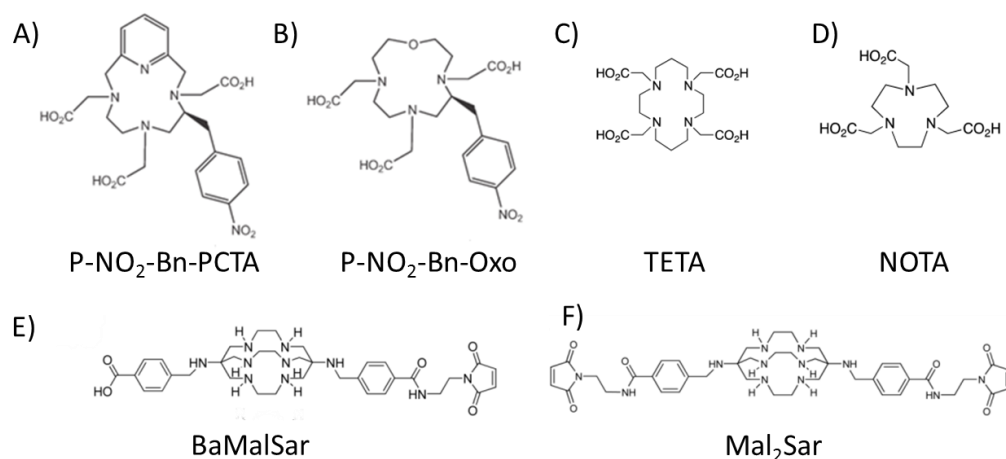


Figure 32 : Différents macrocycles ayant subi des modifications structurales de leur backbone : A) P-NO<sub>2</sub>-Bn-PCTA,<sup>241</sup> B) P-NO<sub>2</sub>-Bn-Oxo,<sup>241</sup> C) TETA,<sup>231</sup> D) NOTA,<sup>231</sup> E) BaMalSar<sup>242</sup> et F) Mal<sub>2</sub>Sar<sup>242</sup>

D'autres chélatants ont subi aussi des modifications internes en formant, par exemple, des ponts intramoléculaires. Des sarcophagines (Figure 32-E et -F)), reposant sur ce principe de modification et d'une complexation par des atomes d'azote (affinité plus forte avec le cuivre), ont été mis au point pour améliorer la stabilité *in vivo* et *in vitro* des complexes ligand-cuivre.<sup>242, 243</sup> Ils ont montré des résultats prometteurs en assurant un radiomarquage chimique élevé (>90%), une assimilation importante dans les tumeurs et un bon ratio tumeur/organe sain. Le radiomarquage a été alors effectué à 37°C pendant 10 min à pH = 5,5 dans de l'acétate de sodium. Cependant, l'influence des ponts intramoléculaires est sujette à controverse. En série tétraazacycloalcane, la présence d'un pont n'est pas forcément gage de meilleures propriétés de coordination par rapport au Cu.<sup>244</sup>

#### 1.4.3.5.3 Choix du NODAGA et du MANOTA

En raison du partenariat avec l'ICMUB et des récents travaux sur la complexation du cuivre par différents macrocycles, le NODAGA a été choisi (Figure 33).

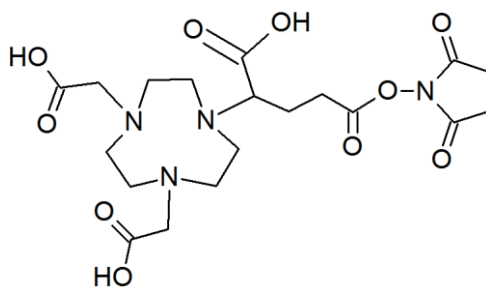


Figure 33 : Structure chimique du NODAGA-NHS

Il est un très bon candidat. Les radiations dans les organes non ciblés, habituellement observées avec le DOTA, sont quasi-absentes.<sup>234</sup> Sa faible accumulation dans les reins, dans le foie ainsi qu'une augmentation du ratio tumeur-organe et une clairance rapide dans les tissus sains font du NODAGA un agent chélatant plus approprié que le DOTA. En effet, seulement 1 heure après l'injection, l'assimilation dans le foie des complexes <sup>64</sup>Cu-DOTA-c(RGDfK) est 3 fois plus importante que pour le complexe

$^{64}\text{Cu}$ -NODAGA-c(RGDfK).<sup>234</sup> Il s'élève jusqu'à 7 fois après 18h (Figure 34). Une autre étude compare des complexes  $^{64}\text{Cu}$ -DOTA-mAb\* et  $^{64}\text{Cu}$ -NODAGA-mAb pour la détection de molécules d'adhésion cellulaire épithéliale sur des modèles de cancer de la prostate avec des gammes de rendements radiochimiques compris entre 59 et 71%.<sup>245</sup> Les auteurs ont alors observé une faible distribution du complexe  $^{64}\text{Cu}$ -NODAGA-mAb dans les tissus normaux de la prostate. Le complexe formé a une meilleure biodisponibilité grâce à la stabilité *in vivo* de l'agent. Il discerne efficacement, à l'aide de l'anticorps, la région tumorale des régions saines (ratio tumeur/prostate supérieur à 2 fois le ratio tumeur/muscle). Dans une autre étude, les auteurs ont obtenu une très bonne pureté radiochimique de l'ordre de 92-98% avec le  $^{64}\text{Cu}$ .<sup>246</sup>

Comparé au NOTA souvent choisi pour complexer du cuivre 64, le NODAGA montre une meilleure stabilité *in vivo* même si le NOTA montre une meilleure assimilation dans les tumeurs.<sup>237</sup> Le taux de contraste des images TEP est fortement accru (Figure 34).<sup>234, 235, 247</sup> La pureté radiochimique du complexe NODAGA marqué au cuivre est supérieure à 93% au-delà de 24h en milieu salin et 88% dans du plasma.<sup>235</sup>

D'après tous ces résultats, il est préférable de se diriger vers le NODAGA pour complexer le cuivre et avoir une stabilité *in vivo* optimale.

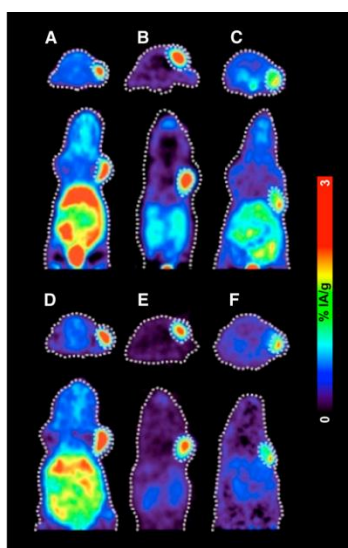


Figure 34 : Images TEP sur des animaux des complexes  $^{64}\text{Cu}$ -DOTA-c(RGDfK) A) 1h après l'injection, et D) 18h après l'injection,  $^{64}\text{Cu}$ -NODAGA-c(RGDfK) B) 1h après l'injection et E) 18h après l'injection,  $^{64}\text{Cu}$ -CB-TE2A-c(RGDfK) C) 1h après l'injection, et D) 18h après l'injection sur des tumeurs de souris U87MG<sup>234</sup> (%IA/g = pourcentage d'activité injecté par gramme de tissu)

En plus du NODAGA, un nouveau macrocycle, le 2,2,2-(2-([2-(4-Isothiocyanatophenyl)acetamido]methyl)-1,4,7-triazacyclononane-1,4,7-triyl)triacetic acid (MANOTA-NCS) est testé. Ce macrocycle est théoriquement adapté pour la complexation du  $^{64}\text{Cu}$  et sa synthèse est décrite dans la littérature (Figure 35).<sup>248</sup> Aucune référence bibliographique ne relate son efficacité de complexation avec le cuivre.

\* mAb : anticorps monoclonal



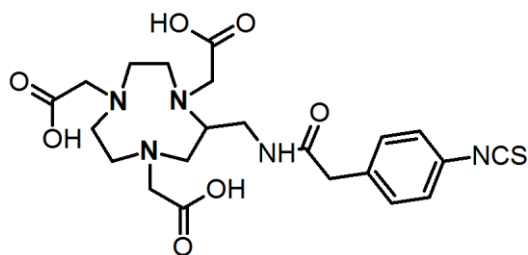


Figure 35 : Structure chimique du MANOTA-NCS

De récentes études ont montré le potentiel de ces agents en imagerie IRM/TEP ou IRM/TEMP.<sup>17</sup>

19, 178, 225, 226

#### 1.4.3.6 Les SPIONs pour l'IRM/TEP

Patel *et al.* ont développé des oxydes de fer synthétisés par hydrolyse de complexes d'alcoolate de métal chélaté à haute température (210-220°C).<sup>17</sup> Le diéthylène glycol est utilisé comme alcool chélatant. Ils ont ensuite été modifiés en surface par de la LDOPA (3,4-Dihydroxy-L-phenylalanine) afin d'améliorer la stabilité des particules mais aussi pour réaliser le greffage covalent du DOTA. Ces particules ont montré une forte relaxivité ( $167 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ), valeur proche de celle du Feridex ( $148 \text{ mM}^{-1}$  à 3,0T et dont la fabrication a été stoppée en 2008, voir Tableau 4), liée à la présence des ions  $\text{Cu}^{2+}$ . Ces changements importants de  $r_2$  sont attribués à la géométrie de l'ion  $\text{Cu}^{2+}$  à la surface de la nanoparticule et à la surface modifiée de la nanoparticule. En effet, en première explication, la coordination acétate entre le DOTA et l'ion  $\text{Cu}^{2+}$  est labile en milieu aqueux et les molécules d'eau environnantes établissent un équilibre association-dissociation avec l'ion  $\text{Cu}^{2+}$  coordonné par le DOTA situé à la surface des nanoparticules. Cet équilibre facilite la propagation de l'induction magnétique de la nanoparticule vers l'eau. En deuxième explication, l'effet stérique lié à la complexation du cuivre par le DOTA sur la surface des nanoparticules modifie l'équilibre association-dissociation et génère une diminution du temps de résidence de l'eau coordonnée avec le cuivre. Le haut degré de coopération contribue à augmenter la valeur de  $r_2$ . Les auteurs ont aussi observé une augmentation de  $r_2$  en augmentant la concentration en  $\text{Cu}^{2+}$ . Cette nanoparticule montre de très bons résultats pour une possible application TEP et en imagerie bimodale (IRM/TEP).<sup>17</sup> Yang *et al.* ont quant à eux conçus des nanoparticules d'oxydes de fer superparamagnétiques recouvertes de PEG, d'un peptide cyclique cRGD, d'un anticancéreux DOX (doxorubicine) et de NOTA (1,4,7-triazacyclononane-N, N', N''-triacétique acide) pour complexer le  $^{64}\text{Cu}$  (Figure 36).<sup>178</sup> D'un point de vue biologique, elles ont montré une forte assimilation par les cellules et sont utilisables en IRM et TEP. Cependant, les mesures de  $r_2$  sont légèrement plus faibles ( $101,9 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ) que les agents commerciaux habituellement utilisés (Feridex®) ( $111,5 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  à 4,7T)<sup>178</sup>.



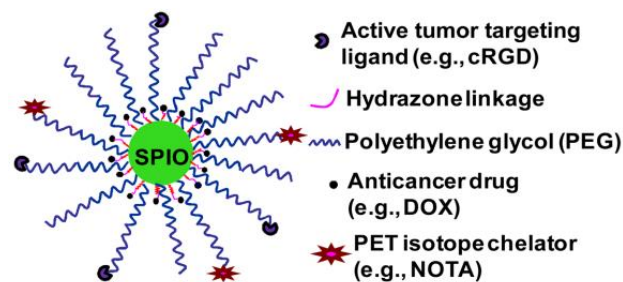


Figure 36 : Représentation schématique d'une nanoparticule d'oxyde de fer modifiée en surface par un anticancéreux (DOX), du PEG, du NOTA et un peptide<sup>178</sup>

D'autres études traitent de la conception de particules recouvertes de DOTA, d'acide polyaspartique et de peptides RGD\* pour cibler l'intégrine  $\alpha V\beta 3$ <sup>†</sup>.<sup>224</sup> Les particules modifiées ont montré une conjugaison avec cette intégrine *in vitro*. Les images IRM et TEP sur animaux ont souligné l'association et l'assimilation des nanoparticules avec l'intégrine  $\alpha V\beta 3$  permettant ainsi de mettre en avant la capacité de ces particules à détecter précocement les modèles de tumeurs U87MG‡ avec un haut degré de précision (Figure 37).

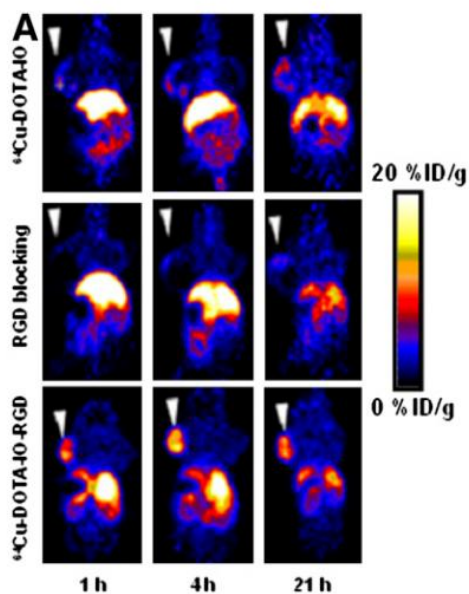


Figure 37 : Images TEP de particules d'oxydes de fer après 1h, 4h et 21h d'injection de 3,7 MBq de <sup>64</sup>Cu-DOTA-IO, <sup>64</sup>Cu-DOTA-IO-RGD et <sup>64</sup>Cu-DOTA-IO-RGD avec 10 mg de peptide c(RGDyK) par kilogramme (300  $\mu$ g d'équivalent en fer par souris)<sup>224</sup>

Des modifications par des bisphosphonates et du dextran sont envisageables.<sup>225</sup> Les auteurs présentent dans leur étude une approche intéressante consistant non pas à marquer des oxydes de fer déjà modifiés mais à marquer en premier la partie organique et à la greffer par la suite à la surface des nanoparticules (Figure 38).

\* Peptide RGD : peptide formé des acides aminés L-arginine de la glycine et l'acide L-aspartique

† Intégrine  $\alpha V\beta 3$  : protéine transmembranaire impliquée dans la prolifération et la survie des cellules cancéreuses

‡ U87MG : lignées cellulaires de glioblastome (tumeur cérébrale)

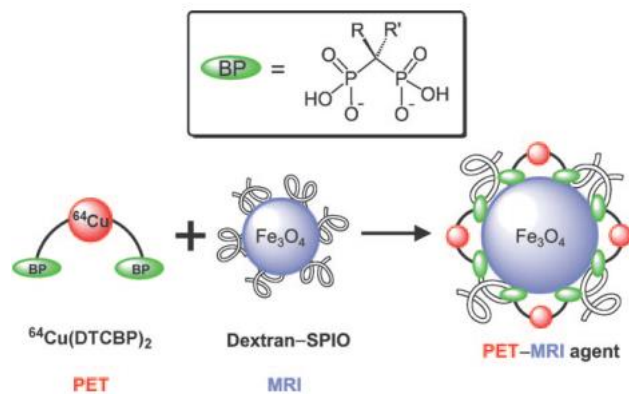


Figure 38 : Représentation schématique d'un biphosphonate (BP) et sa conjugaison entre des particules d'oxydes de fer superparamagnétiques (SPIOs) modifiées en surface par du dextran et un traceur TEP ( $^{64}\text{Cu}(\text{dtcbp})_2$ )<sup>225</sup>

Le choix des agents chélatants et du radionucléide sera exposé dans le Chapitre 3. Les études menées à ce jour ont pour but de comprendre la physiologie et les mécanismes liés aux maladies pour améliorer les diagnostics et les traitements.

#### 1.4.3.7 Les SPIOs pour l'IRM/TEMP

Combiner la TEMP au lieu de la TEP avec l'IRM est intéressant pour comprendre des processus moléculaires. Des nanoparticules d'oxydes de fer superparamagnétiques ont servi de support pour greffer des bisphosphonates marqués au  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ .<sup>226</sup> Cette approche est très intéressante car il est possible de marquer les particules avec les radio-isotopes en une seule étape et directement à la surface des oxydes de fer. Il est en effet souvent observé dans la littérature le procédé inverse qui consiste à marquer l'agent à la surface de la particule. Ces particules stables montrent de très bons résultats en imagerie TEMP et IRM.<sup>226</sup> Des anticorps monoclonaux antimésothéline (protéine qui code pour le cancer du pancréas) sont greffés pour réaliser un marquage spécifique sur des cellules possédant de la mésothéline.<sup>249</sup> Les particules se sont retrouvées principalement dans les zones tumorales avec une légère internalisation dans les organes non touchés.

#### 1.4.4 Agents pour le diagnostic, la thérapie et le théranostique

Les oxydes de fer sont aussi utilisés comme agents de diagnostic, agents thérapeutiques ou bien les deux à la fois pour former un agent dit théranostique.<sup>250, 251</sup>

Pour une application pour le diagnostic, les oxydes de fer sont retrouvées dans :

- La séparation d'entité (Figure 39-a),<sup>16</sup>
- la détection d'ADN, pour remplacer les techniques actuelles de détection génomique comme la PCR (Polymerase Chain Reaction)\*,<sup>252</sup>
- la détection de virus, de bactéries ou encore de protéines,<sup>253, 254</sup>

\* PCR : méthode consistant à amplifier l'ADN *in vitro*

- la détection de maladies spécifiques comme le cancer, la sclérodémie en combinant différentes techniques d'imagerie (IRM, CT, US, TEP, TEMP, IO).<sup>178, 228, 255-257</sup>

Pour une application dite thérapeutique, les oxydes de fer sont retrouvés dans :

- des actions antimicrobiennes en les conjuguant avec des particules de zinc (Zn) ou d'argent (Ag),
- des activités anticancéreuses et biocides\* en ayant recourt à l'hyperthermie† (Figure 39-b),<sup>16, 116, 258-264</sup>
- des activités de stress des cellules en utilisant des photosensibilisateurs qui sous l'action d'un rayonnement précis (longueur d'onde donnée) génèrent un stress oxydatif à la bactérie ou au virus,<sup>16</sup>
- des actions de nanovectorisation,<sup>265</sup>
- des activités médicamenteuses.<sup>266</sup>

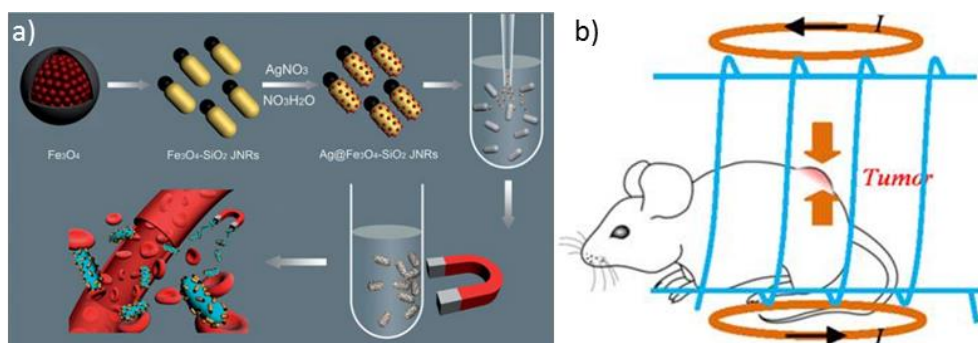


Figure 39 : a) Illustration représentant la synthèse de binanoparticules (AgNPs@Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-SiO<sub>2</sub>) et du processus antimicrobien et de séparation<sup>16</sup> et b) Illustration du principe de l'hyperthermie (souris placée à l'intérieur d'un solénoïde générant un champ magnétique aux alentours de la tumeur)<sup>260</sup>

## 1.5 Conclusion

Les nanoparticules d'oxydes de fer sont actuellement utilisées dans de nombreux domaines médicaux (IRM et imagerie bimodale IRM/TEP ou IRM/TEMP) grâce à leurs propriétés physico-chimiques. Cependant, de telles applications demandent des contrôles de la structure de l'échantillon (oxydes de fer de structure spinelle), de la taille des cristallites (inférieure à 20 nm pour être superparamagnétique), de son état de surface (présence de molécules organiques améliorant la biocompatibilité) et de sa stabilité colloïdale (nanoparticules stables dans différents milieux de cultures). Chacune de ces considérations seront prises en compte pour synthétiser les particules d'oxydes de fer de cette thèse (Chapitre 2) en adéquation avec une application en imagerie bimodale (Chapitre 3).

\* Biocides : substances antibiotiques ou antiparasitaires

† Hyperthermie : Sous l'action d'un champ magnétique alternatif (de quelques KHz à quelques MHz), les nanoparticules d'oxydes de fer provoquent un échauffement local (friction entre les particules ou phénomènes de relaxation de Néel à savoir une rotation des champs magnétiques) par la conversion de l'énergie électromagnétique en énergie thermique (42-43°C). Etant plus sensibles à la chaleur que les cellules saines, les cellules cancéreuses se nécrosent sans endommager les cellules saines.

## **Chapitre 2**

**Synthèse hydrothermale en continu et en  
une étape de nanoparticules d'oxyde de  
fer de type magnétite  $\text{Fe}_3\text{O}_4$   
fonctionnalisées**



## 2.1 Objectifs et contexte de l'étude

La finalité de cette thèse est de synthétiser des oxydes de fer superparamagnétiques de type magnétite ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) fonctionnalisés, à destination de l'imagerie bimodale IRM/TEP. Ainsi, l'objectif premier de cette étude est de concevoir et de développer des oxydes de fer possédant un cœur magnétique, de taille inférieure à 20 nm pour acquérir le comportement superparamagnétique et préfonctionnalisés par des molécules organiques. Cette fonctionnalisation a pour rôle de limiter l'état d'agglomération des nanoparticules et également d'obtenir des groupements chimiques réactifs nécessaires pour venir greffer en post-synthèse d'autres molécules organiques telles que des macrocycles permettant de fixer des radioisotopes\* pour la TEP. Le comportement magnétique, la taille des particules et la stabilité des suspensions sont des critères importants.

Dans un premier temps, la présentation du dispositif hydrothermal en continu est abordée. Puis, l'influence de différentes molécules organiques (acide citrique, DHCA et LDOPA) sur la structure, l'état d'oxydation, la taille des nanoparticules, leur comportement magnétique et leur stabilité en suspension est étudiée (§ 2.2 et § 2.3.2). Le taux de greffage est également estimé.

Dans un second temps, l'effet de la température de synthèse des nanoparticules  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -LDOPA et  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -DHCA est étudiée (§ 2.4). Trois températures sont choisies : 90°C, 150°C et 250°C. Suites à ces premières études ayant conduit à sélectionner les meilleurs ligands organiques et la température optimale pour obtenir des nanoparticules respectant l'ensemble des critères évoqués ci-dessus, l'influence du lieu d'ajout des molécules organiques (avant ou après la synthèse des nanoparticules) et de la concentration des agents organiques sur l'état d'oxydation, la taille des nanoparticules et l'efficacité de greffage (§ 2.4) sont analysés.

Enfin, une autre molécule organique (l'acide 6-phosphonohexanoïque ou PHA) est étudiée afin de vérifier si les protocoles de synthèse établis au cours des précédentes études sont transposables pour l'emploi d'autres molécules organiques.

## 2.2 Présentation du dispositif et du procédé de synthèse

Face au besoin croissant en nanomatériaux, l'équipe MaNaPI a développé depuis 2001, un dispositif de synthèse hydrothermale en continu et en conditions sous- et supercritiques sur le site de Dijon dont le réacteur est breveté (Figure 40).<sup>66</sup> Cet appareil offre l'opportunité d'utiliser une large gamme de pression (1 à 30 MPa) et de température (20°C à 400°C). Deux réacteurs (C et N (Figure 41)) sont présents sur le dispositif mais seul le réacteur N sera utilisé en raison de son usage exclusif pour l'emploi de nanoparticules à destination du domaine biomédical (Figure 40). Depuis sa création, il a subi de nombreuses modifications techniques jusqu'à l'aboutissement d'une nouvelle voie dite « de greffage »

---

\* Radioisotopes : isotopes (atomes ayant le même nombre d'électrons mais un nombre différent de neutrons) radioactif

permettant une fonctionnalisation de la surface des nanoparticules par des molécules organiques en post-synthèse tout en contrôlant la température à l'aide de fours (Figure 40). Ainsi, grâce à ces différentes voies de synthèse (run 1, 2 ou 3) il est possible de pouvoir injecter les réactifs en différents lieux (run 1, run 2 ou run 3) tout en ajustant les concentrations et les débits selon l'étude voulue (Figure 41).

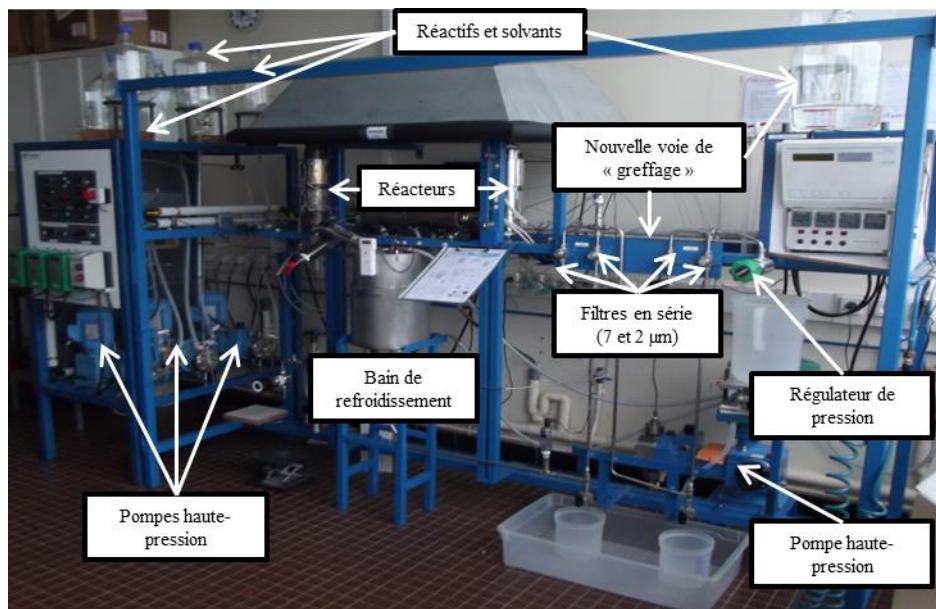


Figure 40 : Photo du dispositif hydrothermal en continu développé par l'équipe MaNaPI (version 2012)

Au cours de ces synthèses, les réactifs sont introduits dans le réacteur à l'aide de pompes haute pression (HPP). Les ions ferreux  $[Fe^{2+}] = 8\text{mM}$  et ferriques  $[Fe^{3+}] = 16\text{mM}$  en proportion molaire 1:2 sont introduits dans le run 1 (Figure 41). De la soude (NaOH) de concentration molaire 24 mM est injectée *via* le run 2. Ces réactifs froids arrivent à contre-courant dans le réacteur (porté à une température donnée selon l'étude (90°C, 150°C ou 250°C)) avec de l'eau déionisée préalablement chauffée. Après réaction (Eq. 1), la suspension de nanoparticules circule dans un bain de refroidissement. La suspension est ensuite filtrée par des filtres de 7 et 2 µm pour éliminer les larges agrégats résultant de la synthèse. La pression de l'ensemble du dispositif est ajustée à l'aide d'un déverseur situé à la sortie du dispositif. Elle est établie à 25 MPa. Le débit est fixé en sortie. Les ligands (DHCA, LDOPA ou CA) sont quant à eux injectés avec les ions  $Fe^{2+}$  et  $Fe^{3+}$  en run 1 dans la première et seconde étude puis dans chacun des runs (1, 2 ou 3) pour la troisième étude. Quant au PHA, il est introduit uniquement dans le run 1.

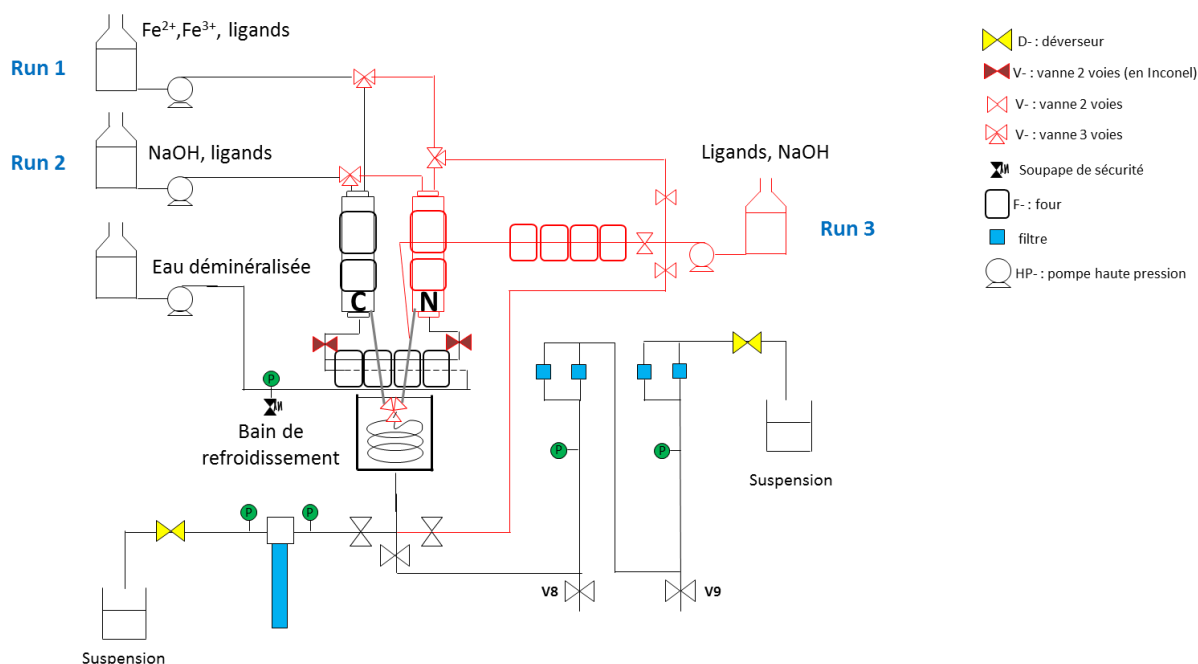


Figure 41 : Représentation schématique du dispositif hydrothermal en continu (version 2012)

Après l'obtention de la suspension, celle-ci est placée immédiatement sous décantation magnétique afin d'éliminer rapidement l'excès de soude et d'ions ferreux ou ferriques n'ayant pas réagi. Une fois cette étape terminée, la suspension est centrifugée une fois (24400 g pendant 10 min) et de dialyse (Cellu-Sep® tubular membranes of 3500 Da). Pour les échantillons nécessitant une stabilité colloïdale importante et une reconcentration, seules des dialyses et ultrafiltrations (Amicon® UltraCel 30 KDa) sont réalisées (§ 2.3.2) jusqu'à obtenir une conductivité proche de celle de l'eau déionisée, ici  $2.2 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ . Enfin une partie de l'échantillon est lyophilisée pour obtenir une poudre sèche pour effectuer les caractérisations nécessaires.

De la diffraction des rayons X (DRX), des mesures magnétiques (ZFC/FC et IRM), de la microscopie électronique en transmission (MET), de la BET, de l'analyse thermogravimétrique (ATG), de la spectroscopie Raman, infrarouge et de la spectrométrie photoélectronique X (XPS) sont réalisées sur les poudres afin d'évaluer leur état d'oxydation, la taille des nanoparticules, leur forme et aussi la présence des molécules organiques à leur surface. De la diffusion dynamique de la lumière (DLS) et de la zétamétrie sont nécessaires pour caractériser leur taille hydrodynamique et leur stabilité colloïdale.



## 2.3 Synthèse en continu et en une seule étape de nanofleurs de magnétite fonctionnalisées

### 2.3.1 Résumé de l'article soumis à Nanotechnology

#### 2.3.1.1 Objectifs

L'étude suivante présentée sous forme de publication soumise à Nanotechnology le 09 juillet 2015 porte sur la synthèse en continu de nanoparticules d'oxydes de fer  $Fe_{3(1-\delta)}O_4$  (avec  $\delta$  la déviation par rapport à la stœchiométrie en oxygène) fonctionnalisées en surface et en une seule étape. Pour rappel, très peu d'études relatent la fonctionnalisation de nanoparticules en continu sur un tel dispositif et encore moins pour une destination biologique.<sup>55, 60, 62, 106, 110</sup>

Cette fonctionnalisation dite « 1<sup>ère</sup> étape de greffage » a pour principal objectif d'améliorer la stabilité des nanoparticules en suspension (nanoparticules peu agglomérées), de contrôler la taille des cristallites (inférieure à 20 nm) et leur état d'oxydation ( $\delta$  proche de 0) mais aussi d'obtenir des groupements chimiques disponibles pour assurer le greffage d'autres agents (molécules chélatantes, PEG, biomolécules notamment).

Pour cela, trois molécules chimiques, à savoir l'acide citrique, le DHCA ou la LDOPA sont injectées avec les ions ferreux et ferriques au cours de la synthèse en proportion molaire 1:1 ([molécules organiques] =  $[Fe^{2+} + Fe^{3+}]$ ). Ces molécules possèdent de nombreux groupements chimiques fonctionnels permettant d'établir un lien avec la surface des nanoparticules mais aussi d'avoir d'autres groupements libres ( $NH_2$  et  $COO^-$ ) et utilisables pour d'autres greffages.

Cette étude a donné lieu à des résultats très intéressants concernant la morphologie, l'état d'oxydation, la taille et la stabilité des nanoparticules ainsi que la quantité de molécules organiques présentes à leur surface.

#### 2.3.1.2 Résultats majeurs

Le résultat majeur et le plus important qui ressort de cette étude concerne les nanoparticules  $Fe_3O_4$ -LDOPA. Elles se sont révélées très stables en suspension et non oxydées. Elles se distinguent par une morphologie originale et atypique en nanofleur (nanoparticules arborant une structure en fleur) possédant une relaxivité  $r_2$  de  $418 \pm 10 \text{ L.mmol}_{Fe}^{-1}.s^{-1}$  (Figure 42).

Pour arriver à de tels résultats, le protocole de synthèse a été optimisé pour obtenir des nanoparticules les plus stables possible en solution saline ( $[NaCl] = 10^{-2}M$ ), en PBS (1M) et MEM (Minimum Essential Medium). Seulement des étapes de dialyses et ultrafiltrations pour purifier les suspensions sont opérées. Une partie est conservée en suspension pour les mesures DLS et de potentiel  $\zeta$ . En effet, les étapes de centrifugation et de lyophilisation conduisent à des agglomérations.

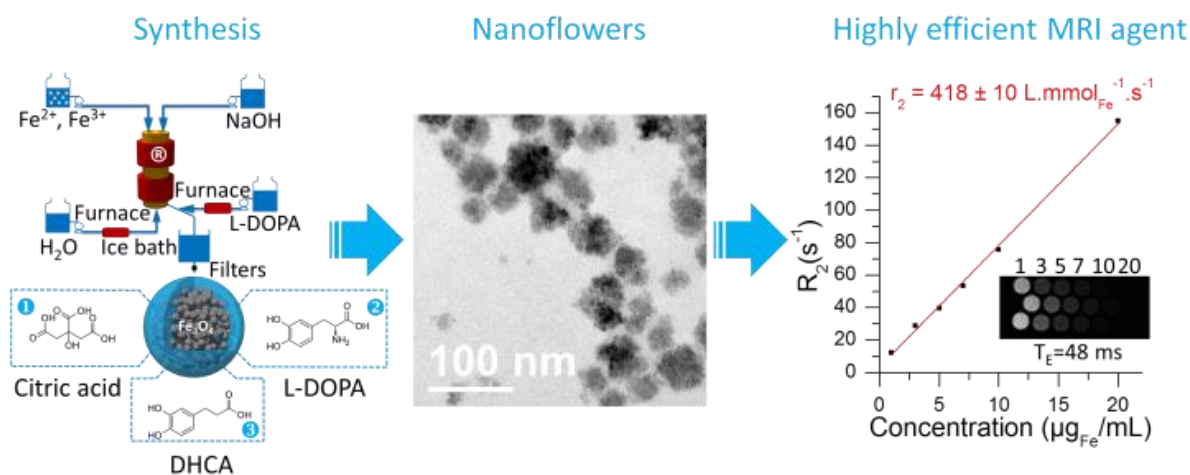


Figure 42 : Schéma de synthèse des nanoparticules (150°C, 25 MPa et 80 mL.min<sup>-1</sup>), image MET de nanofleurs (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-LDOPA) et la corrélation entre le taux de relaxation transverse R<sub>2</sub> (s<sup>-1</sup>) en fonction de la concentration massique en fer (µg<sub>Fe</sub>/mL) donnant la relaxivité transverse r<sub>2</sub> des nanoparticules Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-LDOPA

L'étude approfondie a montré que les molécules organiques induisent principalement un effet antioxydant et un effet sur la taille des cristallites (Figure 43).

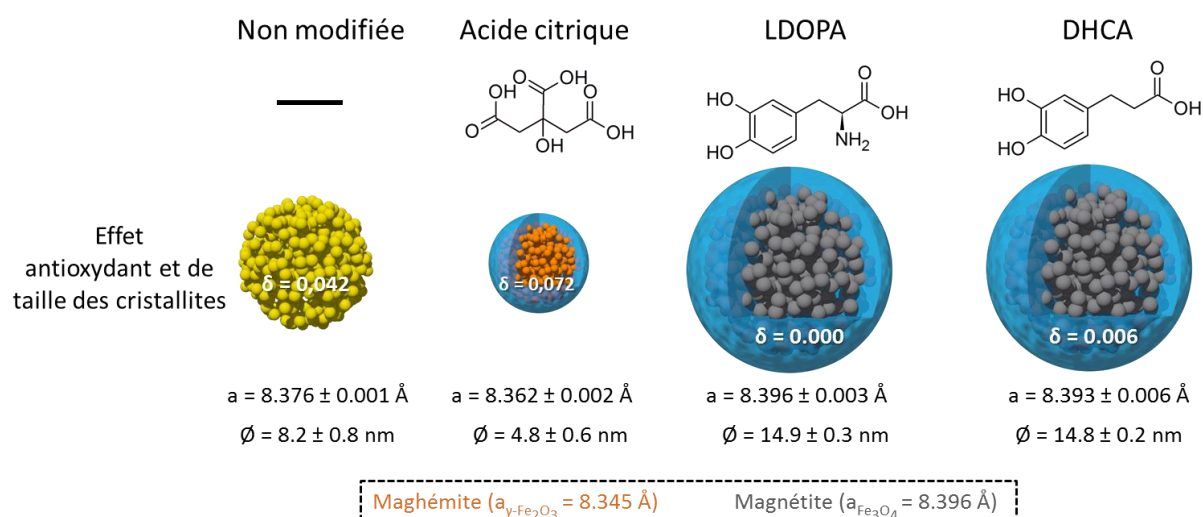


Figure 43 : Figure résumé de la publication soumise à Nanotechnology représentant l'évolution du degré d'oxydation et de la taille moyenne des cristallites Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-CA, Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-LDOPA et Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-DHCA en synthèse hydrothermale et en continu (150°C, 25 MPa et 80 mL.min<sup>-1</sup>)

Les molécules de types catéchols (DHCA et LDOPA) induisent un effet antioxydant très prononcé comparées à l'acide citrique. En effet, le paramètre de maille déterminé à partir des résultats DRX ( $a_{\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-DHCA}} = 8,393 \pm 0,006 \text{ \AA}$  et  $a_{\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-LDOPA}} = 8,396 \pm 0,003 \text{ \AA}$ ) est quasiment égal à celui de la magnétite pure ( $a = 8.396 \text{ \AA}$ ) et le  $\delta$  résultant est très proche zéro indiquant ainsi une particule très peu ou pas oxydée au cours de la synthèse hydrothermale. Les nanoparticules modifiées par l'acide citrique possèdent quant à elles un paramètre de maille ( $a_{\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-CA}} = 8,362 \pm 0,002 \text{ \AA}$ ) inférieur à celui des nanoparticules non modifiées ( $a_{\text{Fe}_3\text{O}_4} = 8,376 \pm 0,001 \text{ \AA}$ ). Cette molécule peut cependant avoir un effet

antioxydant car en diminuant la taille des cristallites d'un facteur deux ( $\varnothing_{DRX} = 4,8 \pm 0,6$  nm et  $\varnothing_{TEM} = 6 \pm 2$  nm pour les nanoparticules  $Fe_3O_4$ -CA contre  $\varnothing_{DRX} = 8,2 \pm 0,8$  nm et  $\varnothing_{TEM} = 8 \pm 2$  nm pour les nanoparticules nues), la surface spécifique des poudres vis-à-vis de leur environnement augmente ( $S_{BET} = 177 \pm 1$  m<sup>2</sup>/g pour les nanoparticules  $Fe_3O_4$ -CA et  $S_{BET} = 104 \pm 1$  m<sup>2</sup>/g pour les nanoparticules nues) et donc leur réactivité vis-à-vis de l'oxygène également. Les molécules DHCA et LDOPA tendent quant à elles à induire le phénomène inverse en augmentant la taille des cristallites d'un facteur deux.

Malgré une augmentation de la taille moyenne des nanoparticules ( $\varnothing_{MET} = 39 \pm 12$  nm), les poudres  $Fe_3O_4$ -DHCA et  $Fe_3O_4$ -LDOPA restent monocristallines. Cette taille plus importante n'empêche pas l'obtention de nanoparticules superparamagnétiques. En effet, une structure particulière est obtenue : continuité cristalline entre des sous unités d'une taille moyenne de 15 nm pour constituer une nanofleur ; elle est à l'origine de la valeur importante de  $r_2$  (Figure 42) en raison d'interactions magnétiques dipolaires élevées.

Les analyses XPS et BET ont montré que les molécules DHCA et LDOPA se fixent en plus grande proportion sur la surface des nanoparticules (Figure 44). En effet, en ATG, 0,3 molécule d'acide citrique/nm<sup>2</sup> se retrouve à la surface des nanoparticules alors que 6,6 molécules de DHCA/nm<sup>2</sup> et 8,9 LDOPA/nm<sup>2</sup> sont présentes. Cette différence induit ainsi un comportement différent en solution.

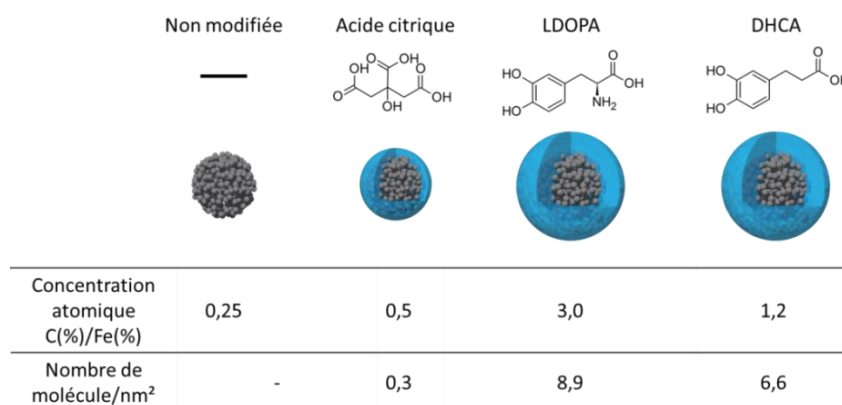


Figure 44 : Evolution des quantités de molécules organiques à la surface des poudres  $Fe_3O_4$ ,  $Fe_3O_4$ -CA,  $Fe_3O_4$ -DHCA et  $Fe_3O_4$ -LDOPA obtenues en conditions hydrothermales et en continu (150°C, 25 MPa et 80 mL.min<sup>-1</sup>)

Enfin, les ligands organiques ont amélioré la stabilité des nanoparticules en suspension dans les différents milieux testés. Cependant, seule la molécule LDOPA a induit une très bonne stabilité en milieu biologique ( $\varnothing_{DLS}(MEM) = 90 \pm 2$  nm) des nanoparticules d'oxydes de fer. Les mesures élevées de  $r_2$  ( $418 \pm 10$  L.mmol<sub>Fe</sub><sup>-1</sup>.s<sup>-1</sup>) confortent une utilisation en IRM.

Ces principales observations ont conduit à la soumission de l'article présenté ci-dessous (§ 2.3.2) et dont les supporting information sont présentées en Annexe 2.

### 2.3.2 Publication 1 soumise à Nanotechnology : One-step continuous synthesis of functionalized magnetite

# One-step continuous synthesis of functionalized magnetite nanoflowers

G. Thomas,<sup>1</sup> F. Demoisson,<sup>1</sup> R. Chassagnon,<sup>1</sup> E. Popova<sup>2</sup> and N. Millot<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Laboratoire Interdisciplinaire Carnot de Bourgogne, UMR 6303 CNRS - Université Bourgogne Franche-Comté, BP 47870, 21078 Dijon cedex, France

<sup>2</sup> GEMaC, CNRS, Université de Versailles-St-Quentin, Université Paris-Saclay, 45 avenue des Etats-Unis, 78035 Versailles, France

E-mail: nmillot@u-bourgogne.fr

**Abstract.** For the first time, nanoflowers of functionalized magnetite nanoparticles ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$  NPs) for the application as  $T_2$  MRI contrast agent have been synthesized using rapid (11 s) one-step continuous hydrothermal process recently modified. The nanoparticles, functionalized with 3,4-dihydroxy-L-phenylalanine (LDOPA) or 3,4-dihydroxyhydrocinnamic acid (DHCA), are constituted of small crystallites of approximately 15 nm, assembled in a flower-shaped structure which forms an aggregate. The special morphology, nanoflowers of  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -LDOPA, exhibits a high transverse relaxivity  $r_2$  of  $418 \pm 10 \text{ L.mmol}_{\text{Fe}}^{-1}.\text{s}^{-1}$  at 3 T due to magnetic dipolar interaction. This relaxivity value is twice that of commercial Feridex®/Endorem®. These specific nanostructures have been both compared to bare  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  NPs and citrated  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  NPs. DHCA, LDOPA and citric acid (CA) impact on the crystallite size and lattice parameter of the iron oxide NPs with an anti-oxidizing effect. Actually, DHCA and LDOPA agents increase the crystallite size whereas citric acid decreases the crystallite size of magnetite. The surface modification improves the colloidal stability of NPs compared to bare NPs. Thus, nanoflowers suspensions of  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -LDOPA NPs are stable in phosphate-buffered saline (PBS), in saline medium and in minimal essential medium (MEM) and lead to aggregates whose size does not exceed 120 nm. All samples are superparamagnetic and the highest saturation magnetization has been obtained for the nanoflowers of  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -LDOPA. These NPs are able to bind to polymers like PEG and fluorescent or chelating agents for dual imaging thanks to the free – $\text{NH}_2$  or – $\text{COOH}$  groups on the surface of the NPs.

**Keywords:** continuous hydrothermal synthesis, magnetite, nanoparticles, nanoflower, LDOPA, DHCA, CA, MRI contrast agent

### 1. Introduction

Magnetic nanoparticles (NPs) such as SuperParamagnetic Iron Oxide Nanoparticles (SPIONs) are of interest for their electronic, catalysis, magnetic and biological properties [1-3]. Magnetite ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) NPs are widely used in various biomedical applications including hyperthermia cancer therapy [4], drug delivery vehicles [5] and Magnetic Resonance Imaging (MRI) [6]. One of the most specific properties of magnetite is its superparamagnetism when crystallite size is smaller than about 20 nm and the particles are in a single domain state [7]. This behavior is essential for MRI applications as *in vivo*  $T_2$  MRI contrast agent [6, 8].

Co-precipitation, thermal decomposition, microemulsion and hydrothermal synthesis in batch reactor allow the synthesis of magnetite  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  NPs [9, 10]. Furthermore, the last way can be achieved by a continuous process [11]. This recent synthesis method is very rapid compared to batch synthesis. Nevertheless, very few studies report the synthesis and the surface modification of magnetite nanoparticle by a one-step hydrothermal synthesis [11-14]. It is a real challenge to obtain only  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  nanoparticles under high pressure, high temperature and high flow. Indeed, it can be difficult to achieve a good control of shape, and a narrow size distribution on a nanometric scale, ensuring the superparamagnetic properties of  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  [11, 13]. Moreover, none study highlight *in vivo* applications of nanoparticles obtained in a one-step and continuous hydrothermal synthesis. In this context, we report and develop stable functionalized magnetite nanoparticles with a high relaxivity  $r_2$  as  $T_2$  MRI contrast agent.

For biomedical applications, some requirements are necessary such as a good biocompatibility, a long-term stability under physiological conditions and a non-specific interaction with the human body. For this purpose,  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  NPs should be well dispersible in blood in order to avoid opsonization and an immunological response. Indeed, hydrophobic surface of bare magnetic NPs can initiate a defense process of the immune system which leads to phagocytosis [15]. Consequently, electrostatic

or steric agents like hydrophilic polymers are necessary to modify the surface of NPs in order to improve the stability, the biocompatibility and the residence time of NPs in tissues. Zwitterionic molecules such as dopamine [16], nitrodopamine [17], alkoxy silanes [18], or citric acid [11, 19, 20] are widely used both as NPs stabilizers and as linkers for other graftings. These molecules have some functional groups such as carboxyl (-COOH) [21] and amine (-NH<sub>2</sub>) [22] available for further graftings.

In this study, we produced surface modified Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> NPs with approximately 15 g of powder (in suspension) per hour thanks to a one-step continuous hydrothermal process including a patented countercurrent flow reactor [23]. The NPs surface was modified by three hydrophilic organic molecules: citric acid (CA), 3,4-dihydroxy-L-phenylalanine (LDOPA) and 3,4-dihydroxyhydrocinnamic acid (DHCA). LDOPA and CA both have an interesting property: they are harmless to human. For example, LDOPA is employed in the Parkinson's disease treatment [24] and CA is found in food products [25]. Several functional groups are present on these molecules (-COOH, -COH and/or -NH<sub>2</sub>). This characteristic allows their grafting on the NPs surface. DHCA and LDOPA have a strong affinity with metal oxides *via* -COH groups of the aromatic cycle [21, 26, 27]. Furthermore, thanks to the free -NH<sub>2</sub> and -COOH groups, it is possible to graft other molecules like polymers or chelating agents for biomedical applications [28]. Catechols reveal good properties as stabilizing agents [21, 29] and an anti-oxidizing activity [30]. In addition, CA is extensively used to obtain aqueous stable magnetite suspension [11, 20, 31]. CA molecule showed also an anti-oxidizing effect on Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> NPs [11, 32]. It prevents the formation of the hematite phase at high temperature [11] and the crystallite growth [11, 33]. Moreover, CA is a stabilizing agent *via* its -COOH groups [11, 31]. Here, we obtained NPs assembled in a particular flower-shaped structure. No other publication reports the continuous synthesis of iron oxide nanoflowers capped with LDOPA or DHCA, in one-step and under hydrothermal conditions. We studied the affinity of each organic molecule to magnetite NPs, the structure and the magnetic properties of these nanostructures.

## 2. Experimental Section

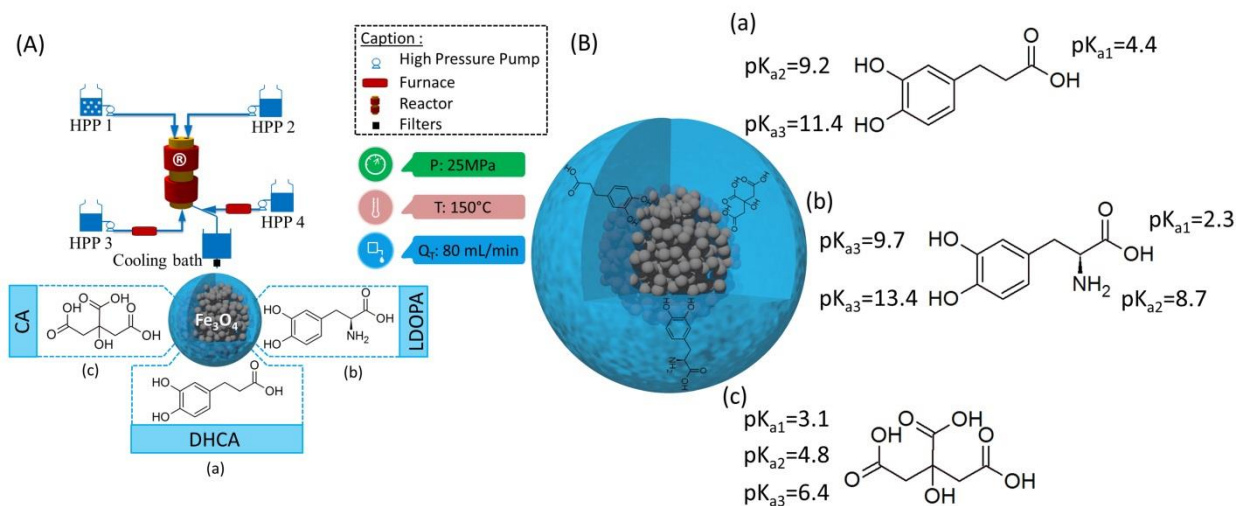
## 2.1 Chemicals

Iron (III) sulfate (97%), ammonium iron (II) sulfate hexahydrate (99%), sodium hydroxide (99%), citric acid monohydrate (99%), LDOPA (98%) and DHCA (98%) were purchased from Sigma Aldrich. Demineralized water ( $\sigma=2.21 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ ) has been used for hydrothermal synthesis. Phosphate buffered saline (PBS) 1X solution was purchased from Fisher Bioreagents and MEM, ProCHO 4 with HEPES and without L-glutamine, phenol red or nucleoside was purchased from Lonza. Extra dry dimethyl sulfoxide anhydrous (DMSO > 99.7%) has been purchased from Acros. DOTA-NHS ester (2,2',2''-(10-(2-((2,5-dioxopyrrolidin-1-yl)oxy)-2-oxoethyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7-triyl)triacetic acid) was provided by CheMatech (Dijon, France). [ $^{64}\text{Cu}$ ] copper chloride ( $^{64}\text{CuCl}_2$ , 1 GBq.mL<sup>-1</sup> in 0.1 N HCl) was purchased from Arronax (Saint-Herblan, France). The radiolabeling yield and the absence of free  $^{64}\text{Cu}$  in the labeled constructs were determined using ITLC-SG strips from Pall Gelman Sciences (Ann Arbor, MI, USA).

## 2.2 Magnetite nanoparticles synthesis

The hydrothermal continuous process is shown in **Figure 1**. At 20°C, a 1:2 molar ratio of ferrous and ferric ions (8 mM and 16 mM respectively) in aqueous solution (High Pressure Pump 1, HPP 1) and a NaOH solution (0.33 M) (HPP 2) have been introduced in the counter-current reactor as well as preheated demineralized water (HPP 3). The reactor has been described in details elsewhere [34]; nevertheless, modifications of this continuous apparatus were carried out in order to optimize the grafting of organic molecules on NPs just after their synthesis. These modifications concern the new inlet line located after the reactor (HPP 4) in **Figure 1** and is described here after. The temperature was monitored and controlled by several thermocouples. Pressure has been kept constant in the whole apparatus thanks to a back pressure regulator located at the outlet. The organic molecules (CA, LDOPA or DHCA) (24 mM) were added to the metallic salt precursors according to the experiment. The suspension was then quickly cooled in two steps: introduction of water (HPP 4) at 20°C and using a cooling bath in order to stop the growth of NPs. All experiments were carried out at 150°C and 25 MPa with a total flow rate of 80 mL.min<sup>-1</sup> (4x20 mL.min<sup>-1</sup>). The synthesized powders were isolated by

centrifugation (24400 g, 10 min) and washed by dialysis (Cellu-Sep<sup>®</sup> tubular membranes of 3500 Da) until the dielectric constant of demineralized water reached ( $2.2 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ ). Samples were then lyophilized to obtain dry powders for subsequent analysis. A part of each sample was kept in suspension and ultrafiltered (Amicon<sup>®</sup> UltraCel 30 KDa) for DLS and TEM measurements.



**Figure 1.** (A) Diagram of the experimental set-up for continuous hydrothermal synthesis of oxide NPs (B) Scheme of  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  NPs coated with (a) DHCA, (b) LDOPA or (c) CA.

### 2.3 Synthesis of the $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -LDOPA-DOTA NPs

50 mg of  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -LDOPA powder coming from the continuous process were added into 10 mL of DMSO. The suspension was placed in an ultrasonic bath during 10 min. Then, 37.5 mg of DOTA-NHS ( $\text{C}_{20}\text{H}_{31}\text{N}_5\text{O}_{10}$ , HPF<sub>6</sub>, TFA) were mixed in the suspension and placed under a magnetic stirring during 4 hours. The modified powder was washed by dialysis (Cellu Sep<sup>®</sup> tubular membranes of 100 kDa).

### 2.4 Radiolabeling of the $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -LDOPA-DOTA NPs by $^{64}\text{Cu}$

The radiolabeling of the  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -LDOPA-DOTA NPs by  $^{64}\text{Cu}$  was realized in a 0.1M buffer of sodium citrate at pH=5. An Instant Thin Layer Chromatography (ITLC) was used to separate free copper and complexed copper. 1  $\mu\text{L}$  of the solution was deposited on ITLC-SG strips at 2 cm of the bottom. Radiolabeled constructs remained at the deposition point while free  $^{64}\text{Cu}$  migrated with the



solvent front. The strips were then analyzed using a  $\gamma$  radiochromatograph (Raytest, Straubenhardt, Germany).

### 2.5 XRD Characterizations

Powder X-Ray Diffraction (XRD) patterns were collected using a Siemens D5000 diffractometer with Cu  $K_{\beta}$  radiation ( $\lambda=1.39222 \text{ \AA}$ ). Scans were acquired over a  $2\theta$  range of  $20\text{-}59^{\circ}$  with a step size of  $0.03^{\circ}$  and a scan speed of 150 seconds per angle. Diffract-AT software was used for data analysis (curve fitting). Correction of instrumental broadening was determined from a standard reference material (Quartz). The mean crystallite size of the samples was calculated by XRD line broadening technique using Halder and Wagner method [35]. The lattice parameter of powders was deduced from XRD line positions using a least-squares refinement method (in-house software taking into account the effect of sample gap).

### 2.6 TEM Observations

Transmission Electron Microscopy (TEM) characterization was performed using a JEOL JEM-2100F microscope operating at 200 kV (point to point resolution of 0.19 nm). The samples were prepared by evaporating a diluted suspension of NPs in deionized water on a carbon-coated copper grid. The average size of crystallites was determined by counting individual SPIONs on each sample (100 crystallites). The size distribution curves of each sample have been calculated *via* a Gaussian fit.

### 2.7 Magnetic Measurements

Magnetic properties of bare and functionalized SPIONs were measured using Quantum Design Physical Property Measurement System (PPMS). The hysteresis curves were recorded at 300 K in  $[-10^4 \text{ Oe}; 10^4 \text{ Oe}]$  range. In order to determine the blocking temperature, magnetic moment of each sample was measured at 500 Oe while heating from 5 K to 320 K after zero-field-cooled (at 0 Oe) or field cooled (at 500 Oe) procedure. The fraction of inorganic matter in each sample (pure  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , CA, DHCA and LDOPA coated  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) was measured using thermogravimetric analysis

(TGA). These results were used to determine the mass of the magnetic matter in a sample. Then, the M(H) curves of each sample were normalized by the corresponding weight of the magnetic material.

The particle relaxivity ( $r_2$  in  $\text{mM}_{\text{Fe}}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ) was calculated according to the following method [36]. Water proton transverse relaxation time ( $T_2$ ) measurements at 3 T were carried out at  $298 \pm 1$  K with a Siemens Magnetom Trio TIM using a commercially available birdcage head coil. Relaxation time measurements were performed on test tubes containing SPIONs in acrylamide gel at different concentrations (1, 3, 5, 7, 10 and 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). For  $T_2$  determination, a multi-echo spin-echo (SE) pulse sequence was used, with TR (repletion time) = 5000 ms, matrix = 256x204, FOV = 100x80 mm and slice thickness = 5 mm. Images were acquired at 32 echoes, from TE = 8 ms to 256 ms with an 8 ms interval. Image analysis was performed using ImageJ (Image Analysis Software developed by NIH, USA). The signal decay curve was fitted using a non-linear function to the equation  $S(\text{TE}) = A \exp(-T_E/T_2)$  and the relaxivity,  $r_2$  (in  $\text{mM}_{\text{Fe}}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ), was then determined by fitting the relaxation rate ( $1/T_2$ ) as a function of iron concentration in  $\mu\text{g}_{\text{Fe}}/\text{mL}$ .

### 2.8 $\zeta$ -Potential Measurements

$\zeta$ -potentials was measured with a Malvern Zetasizer Nano ZS supplied with DTS Nano V4.2 software. The Smoluchowski equation was used for zetametry measurements. For each measurement, powders were dispersed in 12 mL of NaCl aqueous solution ( $10^{-2}$  M). pH titrations were performed using HCl (0.1 M), NaOH (0.1 M) or NaOH (0.01 M) aqueous solutions.

### 2.9 DLS Measurements

Dynamic Light Scattering (DLS) measurements of suspensions in NaCl ( $10^{-2}$  M) were performed at  $25 \pm 0.1$  °C on a Malvern Zetasizer Nano ZS by DTS Nano V4.2 software. Samples were filtered (filter of 0.45  $\mu\text{m}$ ) in order to remove eventual pollutant. Standard deviations were calculated from three measurements performed on the same sample. Samples were analyzed using a backscattering angle ( $173^\circ$ ). The refractive index of  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  NPs is 2.42 and the absorption is equal to 0.029. Hydrodynamic diameters written in the manuscript refer to the Z-average which is the intensity

weighted mean diameter derived from the cumulants analysis. DLS curves were derived from intensity calculation process.

### *2.10 Raman Spectroscopy Measurements*

Raman spectroscopy measurements of dried powders were performed on an inVia Renichaw instrument using an excitation wavelength of 632.8 nm from a laser He/Ne. A power density of  $\sim 3\text{kW}/\text{cm}^2$  was applied on the sample. A baseline correction was applied on the raw spectrum.

### *2.11 InfraRed Spectroscopy Measurements*

InfraRed (IR) spectroscopy measurements were performed using a Bruker Equinox 55 equipped with a DTGS detector and a Globar source. 2 mg of sample were mixed with 200 mg of KBr and pressed to form pellets. The spectra were collected in the wavenumber range of 4000-400  $\text{cm}^{-1}$  (40 scans) with a resolution of 2  $\text{cm}^{-1}$ .

### *2.12 XPS Measurements*

X-ray Photoelectron Spectroscopy (XPS) measurements were collected using a PHI 5000 Versaprobe instrument with an Al  $K\alpha$  monochromated radiation ( $E_{K\alpha}(\text{Al})=1486.7\text{ eV}$  with a 200  $\mu\text{m}$  diameter spot size). Powders were pressed on an indium sheet. Data were analyzed with CasaXPS processing and MultiPak software. Neutralization was used to minimize charge effects and the carbon C1s peak at 284.5 eV was used as the reference. As CA, DHCA and LDOPA molecules are insulating materials, neutralization process was required. A Shirley background was subtracted and Gauss (70%) - Lorentz (30%) profiles were used. Full Width at Half Maximum (FWHM) was fixed between 1.5 and 1.8 eV except for the fitted C1s ( $\pi-\pi^*$ ) peak (2.3 eV). The MultiPak software was employed for quantitative analysis.

### *2.13 TGA Measurements*

Powders were analyzed using a Discovery TGA-TA Instrument with a nitrogen flow rate of 25  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ . A temperature ramp of  $5^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$  from 25  $^\circ\text{C}$  to 800  $^\circ\text{C}$  was applied.

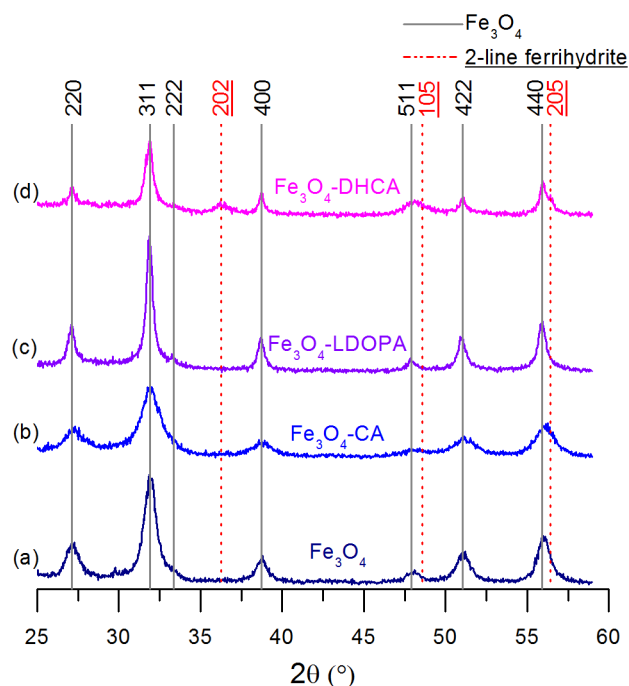
### 2.14 Surface area measurements

Surface area measurements were performed using a Micromeritics Tristar II apparatus. Samples (25-200 mg of powder, depending on the sample) were outgassed *in situ* at 100°C under a pressure of 20 mtorr and the measurements were performed at liquid N<sub>2</sub> temperature with N<sub>2</sub> adsorbing gas. The mean apparent particle diameter,  $\varnothing_{\text{BET}}$ , inferred from surface area (supposing that nanometric crystallites have a smooth and spherical shape with a narrow size distribution) have been calculated, using the equation:  $\varnothing_{\text{BET}}=6000/(\rho*S)$ , where  $\varnothing_{\text{BET}}$  is the mean apparent particle diameter (nm), S is the surface area (m<sup>2</sup>/g) and  $\rho$  the density (5.2 g/cm<sup>3</sup> in the case of magnetite).

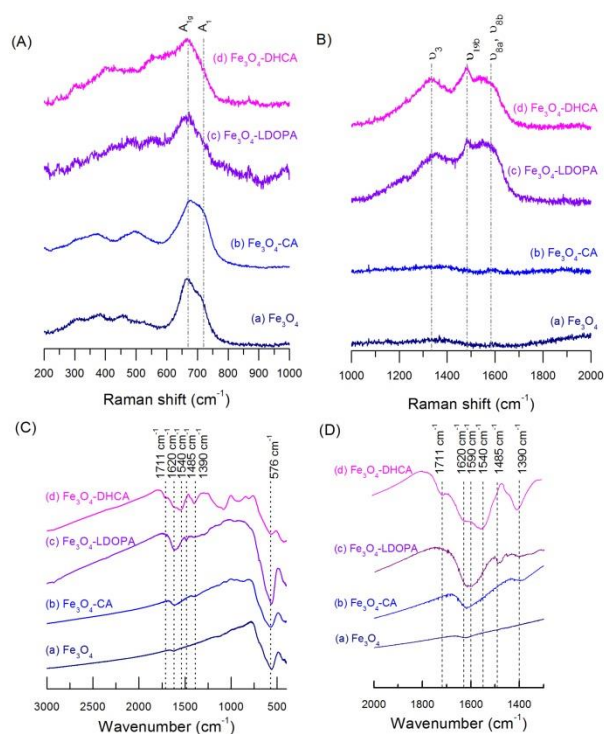
## 3. Results and discussion

### 3.1 Crystal structure and morphology

All the NPs obtained in this study are crystallized (**Figure 2**). The cubic inverse spinel structure is highlighted by the 2 $\theta$  peaks on XRD diagrams, the absorption band around 576 cm<sup>-1</sup> in IR spectroscopy (**Figure 3-(C)**) [37, 38] and the 0.25 nm interatomic distance which corresponds to (311) plans in HRTEM images (**Figure 4**). Indeed, XRD peaks are in good agreement with database (Magnetite ICDD: 19-0629) for all samples. Nevertheless, the synthesis of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-DHCA NPs was also accompanied by the formation of two-line ferrihydrite (Fe(III) oxyhydroxide, precursor of goethite or hematite) which is poorly crystallized with a very small grain size (around 3 nm) (**Figure 2-(d)**) [39]. Amstad *et al.*[29] showed that the addition of electronegative groups on some catechol derivatives lead to complexes with Fe<sup>3+</sup> ions which may initiate the formation of Fe(III) oxyhydroxides or Fe(III) oxides. Nevertheless, according the Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-DHCA diffractogram and the previous report [40], the proportion of ferrihydrite was very low (less than 5% compared to magnetite).



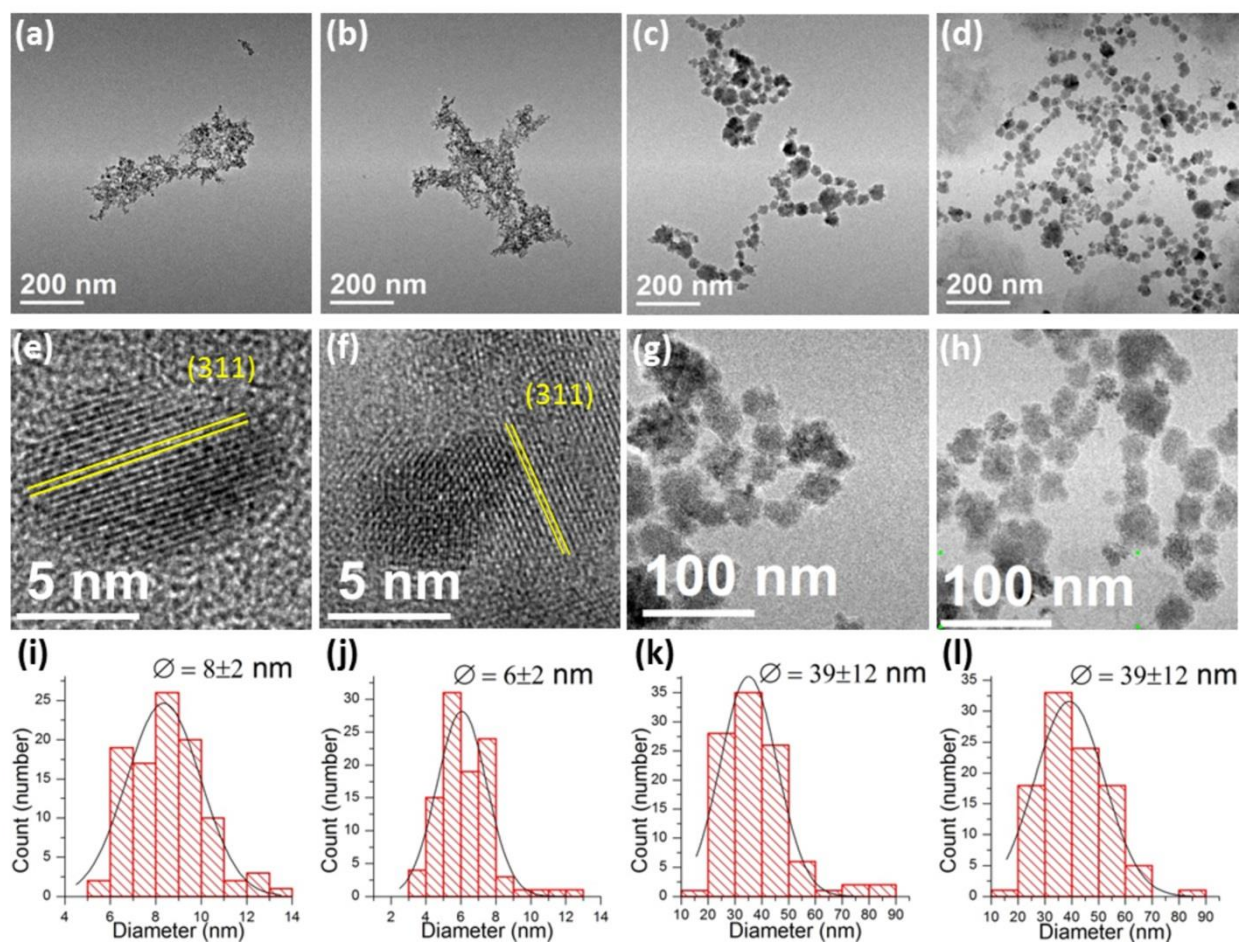
**Figure 2.** XRD patterns of (a) uncoated  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , (b)  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -CA, (c)  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -LDOPA, (d)  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -DHCA NPs ( $\lambda = 1.39222 \text{ \AA}$ ).



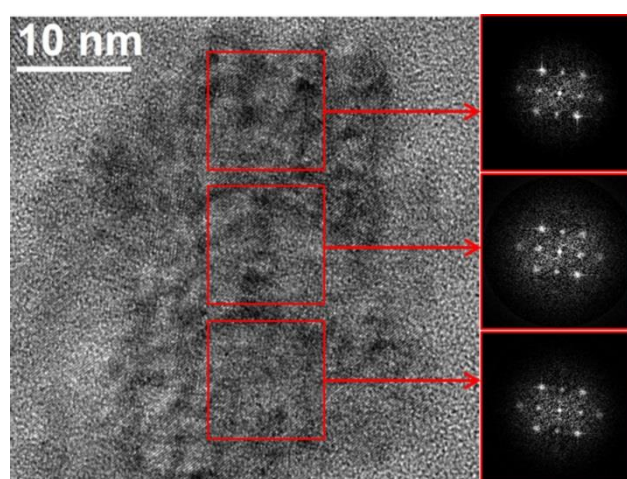
**Figure 3.** Raman spectra collected from (A) 200 to  $1000 \text{ cm}^{-1}$  and from (B) 1000 to  $2000 \text{ cm}^{-1}$  and FTIR spectra collected from (C) 400 to  $3000 \text{ cm}^{-1}$  and from (D) 1300 to  $2000 \text{ cm}^{-1}$  on (a) uncoated  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , (b)  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -CA, (c)  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -LDOPA and (d)  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -DHCA NPs.

Structural parameters are shown in **Table 1**. The average sizes of crystallites deduced from XRD peaks broadening are  $8.2 \pm 0.8$  nm,  $4.8 \pm 0.6$  nm,  $14.9 \pm 0.3$  nm and  $14.8 \pm 0.2$  nm, for uncoated- $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ,  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -CA,  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -LDOPA and  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -DHCA NPs respectively. These results highlight that CA prevents crystallite growth of magnetite NPs, whereas DHCA and LDOPA agents increase this crystallite size, in comparison with pure NPs. In case of uncoated- $\text{Fe}_3\text{O}_4$  and  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -CA, the size of NPs determined from XRD measurements are in good agreement with TEM observations presented in **Table 1** and **Figure 4**. Indeed, the distribution curves show an average size of  $8 \pm 2$  nm and  $6 \pm 2$  nm for  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  and  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -CA respectively. In the case of  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -LDOPA and  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -DHCA samples, these particles are constituted of small crystallites of approximately 15 nm which are assembled in aggregates with a flower-shaped structure (**Figure 4-(c) to -(d)** and **Figure 4-(g) to -(h)**). The nanoflowers size determined from TEM observations follows a Gaussian distribution with a mean diameter of  $39 \pm 12$  nm. We can notice that the size of the coherent domains of the nanoflowers, measured by XRD, is found to be about 15 nm (**Table 1**), which is close to the TEM estimation of the granular substructure of flowers. Such particular morphologies have been first observed by P. Hugounenq *et al.* [41], in case of polyol synthesis of maghemite. In their study, synthesis required 12 hours at  $220^\circ\text{C}$  instead of 11s at  $150^\circ\text{C}$  in our experiments and diethylene glycol (DEG) and N-methyldiethanolamine (NMDEA) additives were necessary in their process to obtain these flower-shaped morphologies. In our case, DHCA and LDOPA molecules seem to perform a similar function. Moreover, an interesting crystalline organization is observed. Indeed, HRTEM images show that the nanoflowers are single crystals constituted of nanoparticles with similar crystalline orientation (**Figure 5**). This is demonstrated by the Fourier transform of the HRTEM image characteristic of a monocrystal (**Figure 5**), here the spinel structure. To explain the difference of crystalline sizes obtained by XRD line profile analysis (about 15 nm) and TEM observation (about 40 nm), we can refer to P. Hugounenq *et al.* [41] They have measured a small crystal structure misalignment from 1 to  $3^\circ$  between nanoparticles of the nanoflowers that could explain the smaller crystalline diameter obtained by XRD.

For same sample preparation (in particular dilution) and same magnification, agglomerates observed for  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  and  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -CA (**Figure 4-(a)** and **Figure 4-(b)**) seem denser and bigger than that observed for  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -LDOPA and  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -DHCA (**Figure 4-(c)** to **-(d)**); in these last cases, NPs are organized as a string of nanoflowers. If we compared the sizes of our products, obtained in a continuous way, with DHCA and LDOPA modified magnetite NPs obtained in batch reactors, we clearly produced both smaller aggregates and crystallites. For example, Togashi *et al.* obtained  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -DHCA raspberry-like aggregates with diameters varying from 50 to 400 nm (for synthesis duration from 10 to 120 min at 200°C); these aggregates consisted of tiny  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  crystallites with a diameter of 20 nm [42]. In another publication, Niu *et al.* highlighted a one-pot synthesis of LDOPA functionalized water-dispersible magnetite: they obtained spherical aggregates of 350 nm composed of crystallites of 10 nm [43]. Specific surface area measurements confirm TEM and XRD observations (**Table 1**).



**Figure 4.** TEM ((a)-(d), (g) and (h)), HRTEM ((e) and (f)) and TEM diameters distributions ((i)-l) of uncoated  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  ((a), (e) and (i)),  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-CA}$  ((b), (f) and (j)),  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-LDOPA}$  ((c), (g) and (k)) and  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-DHCA}$  ((d), (h) and (l)) NPs.



**Figure 5.** HRTEM image of a nanoflower of  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-LDOPA}$  and Fourier transforms of different areas of this image.



In conclusion, our continuous way, with a high throughput rate of synthesis compared to batch reactor, using DHCA and LDOPA as grafting agents, decreases the average size of aggregates, limits the crystallites size but allows the formation of unusual flower-shaped structures.

**Table 1.** Structural and magnetic parameters of uncoated Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-CA, Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-DHCA and Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-LDOPA NPs. *a* is the lattice parameter,  $\delta$  is the deviation from oxygen stoichiometry of Fe<sub>3(1- $\delta$ )</sub>O<sub>4</sub>,  $\varnothing_{\text{XRD}}$  is the mean diameter measured by XRD,  $\varnothing_{\text{TEM}}$  is the mean diameter measured by TEM on 100 crystallites (for a) and b)) and on 100 nanoflowers (for c) and d) ), *D<sub>H</sub>* is the *hydrodynamic diameter at pH=7 in NaCl (10<sup>-2</sup>M) aqueous solution*, *S<sub>BET</sub>* is the surface area and  $\varnothing_{\text{BET}}$  the mean diameter inferred from this surface area. *M<sub>s</sub>* is the saturation magnetization measured at 10<sup>4</sup> Oe (extrapolated in case of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> and Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-CA, see SI), *T<sub>B</sub>* is the blocking temperature,  $\varnothing_{\text{MAG}}$  is the magnetic particle diameter obtained by fitting the M(H) curves with the Langevin function at 300 K

NPs	<i>a</i> (Å)	$\delta$	$\varnothing_{\text{XRD}}$ (nm)	$\varnothing_{\text{TEM}}$ (nm)	<i>D<sub>H</sub></i> (nm)	<i>S<sub>BET</sub></i> (m <sup>2</sup> .g <sup>-1</sup> )	$\varnothing_{\text{BET}}$ (nm)	<i>M<sub>s</sub></i> (emu.g <sup>-1</sup> )	<i>T<sub>B</sub></i> (K)	$\varnothing_{\text{MAG}}$ (nm)
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	8.376 ± 0.001	0.042	8.2 ± 0.8	8 ± 2	434 ± 26	104 ± 1	11.1 ± 0.1	56	76	11.3
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -CA	8.362 ± 0.002	0.072	4.8 ± 0.6	6 ± 2	137 ± 4	177 ± 1	6.5 ± 0.1	51	76	10.8
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -LDOPA	8.396 ± 0.003	0.000	14.9 ± 0.3	39 ± 12	106 ± 2	50 ± 2	23.1 ± 0.9	65	158	16.7
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -DHCA	8.393 ± 0.006	0.006	14.8 ± 0.2	39 ± 12	124 ± 2	40 ± 1	28.8 ± 0.7	57	165	17.3

### 3.2 Deviation from oxygen stoichiometry

The lattice parameters (**Table 1**) of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-DHCA (*a*<sub>DHCA</sub> = 8.393 ± 0.006 Å) and Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-LDOPA (*a*<sub>LDOPA</sub> = 8.396 ± 0.003 Å) are very close to the reported value [44] of pure bulk Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> which is 8.396 Å whereas the lattice parameter of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-CA (*a*<sub>CA</sub> = 8.362 ± 0.002 Å) and uncoated-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> (*a*<sub>uncoated</sub> = 8.376 ± 0.001 Å) are lower. These values highlight that Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-DHCA and Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-LDOPA NPs are not oxidized whereas Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-CA and Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> NPs are slightly oxidized. The deviation from oxygen stoichiometry ( $\delta$ ) in the formula Fe<sub>3(1- $\delta$ )</sub>O<sub>4</sub> determined from lattice parameter of NPs [45] confirms that uncoated Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> ( $\delta$ =0.042) and Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-CA ( $\delta$ =0.072) NPs are more oxidized than magnetite NPs coated with DHCA ( $\delta$ =0.006) or LDOPA ( $\delta$ =0.000), showing an anti-oxidizing effect of catechol derivatives during the synthesis. As for citrates, they induce a halving of the crystallite size

(**Table 1**) (from  $8.2 \pm 0.8$  nm without organic molecules to  $4.8 \pm 0.6$  nm with citrates). Due to this smaller size, the surface reactivity of magnetite with oxygen environment is more important which may explain the higher value of  $\delta$  (0.072 instead of 0.042). In the case of catechol derivatives, the crystallite size increases by a factor of two, the surface area is smaller (**Table 1**), leading to a smaller reactivity with the oxygen of the environment, phenomenon promoted by the organization in a flower shaped structure.

Raman spectroscopy (**Figure 3-(A)**) also proved the anti-oxidant effect of DHCA and LDOPA. Indeed, characteristic band of magnetite at  $668 \text{ cm}^{-1}$  assigned to the  $A_{1g}$  transition is observed for each sample [11, 46]. It is a symmetric peak without shoulder for  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -DHCA and  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -LDOPA NPs. However, the presence of a shoulder at  $720 \text{ cm}^{-1}$  is observed for  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  and  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -CA NPs. This may confirm the partial oxidation of magnetite deduced from XRD diagrams. Indeed this latter contribution comes from a very thin layer of maghemite at the surface of the magnetite NPs [11]. For all powders, the hematite phase (with or without organic molecules) was absent in spite of hydrothermal condition synthesis (high temperature and high pressure).

We can notice in XPS spectra that bare and modified NPs (by DHCA, LDOPA and CA) showed the presence of Fe  $2p_{3/2}$ , Fe  $2p_{1/2}$  and Fe  $2p_{3/2}$  satellite peaks respectively at 710.4 eV, 723.9 eV and 718.6 eV (in the case of bare  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  NPs) (**Figure S1**) [47]. The binding energy difference between the Fe  $2p_{3/2}$  peak and the satellite peak is approximately 8.2 eV for all samples (**Table S1**). This value is classically related to the oxidation degree of iron cations and changes with the presence of  $\text{Fe}^{2+}$  or  $\text{Fe}^{3+}$ : it is 8 eV in the case of  $\text{Fe}^{3+}$  and 6 eV in the case of  $\text{Fe}^{2+}$  [48]. That means that in our case, XPS doesn't allow any discrimination between our samples in terms of deviation from oxygen stoichiometry.

To conclude this part, CA prevents crystallite growth in agreement with previous works [11, 31] while DHCA and LDOPA prevent oxidation with an increase of the crystallite size and the formation of flower-shaped structure. The addition of organic compounds during the formation of NPs can modify the chemical and structural properties of the material. To confirm the grafting of organic

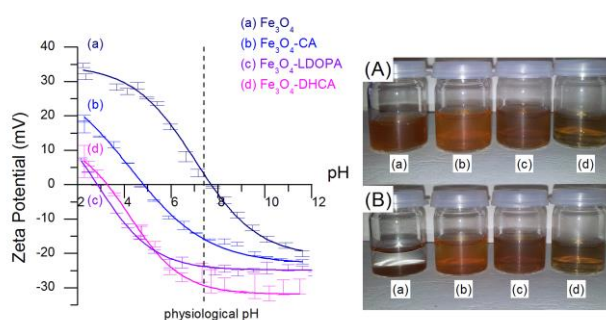
molecules on the NPs surface, TGA,  $\zeta$ -potential measurements, Raman, IR and XPS spectroscopies have been performed.

### 3.3 Surface properties and colloidal stability

TGA measurements prove the grafting of organic stabilizers on the surface of NPs (**Figure S2**). The weight losses for modified NPs are more important than that of uncoated NPs. Between 25 and 100°C, the weight loss is attributed to physisorbed water. Above this temperature, organic molecules on the surface of NPs are degraded. The weight loss is more important for Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-DHCA and Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-LDOPA samples. Thanks to these values combined to surface area measurements (**Table 1**) the coverage rates (number of organic molecules on the surface of NPs) have been determined: 0.3 molecule of CA/nm<sup>2</sup>, 8.9 molecules of LDOPA/nm<sup>2</sup>, 6.6 molecules of DHCA/nm<sup>2</sup>.

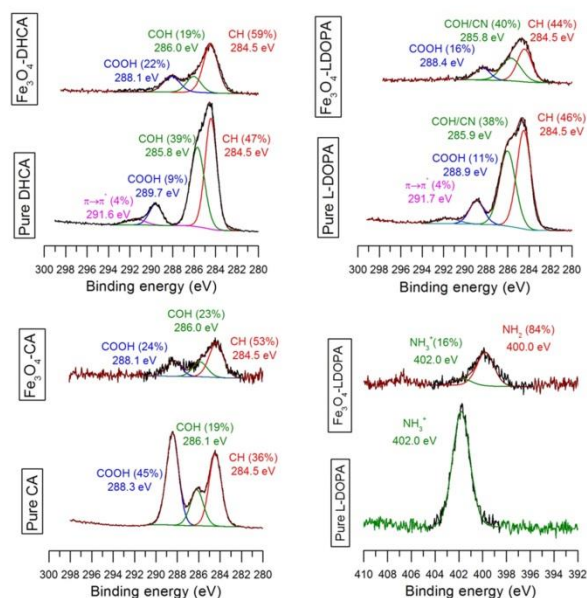
About  $\zeta$ -potential results (**Figure 6**), the isoelectric point (IEP) of 8 for uncoated NPs is in good agreement with literature [49]. The IEP of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> NPs synthesized in the presence of organic molecules decreases to acidic pH (**Figure 6-(b) to -(d)**). These shifts are in accordance with the grafting of molecules with carboxylic groups on Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> NPs surface. At physiological pH, the carboxylate groups of organic molecules seem to be responsible of the negative  $\zeta$ -potential in view of the different values of pKa (**Figure 1-(B)**). At this pH (7.4), the  $\zeta$ -potential of uncoated NPs is almost equal to zero, which explains the instability of the suspension (**Figure 6-(B)**). The  $\zeta$ -potential values of coated NPs, at physiological pH (-21, -25, -30 mV respectively for Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-CA, -LDOPA, -DHCA) justify the stabilization of the NPs suspension by electrostatic repulsive effect. Moreover, the colloidal stability of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-CA, Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-DHCA and Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-LDOPA suspensions in water are proven by DLS results (**Table 1**). For each sample, a hydrodynamic diameter of  $137 \pm 4$  nm,  $124 \pm 2$  nm and  $106 \pm 2$  nm is respectively obtained. These values are low compared to that of bare NPs ( $D_H = 434 \pm 26$  nm). However these results show the formation of small aggregates in good agreement with TEM images (**Figure 4**). Measurements of the hydrodynamic diameters of these different SPIONs in PBS and in

MEM are presented in the supporting information section (**Figure S3**). Bare NPs are less stable in NaCl  $10^{-2}$ M and MEM medium than modified NPs. Accordingly, they cannot be used for biomedical applications, as previously pointed out. Only Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-LDOPA NPs are stable in all media and lead to aggregates whose sizes do not exceed 120 nm (**Table S2**). Bigger aggregates of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-DHCA are observed in PBS and MEM. LDOPA seems to be the more appropriate molecule, grafted on the surface of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, to improve the colloidal stability of NPs. This may be due to the presence of two functional groups that could be charged: carboxylate and amine functional groups.



**Figure 6.** Zetametry of (a) uncoated Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, (b) Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-CA, (c) Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-LDOPA and (d) Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-DHCA NPs and stability of (a) uncoated Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, (b) Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-CA, (c) Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-DHCA and (d) Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-LDOPA powder suspensions of NPs, in NaCl  $10^{-2}$ M at pH 7.4, after 1 hour (A) and after 6 hours (B). Powders are dispersed in 3 mL of NaCl  $10^{-2}$ M at pH 7.4.

XPS spectroscopy (**Figure 7**) confirms the grafting of each organic molecule on the NPs surface. In XPS spectra (**Figure 7**), the C(1s) level of reference samples (uncoated Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, pure powders of CA, DHCA and LDOPA) and coated Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> NPs have been fitted taking into account the C-H, C-OH, O=C-OH and  $\pi \rightarrow \pi^*$  contributions (**Table 2**). Peaks positions are in good agreement with literature [21, 50, 51]. As for atomic concentration (**Table 3**), carbon content increases for Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-CA, -LDOPA, -DHCA NPs compared to bare NPs. These results confirm that organic molecules are present on the surface of NPs. The carbon on uncoated Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> NPs comes from contamination resulting from the exposure of NPs to the atmosphere. The presence of N(1s) peak (**Figure 7**) and the increase of N concentration (**Table 3**) for Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-LDOPA sample also confirm that LDOPA is grafted on NPs.



**Figure 7.** XPS spectra of curve fitted C(1s) and N(1s) peaks recorded on reference samples and coated Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> NPs.

**Table 2.** Binding energy of curve fitted C(1s) and N(1s) peaks from XPS spectra recorded on reference samples and coated Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> NPs.

Binding Energy (eV)	C(1s)			N(1s)		
	C-H	C-OH/C-N	O=C-OH	$\pi \rightarrow \pi^*$		
DHCA	284.5	285.8	289.7	291.6	-	
LDOPA	284.5	285.9	288.9	291.7	402.0	
CA	284.5	286.1	288.3	-	-	
Uncoated Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	284.5	286.0	288.3	-	-	
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -DHCA	284.5	286.0	288.1	-	-	
Coated Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> NPs	Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -LDOPA	284.5	285.9	288.4	-	400.0
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -CA	284.5	286.0	288.1	-	-	

**Table 3.** Atomic concentration determined by XPS.

	C (%)	O (%)	N (%)	Fe (%)	C(%) / Fe(%)
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	9	55	-	36	0.3
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -CA	16	51	-	33	0.5
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -LDOPA	42	40	4	14	3.0
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -DHCA	28	49	-	23	1.2

In Raman spectra, a narrow peak at 1485 cm<sup>-1</sup> ( $\nu_{19b}$ ) assigned to aromatic cycle of the catechols [52-55], skeletal modes of the benzene rings [54]  $\nu_3$  at 1337 cm<sup>-1</sup> and in-plane ring stretches ( $\nu_{8a}$  and  $\nu_{8b}$ ) around to 1586 cm<sup>-1</sup> are observed [56] for Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-DHCA and Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-LDOPA NPs (**Figure 3-(A)** and **-(B)**). The aromatic cycle of catechols is also detected by IR spectroscopy which indicates that catechol is near to the oxide surface (**Figure 3-(C)** and **-(D)**) [57]. A slight shoulder at 1540 cm<sup>-1</sup> may be attributed to C=C aromatic stretching and the band at 1390 cm<sup>-1</sup> is assigned to OH vibrations [58]. Moreover, IR spectra of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-LDOPA and Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-DHCA show a band at 1620 cm<sup>-1</sup>, characteristic of free -COOH. Concerning Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-CA NPs, this same band and the 1390 cm<sup>-1</sup> band in IR spectrum, which represents respectively the -COOH group of citric acid and OH vibrations, confirm the presence of citric acid on the surface of NPs. However, the C=O (1708 cm<sup>-1</sup>) and C-C (1340 cm<sup>-1</sup>) vibration modes of the citrates are not detected by Raman spectroscopy [59], that suggests that the citrate concentration is low on the Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> surface, which has been already established by TGA measurements (there is only 0.3 molecule of CA/nm<sup>2</sup> instead of 8.9 molecule of LDOPA/nm<sup>2</sup>). This fact is also confirmed by XPS spectroscopy (**Table 3**) and  $\zeta$ -potential measurements (**Figure 6**). Indeed, the  $\zeta$ -potential values of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-CA NPs, at physiological pH (-16mV) is smaller in absolute value than Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-LDOPA (-25mV) and Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-DHCA (-30mV). Then, the electrostatic effect of CA on NPs suspension stability is weaker than that of DHCA and LDOPA which can be explained by the lower grafting rate of CA on Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> NPs in agreement with TGA and Raman spectroscopy. Moreover XPS results show that the atomic concentration ratios  $C_{DHCA}(\%)/Fe(\%)$  and  $C_{LDOPA}(\%)/Fe(\%)$  are higher than  $C_{CA}(\%)/Fe(\%)$  (1.2 for Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-DHCA), 3.0 for Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-LDOPA and 0.5 for Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-CA). In our synthesis and purification conditions, DHCA and LDOPA seem to have a better affinity than citric acid with the surface of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> which enhance the stability of NPs in suspension (**Figure 6**).

IR and Raman spectroscopies also give us some relevant information about the conformation of organic molecules on NPs surface. Hurst *et al.* [54] suggested that the two hydroxyl of catechol groups bound to the surface of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> NPs *via* Fe-OH sites to form a bidentate binding. Parikh *et al.* [60] also showed that the amine group did not interact with oxide surfaces. Furthermore, Hurst *et al.* [54] showed that TiO<sub>2</sub> particles functionalized with phenol did not exhibit a Raman signal in the region of 1100-1600 cm<sup>-1</sup> whereas those functionalized with catechol (such as DHCA and LDOPA) exhibit distinct and intense Raman signals. That is why, in our study, the presence of signals in the range of 1000 cm<sup>-1</sup> and 1600 cm<sup>-1</sup> in Raman and IR figures (**Figure 3-(B)** and **Figure 3-(C)** respectively) suggests that a bidentate binding is formed with the two hydroxyl groups and the surface of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> NPs. The stretching mode of the aromatic cycle of the catechol, ( $\nu_{19b}$ ) in Raman spectra (**Figure 3-(B)**) and 1485 cm<sup>-1</sup> peak in IR spectra (**Figure 3-(C)** and **Figure 3-(D)**), highlight this bond between the hydroxyl groups of aromatic cycle and the iron of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> NPs [54, 57]. Moreover, according to Lee *et al.* the 1:1 molar ratio of (LDOPA or DHCA):Fe ions that we have chosen and a basic pH may enhance a standing up conformation of these organic molecules on the NPs surface.[52] In our study, the absence of 1301 cm<sup>-1</sup> peak in the Raman spectra (**Figure 3-(B)**) for Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-DHCA and Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-LDOPA suggests that the carboxylic group did not interact with the surface of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> NPs.[52] This is confirmed by IR spectra (**Figure 3-(C)**) of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-DHCA and Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-LDOPA that show a band at 1620 cm<sup>-1</sup>, characteristic of free -COOH. Also, the slight peak at 1711 cm<sup>-1</sup> may be assigned to -COOH stretching of DHCA lateral chain [61]. Nevertheless, there is a slight shoulder at 1590 cm<sup>-1</sup> which could suggest that COOH groups are bound with Fe [13]. Same results are observed on XPS. A slight shift of O=C-OH peaks is observed between references samples (pure DHCA and pure LDOPA) and Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> NPs coated with DHCA and LDOPA. Weinhold *et al.* [50] attributed this shift to an interaction between the charge state of CO<sub>2</sub><sup>-</sup> group and the Au(110) surface. Regarding Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-LDOPA, the shift at 288.1 eV (0.5 eV) is lower: the -NH<sub>2</sub> may reduce the electrostatic interaction between the charge state of CO<sub>2</sub><sup>-</sup> group and the Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> surface.

A shift of 2.0 eV of the N(1s) peak on XPS spectra (**Figure 7**) is observed between LDOPA reference (402.0 eV) and Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-LDOPA NPs (400.0 eV). This shift is quite close to the N(1s) binding energy difference (1.8 eV) between -NH<sub>3</sub><sup>+</sup> and -NH<sub>2</sub> groups [51]. Indeed, N(1s) peaks at 400.0 eV and

402.0 eV are classically assigned to the neutral amino group  $\text{-NH}_2$  and the positively charged ammonium group  $\text{-NH}_3^+$  respectively [62]. This result was predictable since the synthesis of powders took place in basic condition leading to a greater contribution of  $\text{-NH}_2$  (84%) in comparison with  $\text{-NH}_3^+$  groups (16%) (**Figure 7**). Moreover, no peak at 402.1 eV ( $\text{Fe(II)-NH}_2$ ), or 401.6 ( $\text{Fe(III)-NH}_2$ ) are observed [63]. In conclusion XPS results show that  $\text{-NH}_2$  group does not interact with the surface of  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  NPs in this study.

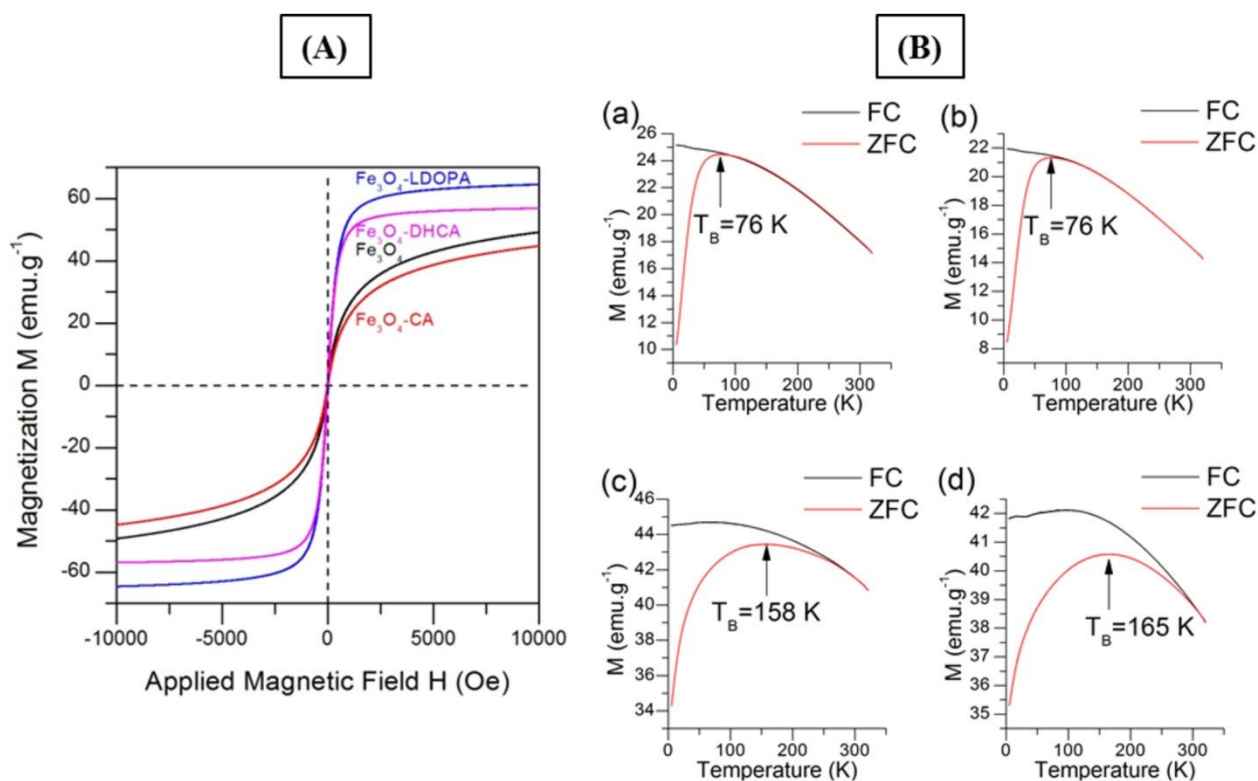
Concerning  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -CA observed thanks to IR spectroscopy, the wide peak around  $1600\text{ cm}^{-1}$  (**Figure 3-(D)**) also suggests that a part of carboxylic groups is linked to the surface of  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  NPs. XPS results are in good agreement with previous work [11]. Indeed binding energy of  $\text{O=C-OH}$  and  $\text{C-OH}$  groups are close to Maurizi *et al.*: [11] citric acid seems to be grafted on the surface of  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  NPs via carboxylic groups.

TGA,  $\zeta$ -potential measurements, IR, Raman and XPS spectroscopy establish that citric acid, LDOPA and DHCA molecules are grafted on the surface of NPs during the continuous synthesis under hydrothermal conditions. However, the colloidal stability of the suspensions obtained and the quantity of molecules grafted is clearly different between the samples.

### 3.4 Magnetic properties

Magnetic properties of the bare and modified NPs have been measured (**Figure 8** and **Table 1**).



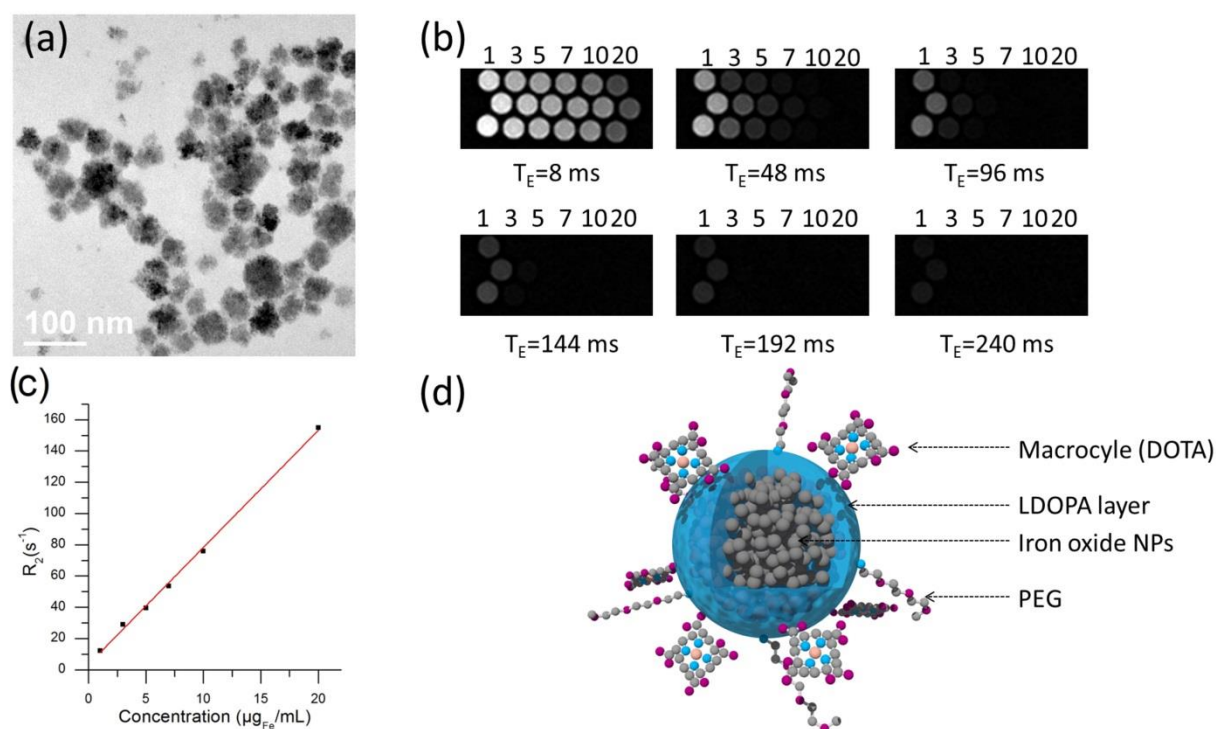


**Figure 8.** (A) Magnetization curve of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> NPs measured at 300K and (B) FC/ZFC curves under a field of 500 Oe for (a) Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, (b) Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-CA, (c) Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-LDOPA and (d) Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-DHCA NPs.

The  $M(H)$  curves for all four samples show no hysteresis and are completely reversible at 300 K: neither coercivity nor remanence were observed (**Figure 8-(A)**). NPs exhibited a typical superparamagnetic behavior. Due to the asymptotic increase of magnetization for high fields in case of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> and Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-CA NPs (**Figure 8-(A)**), the saturation magnetization value can be obtained from the fitting of the  $M$  vs.  $1/H$  curves, extrapolating the magnetization value to  $1/H = 0$  (**Figure S4**). The saturation magnetizations are 56 emu.g<sup>-1</sup>, 51 emu.g<sup>-1</sup>, 65 emu.g<sup>-1</sup> and 57 emu.g<sup>-1</sup> at 10<sup>4</sup> Oe for Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-CA, Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-LDOPA and Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-DHCA sample, respectively. These magnetization values are lower than the theoretical saturation magnetization of the bulk magnetite (92 emu.g<sup>-1</sup>) [11, 13]. This effect, usually observed for NPs, may be explained by spin disorder and spin canting at the particle surface [10]. However, the relatively high  $M_s$  value of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-LDOPA nanoflowers (65 emu.g<sup>-1</sup>) could be explained by both their large size and high crystallinity. Furthermore, in some studies [64], catechols modify the spin orientation on the surface of NPs. For example, this modification increases the saturation magnetization  $M_s$  of NPs as observed in our case. Indeed, we obtained a value of 65

emu.g<sup>-1</sup> (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-LDOPA) compared to 56 emu.g<sup>-1</sup> (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>). The fitting of the M(H) curves with the Langevin function [65] allows to determine the average magnetic particle diameters: 11.3 nm, 10.8 nm, 16.7 nm and 17.3 nm for Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>CA, Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-LDOPA and Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-DHCA sample, respectively. These particle sizes are slightly larger than the values determined from XRD measurements. Taking into account the surface spin disorder that normally reduces magnetic diameter of a particle, it is evident that there is a magnetic interaction between particles that leads to increase of the measured average magnetic diameter of a Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> particle. In the case of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-CA NPs, the ligand coverage is proved to be thinner than for DHCA and LDOPA covered particles and, therefore, the interaction must be stronger and average magnetic size of a particle is doubled. Another parameter to describe superparamagnetism is the blocking temperature T<sub>B</sub> which is a transition point between superparamagnetic and ferromagnetic behaviors. The blocking temperature is determined experimentally from the Zero Field-Cooled (ZFC)/Field-Cooled (FC) curves (**Figure 8-(B)**). NPs modified by LDOPA and DHCA exhibit blocking temperatures of 158 K and 165 K, respectively (**Figure 8-(B)-(c)** and **-(d)**). Thus, they exhibit a superparamagnetic behavior at room temperature. The same blocking temperature measured for uncovered Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> and Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-CA NPs is consistent with the similar average magnetic diameter deduced from the respective M(H) curves.

Finally, the relaxivity value ( $418 \pm 10 \text{ L.mmol}_{\text{Fe}}^{-1}.\text{s}^{-1}$ ) obtained at 3 T for LDOPA modified nanoflowers (**Figure 9-(a)**) is very high (**Figure 9-(b)** to **-(c)**). In comparison, the commercial contrast agent based on SPIONs (Cliavist®), measured in the same conditions, shows a value of  $194 \pm 15 \text{ L.mmol}_{\text{Fe}}^{-1}.\text{s}^{-1}$ ). This particular nanostructure (aggregates of organized nanocrystallites) improves magnetic dipolar interactions because the distance between crystallites is very small. This proximity enhances dipolar interactions which can be favorable to the increase of r<sub>2</sub> value. In addition, it has been reported that the grafting of catechols contribute to spin orientation on the surface of NPs [64]. Consequently, in our study, both nanoflowers structure and LDOPA grafting may enhance the relaxation of water protons with a high r<sub>2</sub> value as observed **Figure 9-(c)**.



**Figure 9.** (a) TEM image of nanoflower like Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-LDOPA NPs, (b) T<sub>2</sub>-weighted MR images of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-LDOPA NPs at various concentrations of iron at 3T (1, 3, 5, 7, 10 and 20 µg<sub>Fe</sub>/mL) and various echo time different echo time in ms (TE), (c) Plot of R<sub>2</sub> (1/T<sub>2</sub>) in s<sup>-1</sup> versus various concentration of iron (µg/mL) and (d) drawing of a functionalized nanoparticle Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-LDOPA for bimodal imaging (Magnetic Resonance Imaging (MRI)/Positron Emission Tomography (PET)) with PolyEthylene Glycol (PEG) and 1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7,10-tetraacetic acid (DOTA).

Lastly, we succeeded in the development of a dual imaging probe (MRI/PET) (**Figure 9-(d)**) from Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-LDOPA powder. 0.8 DOTA/nm<sup>2</sup> have grafted on the NPs surface (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-LDOPA) (determined by TGA measurements). Approximately 73% of injected radioactive copper (<sup>64</sup>Cu) have been chelated by the DOTA macrocycles grafted on the surface of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-LDOPA NPs synthesized by our continuous hydrothermal process (data not shown). This high value of chelation (before radiochemical purity) highlighted that NH<sub>2</sub> groups of LDOPA were free. Moreover, this nanohybrid is very efficient. Indeed, it combines the high spatial resolution of MRI and the high sensitivity of PET. This efficient grafting and radiolabeling prove that Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-LDOPA NPs are suitable for the grafting of organic molecules like PEG and macrocycles.

## 4. Conclusions

For the first time, unusual nanoflowers of functionalized magnetite nanoparticles ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$  NPs) for  $T_2$  MRI contrast agent purpose were developed. These nanoparticles, covered with LDOPA or DHCA, were synthesized in a very short time of reaction (11s) using a specific one-step continuous hydrothermal process which is an economically and environmentally sustainable synthesis of surface-modified oxide NPs. Despite the short time of reaction ( $\sim 11$ s), the high temperature ( $150^\circ\text{C}$ ) and pressure (25MPa), which usually lead to the formation of hematite, we obtained magnetite thanks to the presence of the specific organic molecules. These molecules modified the characteristics of the NPs. DHCA and LDOPA led to an anti-oxidizing effect on the formation of magnetite during the synthesis. Moreover, CA, DHCA and LDOPA agents affect the crystallite size. Concerning the behavior of  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  NPs in suspension, DHCA and LDOPA improve the stability compared to CA agent, leading to stable suspensions of nanoflowers. LDOPA, grafted on the surface of  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , is the more appropriate molecule to improve the colloidal stability of the NPs in several media often used in biology (NaCl solution, PBS and MEM). The specific morphology of nanoflowers exhibits a high transverse relaxivity  $r_2$  at 3 T. These first results and NPs are very promising for application as  $T_2$  MRI contrast agent. Moreover, the  $-\text{NH}_2$  groups and free  $-\text{COOH}$  groups are available and ready to ensure grafting with other molecules like PEG, fluorescent or chelating agents. This versatility of grafting possibilities paves a way towards dual imaging such as MRI/PET (Positron Emission Tomography).

### Acknowledgments

The authors would like to thank Dr. Lucien Saviot for his help in Raman spectroscopy investigations, Dr. Olivier Heintz for XPS analysis, Dr. Paul Walker for relaxivity measurements and Dr. Mathieu Moreau for radiolabeling.

### Funding Sources

Authors gratefully thank the Conseil Régional de Bourgogne and the CNRS (*Centre National de la Recherche Scientifique*) for financial support. E.P. acknowledges financial support from “C’Nano - IdF” network (grant n°IF-08-1453/R).

## REFERENCES

- [1] Zhang L, Dong W F and Sun H B 2013 Multifunctional superparamagnetic iron oxide nanoparticles: design, synthesis and biomedical photonic applications *Nanoscale* **5** 7664-84
- [2] Hayashi K, Nakamura M, Sakamoto W, Yogo T, Miki H, Ozaki S, Abe M, Matsumoto T and Ishimura K 2013 Superparamagnetic nanoparticle clusters for cancer theranostics combining magnetic resonance imaging and hyperthermia treatment *Theranostics* **3** 366
- [3] Ittrich H, Peldschus K, Raabe N, Kaul M and Adam G 2013 Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles in Biomedicine: Applications and Developments in Diagnostics and Therapy *Rofo-Fortschritte Auf Dem Gebiet Der Rontgenstrahlen Und Der Bildgebenden Verfahren* **185** 1149-66
- [4] Tsiapa I, Efthimiadou E K, Fragogeorgi E, Loudos G, Varvarigou A D, Bouziotis P, Kordas G C, Mihailidis D, Nikiforidis G C, Xanthopoulos S, Psimadas D, Paravatou-Petsotas M, Palamaris L, Hazle J D and Kagadis G C 2014 Tc-99m-labeled aminosilane-coated iron oxide nanoparticles for molecular imaging of alpha(v)beta(3)-mediated tumor expression and feasibility for hyperthermia treatment *Journal of Colloid and Interface Science* **433** 163-75
- [5] Sun C, Lee J S H and Zhang M 2008 Magnetic nanoparticles in MR imaging and drug delivery *Adv. Drug Delivery Rev.* **60** 1252-65
- [6] Neuwelt E A, Hamilton B E, Varallyay C G, Rooney W R, Edelman R D, Jacobs P M and Watnick S G 2009 Ultrasmall superparamagnetic iron oxides (USPIOs): a future alternative magnetic resonance (MR) contrast agent for patients at risk for nephrogenic systemic fibrosis (NSF)? *Kidney Int.* **75** 465-74
- [7] Rosensweig R E 1985 *Ferrohydrodynamics Cambridge University Press*
- [8] Maurizi L, Papa A-L, Dumont L, Bouyer F, Walker P, Vandroux D and Millot N 2015 Influence of Surface Charge and Polymer Coating on Internalization and Biodistribution of Polyethylene Glycol-Modified Iron Oxide Nanoparticles *J. Biomed. Nanotechnol.* **11** 126-36
- [9] Wu W, He Q and Jiang C 2008 Magnetic Iron Oxide Nanoparticles: Synthesis and Surface Functionalization Strategies *Nanoscale Res Lett* **3** 397-415
- [10] Daou T J, Pourroy G, Bégin-Colin S, Grenèche J M, Ulhaq-Bouillet C, Legaré P, Bernhardt P, Leuvre C and Rogez G 2006 Hydrothermal Synthesis of Monodisperse Magnetite Nanoparticles *Chem. Mater.* **18** 4399-404
- [11] Maurizi L, Bouyer F, Paris J, Demoisson F, Saviot L and Millot N 2011 One step continuous hydrothermal synthesis of very fine stabilized superparamagnetic nanoparticles of magnetite *Chem. Commun.* **47** 11706-8
- [12] Xu C and Teja A S 2008 Continuous hydrothermal synthesis of iron oxide and PVA-protected iron oxide nanoparticles *J. Supercrit. Fluids* **44** 85-91

- [13] Togashi T, Takami S, Kawakami K, Yamamoto H, Naka T, Sato K, Abe K and Adschiri T 2012 Continuous hydrothermal synthesis of 3,4-dihydroxyhydrocinnamic acid-modified magnetite nanoparticles with stealth-functionality against immunological response *J. Mater. Chem.* **22** 9041-5
- [14] D. de Tercero M, Röder C, Fehrenbacher U, Teipel U and Türk M 2014 Continuous supercritical hydrothermal synthesis of iron oxide nanoparticle dispersions and their characterization *J Nanopart Res* **16:2350** 1-27
- [15] Stephen Z R, Kievit F M and Zhang M Q 2011 Magnetite nanoparticles for medical MR imaging *Materials Today* **14** 330-8
- [16] Yuen A K L, Hutton G A, Masters A F and Maschmeyer T 2012 The interplay of catechol ligands with nanoparticulate iron oxides *Dalton Trans.* **41** 2545-59
- [17] Zirbs R, Lassenberger A, Vonderhaid I, Kurzhals S and Reimhult E 2015 Melt-Grafting for the Synthesis of Core-Shell Nanoparticles with Ultra-High Dispersant Density *Nanoscale* **7** 11216-25
- [18] Bruce I J and Sen T 2005 Surface Modification of Magnetic Nanoparticles with Alkoxysilanes and Their Application in Magnetic Bioseparations *Langmuir* **21** 7029-35
- [19] Răuciu M, Creangă D E and Airinei A 2006 Citric-acid-coated magnetite nanoparticles for biological applications *Eur. Phys. J. E* **21** 117-21
- [20] Nigam S, Barick K C and Bahadur D 2011 Development of citrate-stabilized Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles: Conjugation and release of doxorubicin for therapeutic applications *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* **323** 237-43
- [21] Amstad E, Gillich T, Bilecka I, Textor M and Reimhult E 2009 Ultrastable Iron Oxide Nanoparticle Colloidal Suspensions Using Dispersants with Catechol-Derived Anchor Groups *Nano Letters* **9** 4042-8
- [22] Boudon J, Paris J, Bernhard Y, Popova E, Decreau R A and Millot N 2013 Magneto-optical nanomaterials: a SPIO-phthalocyanine scaffold built step-by-step towards bimodal imaging *Chem. Commun.* **49** 7394-6
- [23] Aymes D, Ariane M, Bernard F, Muhr H and Demoisson F 2011 Counter-current flow reactor with heat transfer for hydrothermolytic synthesis *WO* **2011010056** A1
- [24] Fahn S and Poewe W 2015 Levodopa: 50 years of a revolutionary drug for Parkinson disease *Movement Disorders* **30** 1-3
- [25] Adeoye A O, Lateef A and Gueguim-Kana E B Optimization of citric acid production using a mutant strain of *Aspergillus niger* on cassava peel substrate *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* Article BABD1500046
- [26] Xu C J, Xu K M, Gu H W, Zheng R K, Liu H, Zhang X X, Guo Z H and Xu B 2004 Dopamine as a robust anchor to immobilize functional molecules on the iron oxide shell of magnetic nanoparticles *J. Am. Chem. Soc.* **126** 9938-9
- [27] Lee H, Dellatore S M, Miller W M and Messersmith P B 2007 Mussel-inspired surface chemistry for multifunctional coatings *Science* **318** 426-30
- [28] Bin Na H, Palui G, Rosenberg J T, Ji X, Grant S C and Mattoussi H 2012 Multidentate Catechol-Based Polyethylene Glycol Oligomers Provide Enhanced Stability and Biocompatibility to Iron Oxide Nanoparticles *Acs Nano* **6** 389-99
- [29] Amstad E, Gehring A U, Fischer H, Nagaiyanallur V V, Hahner G, Textor M and Reimhult E 2011 Influence of Electronegative Substituents on the Binding Affinity of Catechol-Derived Anchors to Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> Nanoparticles *J. Phys. Chem. C* **115** 683-91
- [30] Lee K W, Kim Y J, Kim D-O, Lee H J and Lee C Y 2003 Major Phenolics in Apple and Their Contribution to the Total Antioxidant Capacity *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **51** 6516-20

- [31] Behdadfar B, Kermanpur A, Sadeghi-Aliabadi H, Morales M d P and Mozaffari M 2012 Synthesis of aqueous ferrofluids of  $Zn_xFe_{3-x}O_4$  nanoparticles by citric acid assisted hydrothermal-reduction route for magnetic hyperthermia applications *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* **324** 2211-7
- [32] Maurizi L, Bouyer F, Ariane M, Chassagnon R and Millot N 2014 Fast and continuous synthesis of nanostructured iron spinel in supercritical water: influence of cations and citrates *RSC Adv.* **4** 45673-8
- [33] Bee A, Massart R and Neveu S 1995 Synthesis of very fine maghemite particles *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* **149** 6-9
- [34] Demoisson F, Ariane M, Piolet R and Bernard F 2011 Original Supercritical Water Device for Continuous Production of Nanopowders *Advanced Engineering Materials* **13** 487-93
- [35] Langford J I 1992 *National Institut of Standards and Technology Special Publication* **846** 145
- [36] Papa A-L, Maurizi L, Vandroux D, Walker P and Millot N 2011 Synthesis of Titanate Nanotubes Directly Coated with USPIO in Hydrothermal Conditions: A New Detectable Nanocarrier *J. Phys. Chem. C* **115** 19012-7
- [37] Belin T, Guigue-Millot N, Caillot T, Aymes D and Niepce J C 2002 Influence of grain size, oxygen stoichiometry, and synthesis conditions on the gamma- $Fe_2O_3$  vacancies ordering and lattice parameters *J. Solid State Chem.* **163** 459-65
- [38] Belin T, Millot N, Villiéras F, Bertrand O and Bellat J P 2004 Structural Variations as a Function of Surface Adsorption in Nanostructured Particles *J. Phys. Chem. B* **108** 5333-40
- [39] Das S, Hendry M J and Essilfie-Dughan J 2011 Transformation of Two-Line Ferrihydrite to Goethite and Hematite as a Function of pH and Temperature *Environ. Sci. Technol.* **45** 268-75
- [40] Belin T, Millot N, Bovet N and Gailhanou M 2007 In situ and time resolved study of the gamma/alpha- $Fe_2O_3$  transition in nanometric particles *J. Solid State Chem.* **180** 2377-85
- [41] Hugounenq P, Levy M, Alloyeau D, Lartigue L, Dubois E, Cabuil V, Ricolleau C, Roux S, Wilhelm C, Gazeau F and Bazzi R 2012 Iron Oxide Monocrystalline Nanoflowers for Highly Efficient Magnetic Hyperthermia *J. Phys. Chem. C* **116** 15702-12
- [42] Togashi T, Naka T, Asahina S, Sato K, Takami S and Adschiri T 2011 Surfactant-assisted one-pot synthesis of superparamagnetic magnetite nanoparticle clusters with tunable cluster size and magnetic field sensitivity *Dalton Trans.* **40** 1073-8
- [43] Niu J, Wang F, Zhu X, Zhao J and Ma J 2014 One-pot synthesis of l-dopa-functionalized water-dispersible magnetite nano-palladium catalyst and its application in the Suzuki and Heck reactions in water: a novel and highly active catalyst *RSC Adv.* **4** 37761-6
- [44] Millot N and Perriat P 2011 Oxygen stoichiometry control of nanometric oxide compounds: The case of titanium ferrites *J. Solid State Chem.* **184** 2776-84
- [45] Poix P 1965 The determination of cation-oxygen distances in mixed oxides with spinel structures-application of the data to certain special examples *Bull. Soc. Chim. France* **4** 1085-7
- [46] Shebanova O N and Lazor P 2003 Raman spectroscopic study of magnetite ( $FeFe_2O_4$ ): a new assignment for the vibrational spectrum *J. Solid State Chem.* **174** 424-30
- [47] Perriat P, Fries E, Millot N and Domenichini B 1999 XPS and EELS investigations of chemical homogeneity in nanometer scaled Ti-ferrites obtained by soft chemistry *Solid State Ionics* **117** 175-84

- [48] Yamashita T and Hayes P 2008 Analysis of XPS spectra of Fe<sup>2+</sup> and Fe<sup>3+</sup> ions in oxide materials *Appl. Surf. Sci.* **254** 2441-9
- [49] Kosmulski M 2004 pH-dependent surface charging and points of zero charge *Journal of Colloid and Interface Science* **275** 214-24
- [50] Weinhold M, Soubatch S, Temirov R, Rohlfing M, Jastorff B, Tautz F S and Doose C 2006 Structure and bonding of the multifunctional amino acid L-DOPA on Au(110) *J. Phys. Chem. B* **110** 23756-69
- [51] Löfgren P, Krozer A, Lausmaa J and Kasemo B 1997 Glycine on Pt(111): a TDS and XPS study *Surface Science* **370** 277-92
- [52] Lee N, Hummer D R, Sverjensky D A, Rajh T, Hazen R M, Steele A and Cody G D 2012 Speciation of l-DOPA on Nanorutile as a Function of pH and Surface Coverage Using Surface-Enhanced Raman Spectroscopy (SERS) *Langmuir* **28** 17322-30
- [53] Siddiqui S A, Pandey A K, Dwivedi A, Jain S and Misra N 2010 Comparative conformational, structural and vibrational study on the molecular structure of tyrosine and L-DOPA using density functional theory *J. Chem. Pharm. Res.* **2** 835-50
- [54] Hurst S J, Fry H C, Gosztola D J and Rajh T 2010 Utilizing Chemical Raman Enhancement: A Route for Metal Oxide Support-Based Biodetection *J. Phys. Chem. C* **115** 620-30
- [55] Mayo D W, Miller F A and Hannah R W 2004 Course notes on the interpretation of infrared and Raman spectra *Wiley Online Library*
- [56] McGlashen M L, Davis K L and Morris M D 1989 Surface enhanced Raman spectroscopy of neurotransmitters *AIP Conf. Proc.* **191** 707-12
- [57] Gulley-Stahl H, Hogan P A, Schmidt W L, Wall S J, Buhrlage A and Bullen H A 2010 Surface Complexation of Catechol to Metal Oxides: An ATR-FTIR, Adsorption, and Dissolution Study *Environ. Sci. Technol.* **44** 4116-21
- [58] Barreto W J, Ando R A, Estevão B M and Zanoni K P d S 2012 Adsorption of caffeic acid on titanium dioxide: A spectroscopic study *Spectrochim. Acta, Part A* **92** 16-20
- [59] Bichara L C, Lanús H E, Ferrer E G, Gramajo M B and Brandán S A 2011 Vibrational Study and Force Field of the Citric Acid Dimer Based on the SQM Methodology *Advances in Physical Chemistry* **2011**
- [60] Parikh S J, Kubicki J D, Jonsson C M, Jonsson C L, Hazen R M, Sverjensky D A and Sparks D L 2011 Evaluating Glutamate and Aspartate Binding Mechanisms to Rutile ( $\alpha$ -TiO<sub>2</sub>) via ATR-FTIR Spectroscopy and Quantum Chemical Calculations *Langmuir* **27** 1778-87
- [61] Deiana S, Premoli A and Senette C 2008 Oxidation of caffeic acid by Fe(III) trapped in a Ca-polygalacturonate network *Plant Physiology and Biochemistry* **46** 435-43
- [62] Schiffrin A, Riemann A, Auwarter W, Pennek Y, Weber-Bargioni A, Cvetko D, Cossaro A, Morgante A and Barth J V 2007 Zwitterionic self-assembly of L-methionine nanogratings on the Ag(111) surface *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104** 5279-84
- [63] Wang Y, Li B, Zhou Y, Jia D and Song Y 2011 CS-Fe(II,III) complex as precursor for magnetite nanocrystal *Polymers for Advanced Technologies* **22** 1681-4
- [64] Basti H, Ben Tahar L, Smiri L S, Herbst F, Vaulay M J, Chau F, Ammar S and Benderbous S 2010 Catechol derivatives-coated Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> and  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanoparticles as potential MRI contrast agents *Journal of Colloid and Interface Science* **341** 248-54
- [65] Caruntu D, Caruntu G and O'Connor C J 2007 Magnetic properties of variable-sized Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles synthesized from non-aqueous homogeneous solutions of polyols *Journal of physics D: Applied physics* **40** 5801





### 2.3.3 Reproductibilité de la synthèse de l'échantillon Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> et Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-LDOPA

La reproductibilité de synthèse de l'échantillon de référence ainsi que de celui modifié par la LDOPA a été testée (Tableau 6). Concernant l'échantillon Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, les résultats sont très similaires. Les tailles de cristallites (sous-unités d'une nanofleur) déterminées par MET sont du même ordre de grandeur (les différences sont de l'ordre de l'écartype, c'est-à-dire moins de 2 nm). Les concentrations atomiques déterminées par XPS sont aussi très comparables. Les différences de perte de masse déterminées à partir des mesures ATG sont liées à l'étape de purification (ultrafiltration et dialyse ou centrifugation et dialyse). Chacune des mesures DLS souligne une forte agglomération des nanoparticules en suspension.

Pour l'échantillon Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-LDOPA, les propriétés physico-chimiques diffèrent légèrement entre les échantillons. Cependant, les variations de taille des cristallites observées en MET restent de l'ordre de l'écartype (variation entre 15 ± 4 nm à 22 ± 5 nm). Le PIE des nanoparticules reste identique. L'écart un peu plus important observé sur les mesures ATG et XPS notamment pour Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-LDOPA (2) s'explique par l'étape de lavage (ou une filtration tangentielle avait été choisie et non retenue par la suite). Le fait important à souligner est que la taille hydrodynamique des nanoparticules modifiées par la LDOPA reste inférieure à 100 nm. Ces résultats montrent que malgré la difficulté à greffer des molécules organiques à haute température (150°C), haute pression (25 MPa) et en continu, il est possible d'avoir des reproductibilités correctes et d'avoir dans tous les cas des nanoparticules stables en suspension.

	Ø <sub>TEM</sub> (nm)	D <sub>H</sub> (nm)	Perte de masse (%)	PIE	XPS (%)			
					C	N	O	Fe
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -LDOPA (1)	15 ± 4	71 ± 1	21	2.8 ± 0.3	26	3	46	25
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -LDOPA (2)	18 ± 5	-	14	2.9 ± 0.3	27	4	49	20
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -LDOPA (3)	16 ± 5	84 ± 1	30	-	-	-	-	-
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -LDOPA (4)	22 ± 5	106 ± 2	23	-	41	5	39	14
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> (1)	8 ± 2	-	5	7.7 ± 0.3	9	-	56	35
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> (2)	9 ± 2	666 ± 45	8	-	9	-	54	36
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> (3)	9 ± 2	434 ± 20	10	-	5	-	56	39

Tableau 6 : Données de reproductibilité de synthèse des échantillons Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-LDOPA et Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>. Ø<sub>TEM</sub> (nm) est le diamètre moyen d'une cristallite obtenu par les mesures MET (au moins 50 nanoparticules), D<sub>H</sub> est le diamètre hydrodynamique à pH=7 en milieu NaCl (10<sup>-2</sup>M), la perte de masse (%) obtenue par ATG représente les molécules adsorbées ou greffées à la surface des nanoparticules, PIE est le point isoélectrique déterminé à partir des mesures de potentiel ζ et les concentrations atomiques en % du carbone, de l'azote, de l'oxygène et du fer sont désignées par C, O, N et Fe respectivement

### 2.3.4 Conclusion et analyse

Les molécules LDOPA et DHCA ajoutées avec les ions ferreux et ferriques au cours de la synthèse ont augmenté la taille moyenne des cristallites et modifié l'état d'oxydation des nanoparticules en évitant l'oxydation des ions Fe<sup>2+</sup> en ions Fe<sup>3+</sup>. Il a été rapporté dans la littérature qu'en milieu acide, une réduction des ions Fe<sup>3+</sup> en ions Fe<sup>2+</sup> a lieu en présence des molécules catéchols par des transferts électroniques entre les groupements hydroxyles du cycle carboné et l'ion Fe<sup>3+</sup> (Figure 45).<sup>267</sup> Par ce processus, le DHCA et la LDOPA sont susceptibles de se transformer en quinone et d'induire cette réduction.

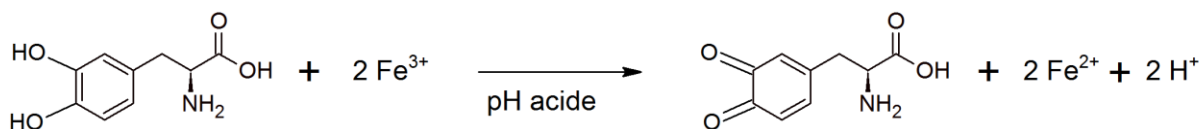


Figure 45 : Réduction des ions  $\text{Fe}^{3+}$  en ion  $\text{Fe}^{2+}$  en milieu acide et en présence de catéchols, transformation de la LDOPA en quinone

Ainsi les catéchols favorisent la conservation du ratio 1:2 en ions ferreux et ferriques au cours de la synthèse, ratio nécessaire pour obtenir de la magnétite (Eq. 1 du Chapitre 1).

Cependant, comme ces deux molécules induisent une augmentation de la taille moyenne des cristallites, il est possible que l'effet antioxydant ne soit pas seulement imputable à la molécule organique mais également à la taille même des nanoparticules.

Au vu de ces résultats très prometteurs, il est intéressant de connaître si cet effet antioxydant est ou non relié directement à la molécule organique. Il sera intéressant d'observer si cet effet existe également à haute température. Ainsi, l'étude suivante est consacrée à l'influence de la température ( $90^\circ\text{C}$ ,  $150^\circ\text{C}$  et  $250^\circ\text{C}$ ) sur la synthèse des nanoparticules d'oxydes de fer modifiées par l'acide citrique, le DHCA et la LDOPA.

## 2.4 Effet de la température sur la synthèse des nanoparticules de $\text{Fe}_3\text{O}_4$ modifiées par le DHCA, la LDOPA et l'acide citrique

Dans le but de déterminer la température de synthèse la plus appropriée pour obtenir des nanoparticules d'oxydes de fer peu ou pas oxydées avec une taille de cristallites inférieure à 20 nm, différentes températures de synthèse ont été testées ( $90^\circ\text{C}$ ,  $150^\circ\text{C}$  et  $250^\circ\text{C}$ ). En effet, dans la littérature, il a été rapporté qu'une augmentation de la température de synthèse conduit à la formation des phases thermodynamiquement stables à haute température telle que la maghémite ou l'hématite au dépend de la magnétite par oxydation des ions  $\text{Fe}^{2+}$  en ion  $\text{Fe}^{3+}$  et croissance des particules.<sup>60, 77, 79, 83, 96, 106, 125, 268</sup> Ainsi Matson *et al.*<sup>77</sup> et Liang *et al.*<sup>81</sup> montrent une tendance à la croissance sur des gammes de températures et de pressions allant de  $250$  à  $420^\circ\text{C}$  et  $35$  à  $55$  MPa respectivement. Cependant, d'autres études indiquent que pour des nanoparticules de magnétite recouvertes par une couche protectrice, la température de transition de la phase spinelle vers l'hématite se trouve alors modifiée (§ 1.2.2.2.3 et § 1.2.2.2.4).<sup>269-271</sup>

C'est pourquoi après les résultats obtenus lors de la première étude (§ 2.3.2), il est important et intéressant d'étudier l'effet de la température de synthèse afin de confirmer le caractère antioxydant des molécules organiques et leur influence sur la taille des nanoparticules.

Au cours de cette partie, la pression et le débit sont respectivement maintenus à 25 MPa et  $80 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$  ( $4 \times 20 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ). Les molécules organiques sont mélangées avec les ions ferreux et ferriques *via* le run 1 (Figure 41) avec le rapport molaire 1:1 ( $[\text{Molécules organiques}] = [\text{Fe}^{2+} + \text{Fe}^{3+}]$ ). Les concentrations en  $\text{Fe}^{2+}$  et en  $\text{Fe}^{3+}$  sont respectivement égales à 8 et 16 mM. La soude ( $[\text{NaOH}] = 24 \text{ mM}$ )

est injectée *via* le run 2. La suspension collectée est soumise à une décantation magnétique. Les suspensions sont ensuite centrifugées une fois (24400g durant 10 min) et dialysées.

### 2.4.1 Nature de la phase obtenue et degré d'oxydation des nanoparticules

Les échantillons ont été analysés par DRX dans le but d'obtenir la phase, le paramètre de maille et la taille moyenne des cristallites. Des analyses Raman sont réalisées pour confirmer la nature de la phase de l'oxyde de fer. Les analyses DRX et Raman montrent une évolution des échantillons en fonction de la température et de l'agent organique ajouté (Figure 46).

#### 2.4.1.1 Nature des phases obtenues

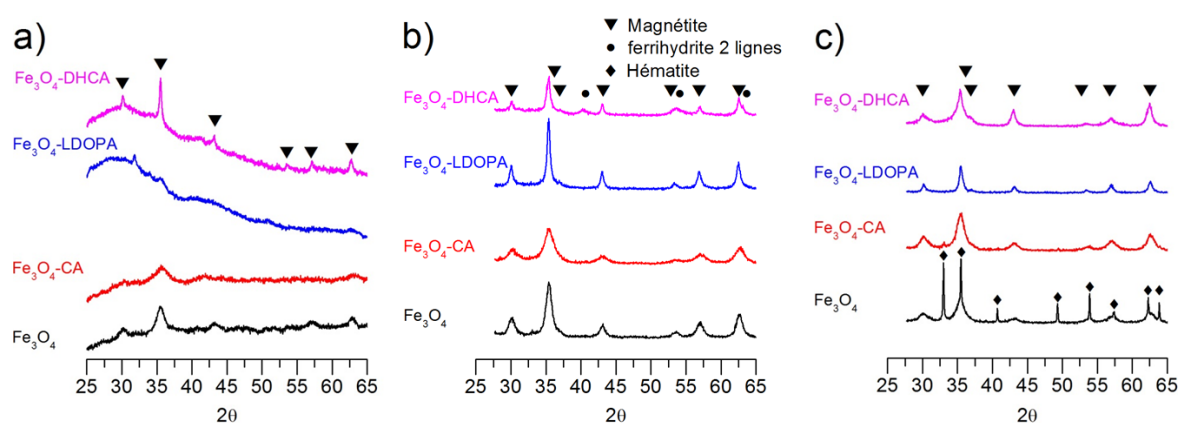


Figure 46 : Diffractogrammes des poudres  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ,  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-CA}$ ,  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-LDOPA}$ ,  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-DHCA}$  synthétisés à a)  $90^\circ\text{C}$ , b)  $150^\circ\text{C}$  et c)  $250^\circ\text{C}$  à 25 MPa, ([Molécules organiques]/[ $\text{Fe}^{2+}+\text{Fe}^{3+}$ ] = 1 en run 1)

Pour chacune des trois températures étudiées, les particules synthétisées sont de type magnétite  $\text{Fe}_{3(1-\delta)}\text{O}_4$ . Les pics de diffractions caractéristiques de la structure spinelle sont retrouvés (ICDD : 19-0629). De plus les transitions  $A_{1g}$  de la magnétite et  $A_1$  de la hémaghtite à  $668\text{ cm}^{-1}$  et  $720\text{ cm}^{-1}$  sont respectivement observées. Cependant, deux autres phases d'oxydes de fer apparaissent pour les synthèses réalisées à haute température ( $150^\circ\text{C}$  et  $250^\circ\text{C}$ ) :

- La première phase concerne la ferrihydrite 2 lignes (Figure 46-a), précurseur de la goéthite ou de l'hématite selon le pH.<sup>26</sup> Observée dans la partie précédente (§ 2.3.2), la présence de groupements électro-négatifs sur des catéchols conduit à la formation de complexes avec les ions  $\text{Fe}^{3+}$  qui peuvent initier la formation d'oxyhydroxydes de Fe(III) ou oxydes de Fe(III).<sup>272</sup>
- Quand la température de synthèse atteint  $250^\circ\text{C}$  (Figure 46-c), la phase hématite, en plus de la phase magnétite, apparaît sur les échantillons non modifiés en surface ( $\text{Fe}_{3(1-\delta)}\text{O}_4$ ). Cette phase d'oxyde de fer est thermodynamiquement stable à haute température et haute pression<sup>36, 59, 96, 106</sup> ainsi que pour des tailles de grains supérieures à une vingtaine de nanomètre pour la phase oxydée  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ .<sup>273</sup> La formation de cette phase est aussi démontrée par spectroscopie Raman (Figure 47-1)-c) par la présence des pics  $A_{1g}$  ( $226\text{ cm}^{-1}$ ),

$E_g$  ( $244\text{ cm}^{-1}$ ),  $E_g$  ( $292\text{ cm}^{-1}$ ),  $E_g$  ( $409\text{ cm}^{-1}$ ),  $A_{1g}$  ( $495\text{ cm}^{-1}$ ),  $E_g$  ( $611\text{ cm}^{-1}$ ) et « two magnon »\* ( $1315\text{ cm}^{-1}$ ) sur la Figure 47-2)-c).<sup>274</sup>

A travers ces premiers résultats, les agents organiques DHCA, LDOPA et CA jouent ainsi un rôle primordial dans la conservation de la phase magnétite ( $\text{Fe}_{3(1-\delta)}\text{O}_4$ ) tout au long de la synthèse à hautes températures. Avant d'aller plus loin, il est important de contrôler leur état d'oxydation et savoir si ces agents organiques sont encore intacts et présents à la surface des NPs.

### 2.4.1.2 Effet sur le degré d'oxydation des nanoparticules synthétisées

Les premiers résultats (DRX et Raman) ont montré une évolution de la phase de l'oxyde de fer synthétisée à  $250^\circ\text{C}$  (Figure 46 et Figure 47). La présence de l'hématite traduit une oxydation importante des ions  $\text{Fe}^{2+}$  en ions  $\text{Fe}^{3+}$ . La phase magnétite  $\text{Fe}_{3(1-\delta)}\text{O}_4$  coexiste avec cette dernière (Tableau 7, Figure 46 et Figure 47). Il est possible que la phase hématite se forme à partir des phases magnétite ou maghémite par grossissement des grains.<sup>125</sup>

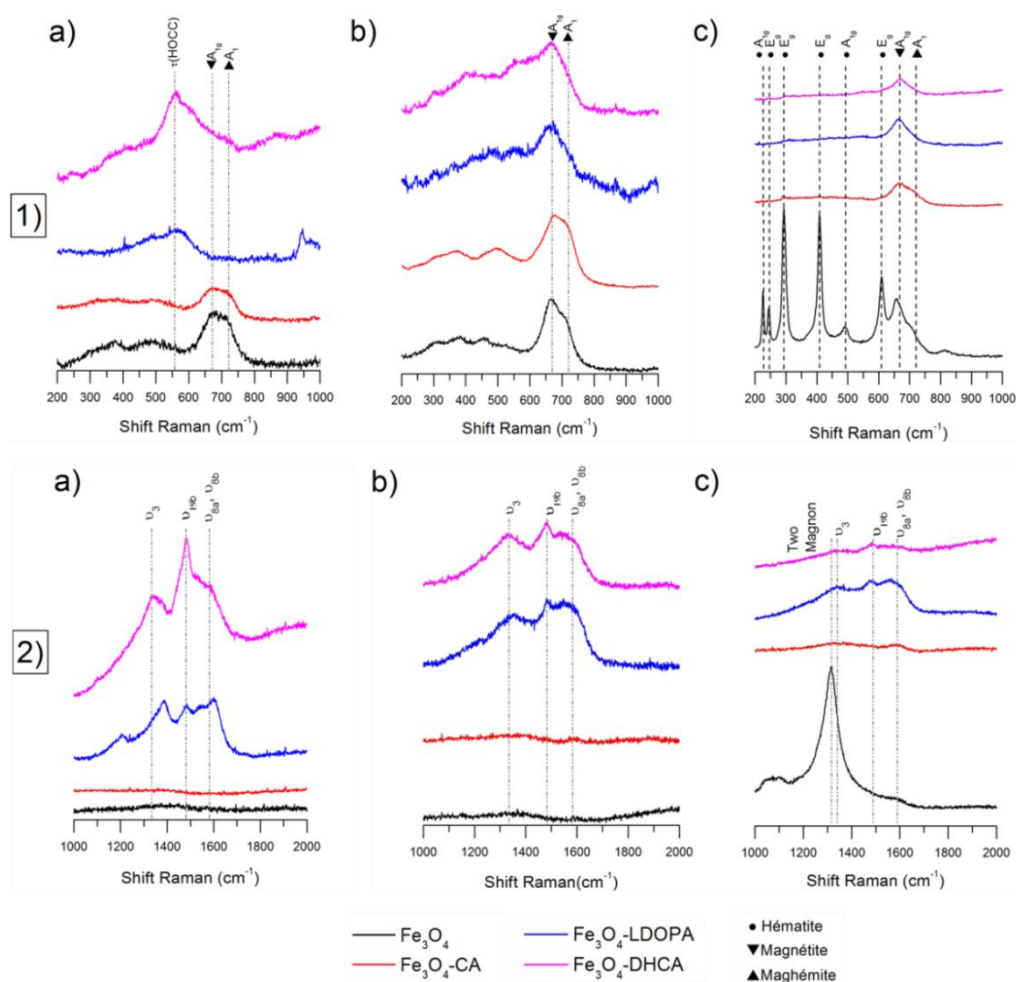


Figure 47 : Spectres Raman de 1) 200 à  $1000\text{ cm}^{-1}$  et 2)  $1000$  à  $2000\text{ cm}^{-1}$  des nanoparticules  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ,  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -CA,  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -LDOPA,  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -DHCA synthétisées à a)  $90^\circ\text{C}$ , b)  $150^\circ\text{C}$  et c)  $250^\circ\text{C}$  à  $25\text{ MPa}$  ( $\nu$  : étirement,  $\tau$  : torsion),  $[\text{Molécules organiques}]/[\text{Fe}^{2+}+\text{Fe}^{3+}] = 1$  en run 1)

\* Two magnon : terme correspondant à une excitation collective de la structure de spin des électrons. Un photon crée en cédant de l'énergie une paire de magnons qui possèdent chacun une impulsion opposée mais une énergie identique selon la théorie de Fleury-Loudon

T°C de synthèse	90°C			150°C			250°C			
	$\varnothing_{\text{TEM}}$ (nm)	$\varnothing_{\text{DRX}}$ (nm)	a (Å)	$\varnothing_{\text{TEM}}$ (nm)	$\varnothing_{\text{DRX}}$ (nm)	a (Å)	$\varnothing_{\text{TEM}}$ (nm)	$\varnothing_{\text{DRX}}$ (nm)	a (Å)	$\varnothing_{\text{hématite}}$ (nm)
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	6 ± 1	8,1 ± 0,2	8,364 ± 0,007	8 ± 2	10,4 ± 0,1	8,385 ± 0,002	6 ± 1	5,9 ± 0,2	8,363 ± 0,002	253 ± 26
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -CA	4 ± 1	3,2 ± 0,4	8,381 ± 0,016	6 ± 2	5,8 ± 0,1	8,373 ± 0,003	7 ± 2	7,5 ± 0,1	8,378 ± 0,003	-
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -LDOPA	n.d	n.d	n.d	20 ± 5	19,7 ± 0,3	8,396 ± 0,006	20 ± 8	18,4 ± 0,4	8,396 ± 0,009	-
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -DHCA	25 ± 6	29,8 ± 1,4	8,376 ± 0,004	22 ± 4	18,7 ± 0,7	8,392 ± 0,007	11 ± 4	10,3 ± 0,2	8,396 ± 0,008	-

Tableau 7 : Diamètre DRX des cristallites  $\varnothing_{\text{DRX}}$  (nm), diamètre MET  $\varnothing_{\text{TEM}}$  (nm) et paramètre de maille a (Å) des nanoparticules déterminés par DRX des échantillons Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-CA, Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-LDOPA, Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-DHCA synthétisés à 90°C, 150°C et 250°C (n.d signifiant non déterminé), [Molécules organiques]/[Fe<sup>2+</sup>+Fe<sup>3+</sup>] = 1 en run 1

L'analyse du paramètre de maille des nanoparticules indique que les molécules DHCA et LDOPA induisent un effet antioxydant (Tableau 7). Pour les nanoparticules modifiées par le DHCA et la LDOPA, le paramètre de maille déterminé est très proche de celui de la magnétite pure (a = 8,396 Å) pour des températures de 150°C ( $a_{\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-DHCA}} = 8,392 \pm 0,007$  Å et  $a_{\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-LDOPA}} = 8,396 \pm 0,006$  Å) et 250°C ( $a_{\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-DHCA}} = 8,396 \pm 0,008$  Å et  $a_{\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-LDOPA}} = 8,396 \pm 0,009$  Å). Quand la température est plus faible (90°C), les particules sont plus oxydées ( $a_{\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-DHCA}} = 8,376 \pm 0,004$  Å). La combinaison des températures élevées et de la présence des molécules DHCA et LDOPA au cours de la synthèse favorise la formation de magnétite Fe<sub>3(1-δ)</sub>O<sub>4</sub> peu oxydée. Pour les échantillons modifiés par l'acide citrique, l'effet antioxydant est lui aussi visible. Le paramètre de maille reste en effet supérieur ou équivalent à celui des particules non modifiées ( $a_{\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-CA}} = 8,381 \pm 0,016$  Å à 90°C,  $a_{\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-CA}} = 8,373 \pm 0,003$  Å à et  $a_{\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-CA}} = 8,378 \pm 0,003$  Å à 250°C) quelle que soit la température utilisée (Tableau 7). L'acide citrique empêche aussi la formation de l'hématite. Son pouvoir antioxydant est cependant plus faible que celui observé sur les molécules DHCA et LDOPA car une oxydation partielle des nanoparticules a eu lieu. Enfin à 90°C, les nanoparticules Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-LDOPA ne sont pas cristallisées. La combinaison de la faible température (90°C) et la présence de LDOPA ne contribue pas à cristalliser des nanoparticules.

Regardons maintenant l'effet sur la taille des nanoparticules obtenues

#### 2.4.2 Influence sur la taille des nanoparticules synthétisées

Les nanoparticules modifiées par l'acide citrique, le DHCA et la LDOPA donnent des tailles moyennes de NPs différentes en fonction de la molécule organique utilisée et de la température employée au cours de la synthèse (Figure 48 et Tableau 7).

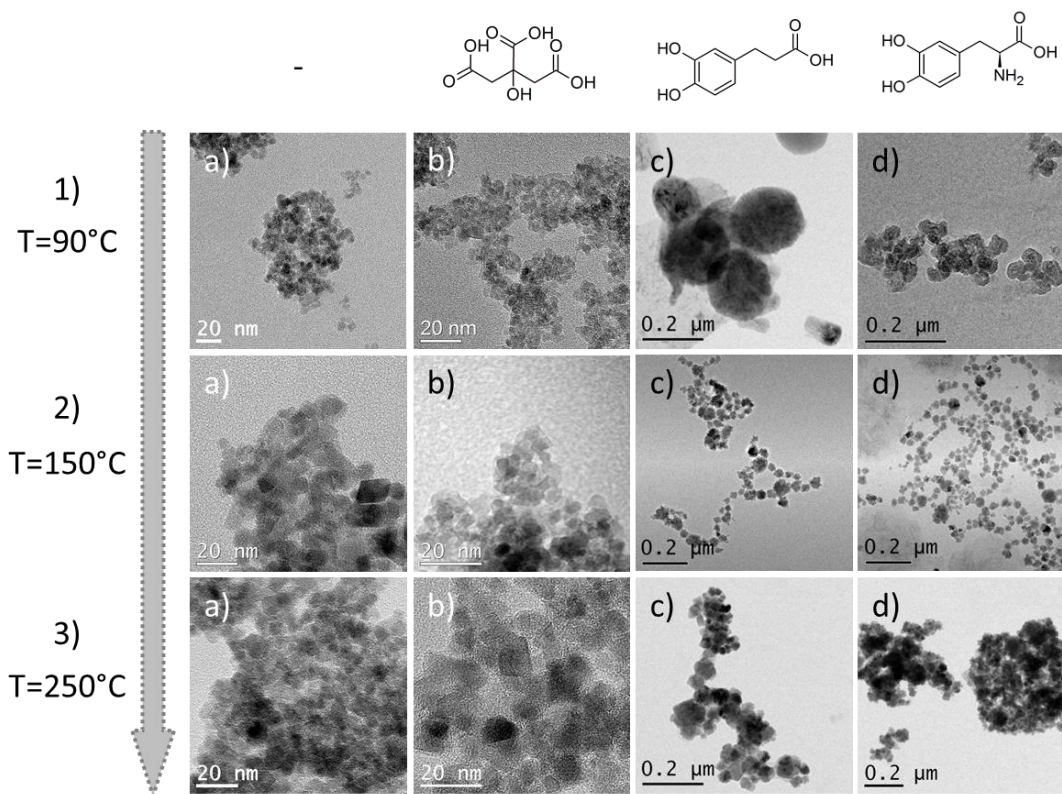


Figure 48 : Images MET des nanoparticules a) non modifiées, b) modifiées par l'acide citrique, c) modifiées par la LDOPA et d) modifiées par le DHCA et synthétisées à 1) 90°C, 2) 150°C et 3) 250°C (25 MPa et 80 mL.min<sup>-1</sup> et [Molécules organiques]/[Fe<sup>2+</sup>+Fe<sup>3+</sup>] = 1 en run 1)

Concernant les nanoparticules non modifiées, la taille moyenne des cristallites déterminée par DRX augmente en fonction de la température ( $\emptyset = 8,1 \pm 0,2$  nm pour  $T=90^\circ\text{C}$ ,  $\emptyset = 10,4 \pm 0,1$  nm pour  $T=150^\circ\text{C}$ ) (Tableau 7). Cependant quand la température atteint une valeur de  $250^\circ\text{C}$ , la taille moyenne des cristallites relative à la magnétite diminue passant ainsi à  $5,9 \pm 0,2$  nm. Cette diminution de taille peut trouver son origine dans l'effet de la température favorisant la germination. Ces résultats sont confirmés aussi par BET (Tableau 8). En contrepartie, la taille moyenne des cristallites relative à l'hématite est de  $253 \pm 26$  nm.

Pour des températures inférieures à  $250^\circ\text{C}$ , les nanoparticules modifiées par l'acide citrique possèdent une taille moyenne plus faible que les nanoparticules  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ,  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-DHCA}$  et  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-LDOPA}$ . La taille des cristallites ( $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-CA}$ ) passe ainsi de  $3,2 \pm 0,4$  nm ( $T = 90^\circ\text{C}$ ) à  $5,8 \pm 0,1$  nm ( $T = 150^\circ\text{C}$ ). L'acide citrique tend à réduire la taille moyenne des cristallites. Cependant, à  $250^\circ\text{C}$ , les cristallites  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-CA}$  ont une taille moyenne plus importante ( $7,5 \pm 0,1$  nm) que les cristallites  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  ( $5,9 \pm 0,2$  nm) mais restent tout même inférieures aux cristallites  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-DHCA}$  ( $10,3 \pm 0,2$  nm) et  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-LDOPA}$  ( $18,4 \pm 0,4$  nm). L'acide citrique comparé à la LDOPA ou au DHCA contribue à diminuer la taille moyenne des cristallites pour ces trois températures. Malgré une diminution importante de la taille à  $90^\circ\text{C}$  ( $3,2 \pm 0,4$  nm) les particules modifiées par l'acide citrique à  $90^\circ\text{C}$  reste peu oxydées ( $a = 8,381 \pm 0,016$  Å). L'effet antioxydant est toujours présent malgré une très petite taille.



Précédemment, il a été observé que les molécules DHCA et LDOPA avaient tendance à augmenter la taille des cristallites à 150°C comparées aux nanoparticules non modifiées en surface (§ 2.3.2). Ce même effet est aussi observé pour des synthèses réalisées à 90°C et 250°C (Tableau 7 et Tableau 8). Par exemple, à 90°C, les cristallites Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-DHCA ont une taille moyenne de 29,8 ± 1,4 nm contre 8,1 ± 0,2 nm pour les cristallites Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>. A 250°C, la taille des cristallites Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-DHCA est de 10,3 ± 0,2 nm alors que les cristallites Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> ont une taille de 5,9 ± 0,2 nm. Concernant la synthèse de nanoparticules modifiées par la LDOPA effectuée à 90°C, les nanoparticules sont peu cristallisées. En revanche, à 250°C, les tailles des nanoparticules Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-LDOPA et Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-DHCA obtenues à partir des mesures BET (Tableau 8) sont plus conséquentes que celles déterminées par DRX et MET probablement dû à une agglomération plus importante des particules entre elles.

Ainsi, les molécules organiques DHCA, LDOPA et acide citrique jouent un rôle prépondérant dans la taille finale des cristallites obtenues. Les molécules à base de catéchols tendent à augmenter significativement la taille des nanoparticules alors que l'acide citrique a un effet contraire. Ces résultats confirment ainsi ceux déjà obtenus lors de la première publication (§ 2.3.2).

T°C de synthèse	90°C		150°C		250°C	
	S <sub>BET</sub> (m <sup>2</sup> /g)	Ø <sub>BET</sub> (nm)	S <sub>BET</sub> (m <sup>2</sup> /g)	Ø <sub>BET</sub> (nm)	S <sub>BET</sub> (m <sup>2</sup> /g)	Ø <sub>BET</sub> (nm)
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	181 ± 1	6,4 ± 0,1	104 ± 1	11,1 ± 0,1	125 ± 1	9,2 ± 0,1
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -CA	270 ± 1	4,3 ± 0,1	177 ± 1	6,5 ± 0,1	141 ± 1	8,2 ± 0,1
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -LDOPA	n.d	n.d	50 ± 2	23,1 ± 0,9	25 ± 1	46,5 ± 0,3
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -DHCA	n.d	n.d	40 ± 1	28,8 ± 0,7	20 ± 1	56,9 ± 0,4

Tableau 8 : Surface spécifique déterminée à partir de la BET des échantillons Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-CA, Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-LDOPA et Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-DHCA à 90°C, 150°C et 250°C ([Molécules organiques]/[Fe<sup>2+</sup>+Fe<sup>3+</sup>] = 1 en run 1)

### 2.4.3 Présence des molécules organiques à la surface des nanoparticules d'oxydes de fer

Afin de confirmer le greffage des molécules DHCA, LDOPA et acide citrique sur la surface des nanoparticules d'oxydes de fer, les échantillons sont caractérisés par spectroscopie Raman, ATG et potentiel ζ.

L'observation des deux premiers effets (effet de taille et effet antioxydant) souligne un fait important : la température de 250°C constitue un palier particulier. Premièrement, en plus de l'apparition de la phase hématite pour les particules non modifiées, l'acide citrique pourrait être dégradé (Figure 49). Le temps de synthèse très rapide (~11s) comparé à la vitesse de montée en température en ATG (5°C/min) (Figure 49) semble éviter cela puisque des modifications sur la phase et la taille des nanoparticules sont apparues. Deuxièmement, à cette température de 250°C la taille des particules Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-DHCA a diminué drastiquement (facteur 2) comparée à Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-LDOPA. Cette diminution de taille pourrait être expliquée par le fait qu'à cette température, la molécule DHCA commence à se dégrader et agit de manière moins efficace sur les nanoparticules (Figure 49). En ce qui concerne la LDOPA, la taille des grains ne varie pas de manière significative (Tableau 7) car sa température de décomposition est plus



élevée ( $>300^{\circ}\text{C}$  à  $5^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ ). Il est donc maintenant intéressant d'observer si ces molécules organiques sont toujours présentes à la surface des nanoparticules.

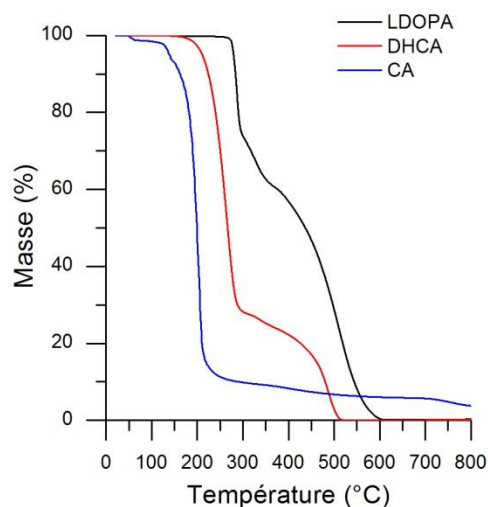


Figure 49 : Courbe ATG des molécules CA, DHCA et LDOPA sous  $\text{N}_2$  et  $\text{O}_2$  ( $5^{\circ}\text{C}/\text{min}$  de  $25^{\circ}\text{C}$  à  $800^{\circ}\text{C}$ )

Les caractérisations confirment la présence des molécules DHCA, LDOPA et CA. Les analyses Raman montrent les vibrations caractéristiques  $\nu_3$  à  $1337\text{ cm}^{-1}$ ,  $\nu_{19b}$  à  $1485\text{ cm}^{-1}$  et  $\nu_{8a,8b}$  à  $1586\text{ cm}^{-1}$  des molécules DHCA et LDOPA (Figure 47).<sup>275-277</sup> Cette dernière vibration est importante car elle souligne la formation d'un complexe de transfert de charge résultant d'une liaison bidentée entre le catéchol et la surface des nanoparticules *via* les groupements hydroxyles de la molécule organique. Cependant la présence de molécule CA sur la surface des nanoparticules n'est pas confirmée par cette technique car aucune vibration caractéristique de celle-ci n'est retrouvée.<sup>278</sup> Les analyses ATG montrent des variations de masses significatives en fonction des températures de synthèse et en fonction des molécules employées (Figure 50). La variation de masse est plus importante pour les échantillons modifiés par les ligands que les échantillons non modifiés. Les mesures de potentiel  $\zeta$  indiquent un décalage des points isoélectriques vers les pH acides synonyme de leur présence et plus précisément de la présence des groupements carboxyliques des ligands (Figure 51).

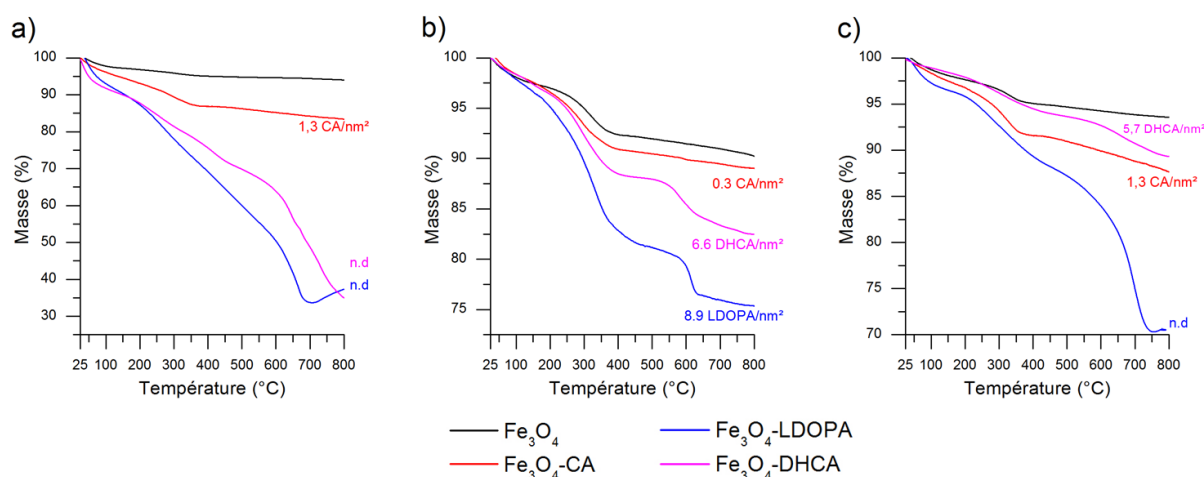


Figure 50 : Caractérisations ATG des poudres Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-CA, Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-LDOPA, Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-DHCA synthétisées à a) 90 °C, b) 150 °C et c) 250 °C sous N<sub>2</sub> de 25 °C à 800 °C avec une rampe de 5 °C/min ([Molécules organiques]/[Fe<sup>2+</sup>+Fe<sup>3+</sup>] = 1 en run 1)

De 90 °C à 250 °C, le point isoélectrique se situant à ~8 pour les nanoparticules nues se trouve décalé vers les pH acides en présence du DHCA, LDOPA et CA. Par ailleurs, le point isoélectrique des nanoparticules modifiées par le DHCA et la LDOPA est bien inférieur à celui des nanoparticules modifiées par l'acide citrique. De même, à 90, 150 et 250°C le potentiel  $\zeta$  des suspensions Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-LDOPA et Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-DHCA à pH physiologique (pH = 7,4) est plus important que celui des nanoparticules Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-CA. Cette modification conduit à un effet électrostatique des molécules organiques plus important induisant une stabilité colloïdale en suspension meilleure pour les nanoparticules modifiées par la LDOPA et le DHCA comme observée lors de la première étude (§ 2.3.2).

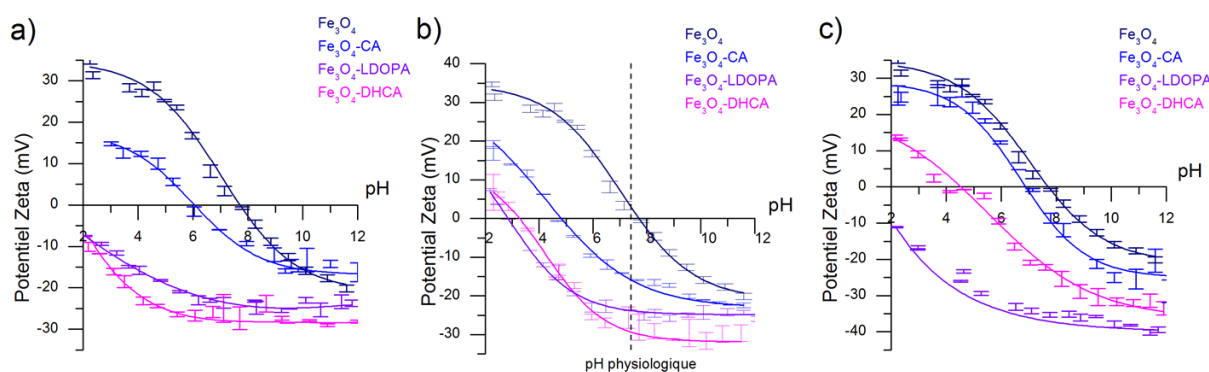


Figure 51 : Analyses zétamétriques des nanoparticules Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-CA, Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-LDOPA, Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-DHCA synthétisées à a) 90 °C, b) 150 °C et c) 250 °C ([Molécules organiques]/[Fe<sup>2+</sup>+Fe<sup>3+</sup>] = 1 en run 1)

Dans la gamme étudiée, la température n'influence donc pas *a priori* les liaisons entre les nanoparticules d'oxydes de fer et des molécules organiques et soulignent qu'une partie des molécules est encore présente à 250°C.

Cependant, deux résultats intéressants sont à noter à travers cette étude. Pour rappel, l'acide citrique commence à se dégrader aux alentours de 180 °C, le DHCA aux alentours de 250 °C et la LDOPA vers 320 °C (Figure 49). Or les analyses révèlent qu'à haute température (250°C) les pertes de masses en

ATG des molécules DHCA et CA sont moins conséquentes comparées aux autres températures. De même les points isoélectriques des suspensions  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-CA}$  et  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-DHCA}$  situés à 4,5 et 6,9 respectivement se rapprochent de celui des nanoparticules non modifiées (7,8) (Figure 51-c). Ce rapprochement du PIE et les analyses ATG indiquent une présence faible des molécules sur la surface des nanoparticules. Il reste tout de même 1,3 molécule de CA/nm<sup>2</sup> et 5,7 molécules de DHCA à la surface des nanoparticules lorsque la synthèse s'est déroulée à 250°C. Ces deux molécules se dégradent en partie (par rapport à la quantité engagée) à cette température au cours de la synthèse. Une partie des molécules se fixe et reste malgré tout sur les nanoparticules. Le temps de synthèse rapide (~11s) favorise ce phénomène de conservation des molécules organiques. Un temps de synthèse plus long aurait probablement contribué à la destruction complète de ces molécules au cours de la synthèse dans le réacteur menant à la disparition des molécules de la surface des nanoparticules : c'est l'un des avantages du réacteur en continu.

### 2.4.4 Conclusion

L'augmentation de la température de synthèse conduit à des modifications importantes sur la taille, l'état d'oxydation et la phase des cristallites d'oxydes de fer. Il apparaît que la température de 250°C constitue une température de transition entre la magnétite ( $\text{Fe}_{3(1-\delta)}\text{O}_4$ ) et l'hématite pour les particules non modifiées en surface par des ligands. Une fois le DHCA, la LDOPA et le CA ajouté, seule la phase magnétite reste. De plus, ces agents organiques réduisent l'état d'oxydation des nanoparticules. En parallèle, la taille des cristallites évolue : l'acide citrique tend à diminuer la taille des cristallites alors que le DCHA et la LDOPA tendent à l'augmenter. De même à cette température, même si le DHCA et l'acide citrique se dégradent au cours de la synthèse, ces molécules parviennent tout de même à réduire l'oxydation et modifier la taille des nanoparticules. Elles agissent bien au cours de la synthèse et leur effet antioxydant est confirmé. Cependant, comme la température de synthèse à 250°C mène à une dégradation partielle des agents organiques et à la formation de la phase hématite, il est préférable de travailler à une température de 150°C pour à la fois assurer la conservation du ligand au cours de la synthèse et une taille de cristallites inférieure à 20 nm et non oxydées. Les molécules DHCA et LDOPA sont les meilleurs candidats pour respecter ces critères.

Il est intéressant d'étudier maintenant l'influence du lieu d'ajout des molécules organiques sur le dispositif hydrothermal en continu afin de déterminer les conditions de synthèses optimales.

## 2.5 Nanoparticules de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> fonctionnalisées : influence du lieu d'ajout du ligand et du pH durant leur synthèse hydrothermale en continu

### 2.5.1 Résumé de l'article publié à RSC Advances

#### 2.5.1.1 Objectifs

Les études précédentes ont montré que le DHCA et la LDOPA améliorent fortement l'état d'oxydation des nanoparticules tout en assurant la conservation de la phase magnétite avec une taille de cristallites inférieure à 20 nm et une meilleure stabilité colloïdale.

Ce nouveau travail de recherche qui fait également l'objet d'une publication soumise le 08 juillet 2015 se consacre à étudier l'influence du lieu d'ajout des molécules DHCA et LDOPA sur le degré d'oxydation et la taille des nanoparticules. Cette étude a aussi pour but de déterminer quels sont les meilleurs paramètres de mélange (concentration, pH) des molécules organiques pour contrôler la taille finale des nanoparticules, leur état d'oxydation et également la quantité de molécules organiques greffée à leur surface. En plus de tirer profit du dispositif, cette étude permet l'analyse d'un paramètre très peu étudié qu'est le lieu d'ajout. Très récemment (2013), des travaux de recherche ont mis en avant le fait que d'ajouter l'acide 5-hexynoïque avant, après ou avec les sels de fer en conditions supercritiques (entre 573K et 673K et à 30 MPa) induit un changement dans les proportions des phases  $\alpha$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>,  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> et Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> et dans leurs tailles respectives.<sup>63</sup>

Concernant la conformation des molécules étudiées, des premiers travaux ont été menés à propos de la LDOPA sur du TiO<sub>2</sub> en réacteur batch et chimie douce.<sup>279</sup> Des modifications de pH (entre 2 et 6) entraînent des variations dans l'orientation de la molécule sur la surface. Un pH égal à 2 tend à orienter la molécule de manière perpendiculaire à la surface de la nanoparticule alors qu'un pH égal à 6 induit une orientation parallèle à la surface de la nanoparticule (Figure 52). De même, l'augmentation de la concentration en LDOPA lors de la fonctionnalisation favorise cette dernière conformation. Par ailleurs, la LDOPA à pH basique s'oxyde facilement.<sup>279-282</sup>

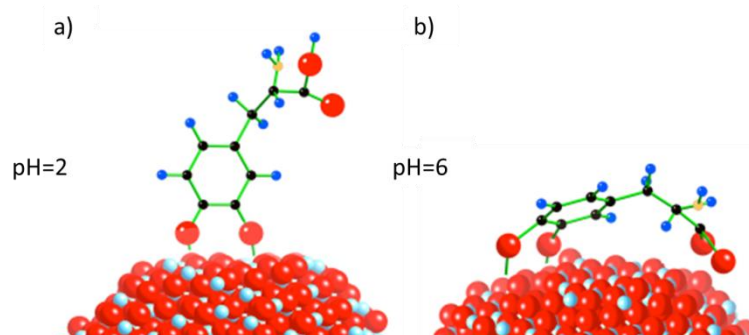


Figure 52 : Conformation de la LDOPA sur la surface des nanoparticules de TiO<sub>2</sub> en fonction du pH de fonctionnalisation a) pH = 2 et b) pH = 6<sup>279</sup>

Le pH modifie aussi le comportement des molécules catéchols vis-à-vis des ions  $\text{Fe}^{2+}$  ou  $\text{Fe}^{3+}$ . Comme cela a déjà été dit (§ 2.3.4), en milieu acide, la LDOPA est par exemple capable de réduire les ions  $\text{Fe}^{3+}$ .<sup>267</sup>

Ainsi au cours de ce travail, la température de synthèse est fixée à 150°C, la pression à 25 MPa et le débit de sortie à 80 mL.min<sup>-1</sup>. Les concentrations en ions ferreux, ferriques et en soude sont les suivantes :  $[\text{Fe}^{2+}] = 8 \text{ mM}$ ,  $[\text{Fe}^{3+}] = 16 \text{ mM}$  et  $[\text{NaOH}] = 24 \text{ mM}$ . Trois concentrations (33%, 50%, 100%) en LDOPA ou DHCA sont définies selon le ratio  $[\text{Molécules organiques}]/[\text{Fe}^{2+}+\text{Fe}^{3+}]$ . Les sels métalliques sont injectés selon le run 1, la soude selon le run 2 et les molécules organiques sont introduites dans le run 1 (avec les sels métalliques à pH acide et avant la synthèse des nanoparticules), run 2 (avec la soude à pH>12 et avant la synthèse des nanoparticules) ou run 3 (à pH basique et après la synthèse des nanoparticules). Dans le run 3, elles seront mélangées avec de la soude à 24 mM (Figure 41). Les échantillons seront ensuite centrifugés (24400 g durant 10 min) puis dialysés (Cellu-Sep® tubular membranes of 3500 Da) et lyophilisés.

### 2.5.1.2 Résultats majeurs

Ces travaux montrent que lorsque la LDOPA ou le DHCA est mélangé avec les ions ferreux et ferriques, la taille des nanoparticules augmente tout en évitant l'oxydation de celles-ci ( $a_{\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-LDOPA-100\%}} = 8,396 \pm 0,006 \text{ \AA}$  (100%) et  $a_{\text{Fe}_3\text{O}_4} = 8,385 \pm 0,002 \text{ \AA}$ ) et en assurant une grande quantité de molécules greffées (5,9 molécules de LDOPA/nm<sup>2</sup> à 100% en ratio molaire). Mélangée avec la soude en run 2 (avant la synthèse des nanoparticules), la molécule organique se greffe en proportion plus faible que dans le run 1 tout en entraînant une diminution de la taille des nanoparticules ( $\varnothing_{\text{DRX Fe}_3\text{O}_4\text{-LDOPA-33\%}} = 4,7 \pm 0,1 \text{ nm}$  et  $\varnothing_{\text{MET-Fe}_3\text{O}_4\text{-LDOPA-33\%}} = 5 \pm 2 \text{ nm}$ ) et une oxydation des nanoparticules ( $a_{\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-LDOPA-33\%}} = 8,347 \pm 0,010 \text{ \AA}$ ). Dans le run 3, les nanoparticules sont très oxydées et la taille des cristallites est inchangée (Figure 53).

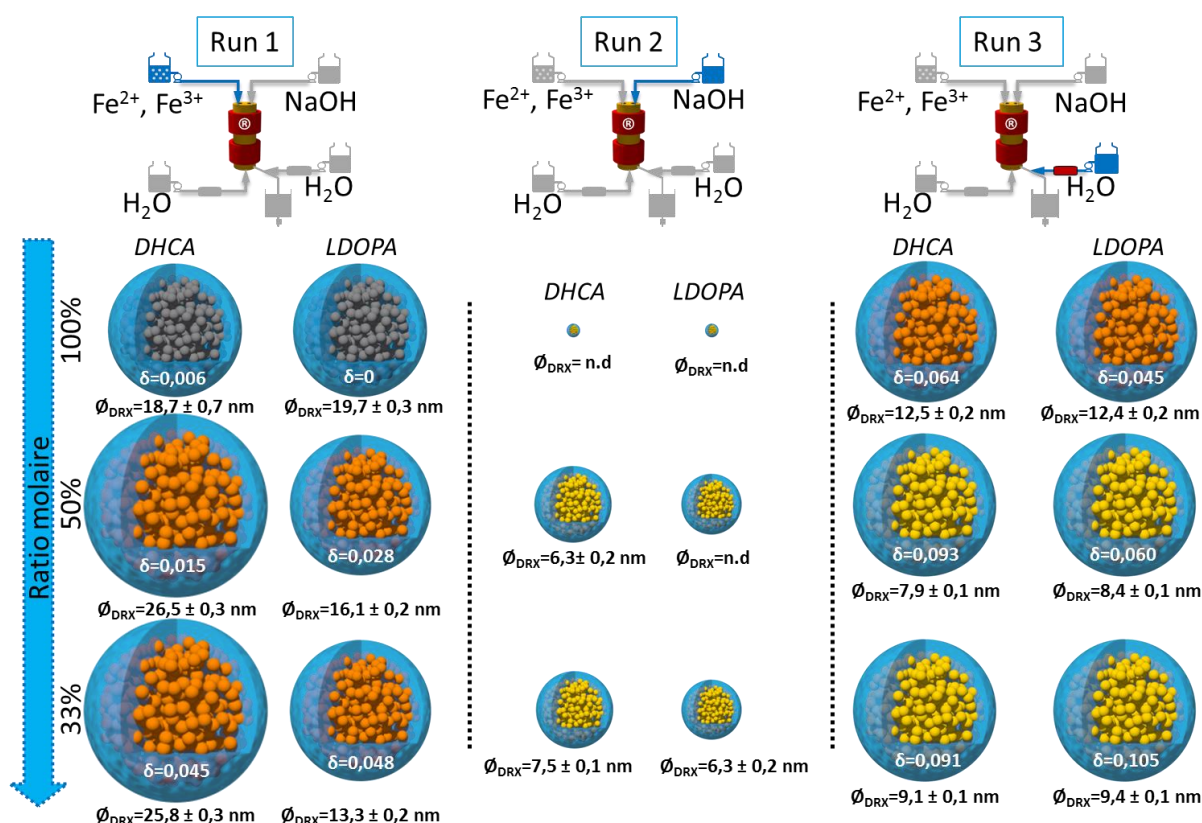


Figure 53 : Evolution de la taille des cristallites et de l'état d'oxydation des nanoparticules  $Fe_3O_4$  en fonction des runs (1, 2 ou 3), des molécules organiques (DHCA ou LDOPA) et du ratio molaire (33, 50 et 100%) à 150°C, 25 MPa et 80 mL.min<sup>-1</sup>

Le fait d'avoir changé le lieu de mélange des molécules organiques a entraîné un changement de la taille, de l'état d'oxydation et de la quantité de molécules greffées à la surface des nanoparticules. Le run 1, *i.e.* lorsque les ligands sont mélangés avec les sels métalliques, permet d'améliorer ces trois critères à la fois. En étant introduites avec les ions ferreux et ferriques avant la synthèse des nanoparticules, les molécules organiques non déprotonnées sont capables de réduire les ions  $Fe^{3+}$  en ions  $Fe^{2+}$  (Figure 45) en évitant ainsi l'oxydation des ions  $Fe^{2+}$  sous l'effet de la température et de l'environnement oxydant. Les molécules ont le temps de se complexer avec la surface des nanoparticules en étant mélangées préalablement avec les ions ferreux et ferriques.

A l'inverse en run 2, les molécules organiques sont complètement déprotonnées et interagissent *via* tous les groupements ( $COO^-$ ,  $NH_2$  et  $CO^-$ ) avec les ions et les nanoparticules. Cette interaction forte a conduit à une diminution drastique de la taille des nanoparticules peu cristallisées et à une oxydation importante des molécules organiques.

Dans le dernier cas (run 3), les ligands ajoutés après la synthèse des nanoparticules n'ont pas modifié la taille des nanoparticules. Ils ont cependant oxydé très fortement les nanoparticules. Totalement déprotonnées, les molécules se sont complexées sur la surface des nanoparticules conduisant à des oxydations des ions  $Fe^{2+}$  en ions  $Fe^{3+}$ , des dégradations de la surface des nanoparticules (pertes des ions  $Fe^{3+}$  réduits en ions  $Fe^{2+}$  libres) et créant des déficiences cationiques. L'effet de la température et du pH basique (favorisant l'oxydation des ligands) accélèrent ce processus.

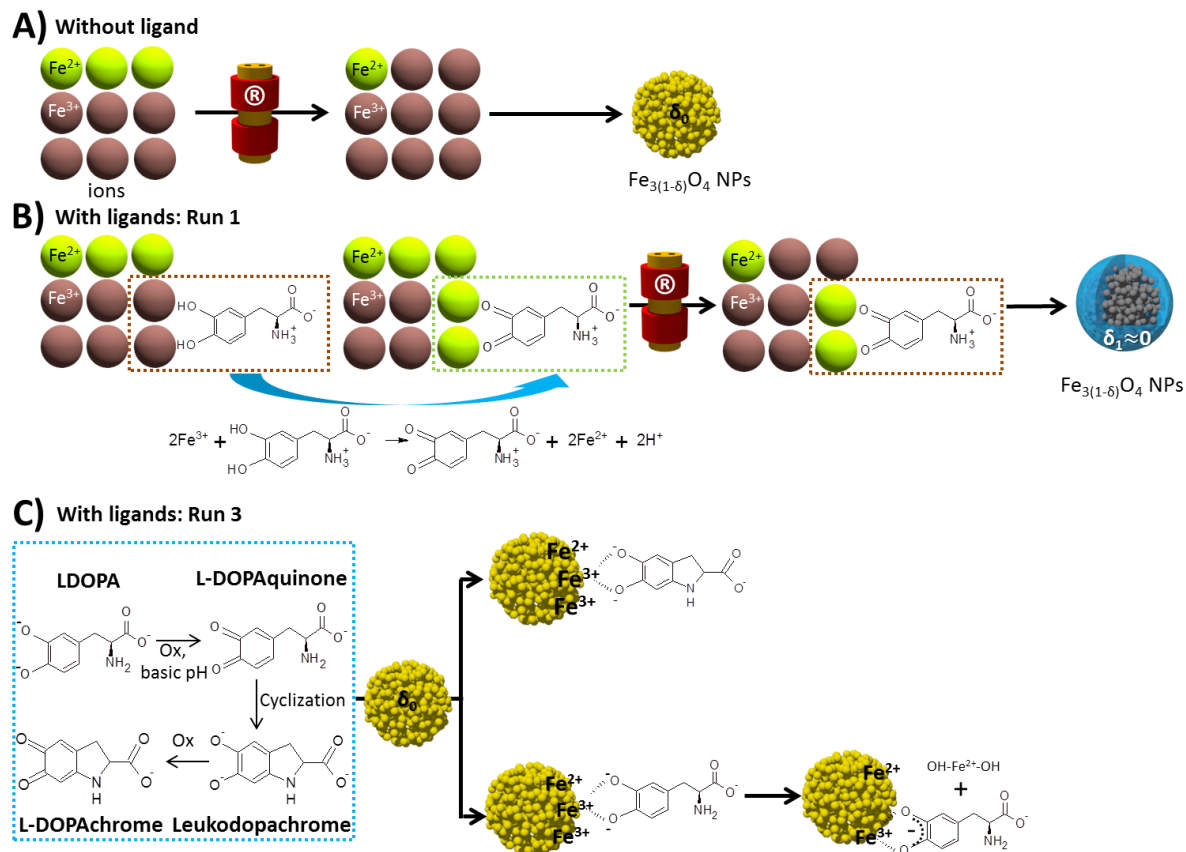


Figure 54 : Mécanismes et évolutions des ions ferreux et ferriques en run 1, A) sans les catéchols et B) avec les catéchols (LDOPA sélectionné comme exemple) et C) en run 3

Le pH élevé (>12) dans les deux derniers runs a favorisé l'oxydation des agents organiques les contraignant à ne plus se complexer efficacement avec la surface des nanoparticules. C'est pour cette raison que la quantité d'agents greffée est plus faible que dans le cas du run 1.

Enfin, une concentration importante en molécules organiques réduit l'oxydation des nanoparticules et assure un greffage plus important à la surface des nanoparticules.

Ces principales observations ont conduit à la soumission de l'article présenté ci-dessous (§ 2.5.2) dont les supporting information sont présentées en Annexe 3.

## 2.5.2 Publication 2 publiée à RSC Advances



Cite this: *RSC Adv.*, 2015, 5, 78614

## Functionalized Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles: influence of ligand addition sequence and pH during their continuous hydrothermal synthesis†

G. Thomas, F. Demoisson, O. Heintz, N. Geoffroy, L. Saviot and N. Millot\*

In this study we report various new efficient ways to synthesize and modify *in situ* magnetite (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>) iron oxide nanoparticles (NPs). Thanks to an apparatus especially developed for this new method of grafting, the NPs have been synthesized and functionalized by 3,4-dihydroxyhydrocinnamic acid (DHCA) or 3,4-dihydroxy-L-phenylalanine (LDOPA) in one step and under hydrothermal conditions using varying concentration ratios ([organic molecules]/[ferrous and ferric ions]). The organic molecules were added before or after the NP synthesis. The addition of these organic molecules modifies the structure, the morphology, the oxidation degree and the growth of the crystallites. Adding the organic molecules before the synthesis step and under acidic conditions increases the average crystallite size and prevents further oxidation whereas under basic conditions the growth is stopped but a partial oxidation of magnetite to maghemite NPs is observed. Adding DHCA or LDOPA after the synthesis step results in a modification of the lattice structure and oxidation degree of the NPs but does not change the average size. This study underlines the importance of the sequence of the addition of organic molecules on the synthesis of NPs.

Received 28th August 2015  
Accepted 7th September 2015

DOI: 10.1039/c5ra17452j

www.rsc.org/advances

### Introduction

Iron oxide NPs are widely used in the industrial and biological domains due to their magnetic properties.<sup>1,2</sup> They are attractive due to their superparamagnetic behavior for sizes less than approximately 20 nm.<sup>3,4</sup> Thanks to their chemical and physical properties such NPs are used in the biomedical domains in particular for targeting, imaging (MRI: Magnetic Resonance Imaging) and therapy.<sup>5-7</sup>

Various methods exist to prepare iron oxides NPs such as thermal decomposition,<sup>8</sup> co-precipitation<sup>9</sup> and hydrothermal synthesis under subcritical or supercritical conditions.<sup>10-14</sup> In particular hydrothermal continuous processes allow a large productivity and a good control of the size and shape distributions of the NPs.<sup>15-17</sup> Moreover iron oxide NPs can be synthesized and coated by organic molecules in one step in order to improve their size and their biocompatibility.<sup>11,16,18</sup> Lately some studies have shown the interest of organic molecules such as citric acid, DHCA, or clickable anchors like 5-hexynoic or 10-undecynoic acid to control and modify the size and the biocompatibility of the NPs to make them suitable for application in the biomedical and imaging domains.<sup>14,16,19</sup>

Under hydrothermal conditions, a basic pH is required in order to synthesize magnetite by the coprecipitation of ferrous and ferric ions.<sup>20-22</sup> In such conditions the grafting of organic molecules may be difficult. Indeed, grafting may require either an acidic or a basic pH.<sup>23</sup> It is therefore necessary to adjust the pH in order to optimize the grafting on the surface of the iron oxide NPs.

To the best of our knowledge, no previous study tried to assess the importance of the sequence of addition of catechol ligands on the hydrothermal synthesis of oxide NPs. The sequence of additions of other ligands has already been studied for instance in the case of FePt NPs synthesized *via* thermal decomposition in a batch reactor<sup>24</sup> (oleyamine and oleic acid) or in the case of iron oxide NPs (with hexanoic acid, 5-hexynoic acid or 10-undecynoic acid) synthesized near-critical and supercritical water.<sup>25</sup> In this work, our synthesis setup has been modified to this end. A new input has been added after the reactor. We report the grafting of DHCA and LDOPA on iron oxide NPs with a continuous hydrothermal process and explore the effects of the mixing conditions (sequence of the mixing step (pH) and concentrations).<sup>26</sup> These agents may be added with the metallic precursors or with the NaOH solution (before the synthesis step in both cases) or immediately after the formation of the iron oxide NPs thanks to this process. This study highlights how the mixing conditions modify the crystallite size, the anchoring and the oxidation degree of iron oxides. Controlling all these parameters would be difficult to achieve in a batch reactor.

Laboratoire Interdisciplinaire Carnot de Bourgogne UMR 6303 CNRS-Université de Bourgogne Franche-Comté, 9 Av. A. Savary, BP 47870 F-21078 Dijon Cedex, France.  
E-mail: nmillot@u-bourgogne.fr

† Electronic supplementary information (ESI) available: Figures not included for brevity, Raman, TEM and XPS measurements. See DOI: 10.1039/c5ra17452j



## Experimental

### Chemicals

Iron(III) sulfate (97%), ammonium iron(II) sulfate hexahydrate (99%), sodium hydroxide (99%), LDOPA (98%) and DHCA (98%) were purchased from Sigma Aldrich. Demineralized water ( $\sigma = 2.2 \mu\text{S cm}^{-1}$ ) has been used for the hydrothermal synthesis.

### Magnetite nanoparticles synthesis

The hydrothermal continuous process is presented in Fig. 1. The reactor is described in details elsewhere.<sup>26,27</sup> However, the process has been recently modified in order to optimize and improve the coating of NPs by organic molecules (see run type 3 thereafter). At ambient temperature, ferrous and ferric metal salts in an aqueous medium with a 1 : 2 molar ratio (8 mM and 16 mM respectively, HPP 1) and a NaOH solution (33 mM) (HPP 2) are introduced in the countercurrent reactor as well as pre-heated demineralized water (HPP 3). The temperature is monitored and controlled by several thermocouples and furnaces. Pressure is regulated and kept constant in the whole apparatus thanks to a back pressure regulator located at the outlet. The organic modifiers (a = LDOPA or DHCA) are added in three different ways (run types 1, 2 or 3) and three molar ratios ( $b = [\text{organic molecule}]/[\text{Fe}^{2+} + \text{Fe}^{3+}] = 0, 33, 50$  or 100%). Experiments are noted run{1/a/b} if the organic modifier is added with the metallic salt precursors, run{2/a/b} if the organic modifier is added in the NaOH solution before the synthesis step and run{3/a/b} if the organic modifier is introduced at the outlet of the reactor with the NaOH solution (33 mM) *via* HPP 4. NaOH is used to deprotonate the functional groups of the

organic molecules. All experiments were carried out at 150 °C and 250 bar with a total flow rate of 80 mL min<sup>-1</sup> (4 × 20 mL min<sup>-1</sup>). The suspension is quickly cooled down to room temperature thanks to a cooling bath in order to stop the growth of the NPs. The synthesis lasts 11 seconds. The solid products are isolated by centrifugation (24 400g, 15 000 rpm during 10 min) and washed by dialysis (Cellu-Sep® tubular membranes of 3500 Da) until the dielectric constant is 2.2 μS cm<sup>-1</sup>. Samples are then freeze-dried in order to obtain powders for subsequent analyses.

### XRD measurements

Powder X-ray Diffraction (XRD) patterns were collected using a Bruker D8 Advance diffractometer and the Cu K $\alpha_{1,2}$  radiations ( $\lambda_{\alpha_1} = 1.540598 \text{ \AA}$  and  $\lambda_{\alpha_2} = 1.544426 \text{ \AA}$ ). Scans were measured over the 2 $\theta$  25–65° range with a step of 0.026° and a scan speed of 52 seconds per angle. The Topas® software was used for data analysis (lattice parameters and mean crystallite size determined using the Le Bail method). Both K $\alpha_{1,2}$  radiations were taken into account in the fitting process. The XRD measurements took place after approximately the same time after the synthesis step for all the samples.

### TGA measurements

A Discovery TGA-TA instrument with a nitrogen flow rate of 25 mL min<sup>-1</sup> and a temperature ramp of 5 °C min<sup>-1</sup> from 25 to 800 °C was used to analyse the powders.

### Raman measurements

Raman spectroscopy measurements of the dried powders were performed using a Renishaw inVia apparatus. The 632.8 nm excitation wavelength of an He/Ne laser was used with a power density of ~3 kW cm<sup>-2</sup>. A baseline correction has been applied.

### TEM observations

Transmission Electron Microscopy (TEM) images were obtained using a JEOL JEM-2100F microscope operating at 200 kV (point to point resolution of 0.19 nm). The samples were prepared by evaporating a diluted suspension of the NPs in an ethanol solution on a carbon-coated copper grid. The mean crystallite size for each sample was determined by measuring 100 NPs. The size distribution curves for each sample were then fitted with a Gaussian distribution.

### XPS measurements

X-ray Photoelectron Spectroscopy (XPS) measurements were recorded with a PHI 5000 Versaprobe instrument equipped with an Al K $\alpha_1$  monochromatic radiation ( $E_{K\alpha}(\text{Al}) = 1486.7 \text{ eV}$  with a 200 μm diameter spot size). Powders were pressed on an indium sheet in order to immobilize the NPs during measurements. Data were analyzed with the CasaXPS processing for curve fitting and MultiPak software for quantitative analysis. A neutralization process has been applied in order to avoid charge accumulation at the surface of the samples. The carbon C1s peak at 284.5 eV was used as a reference. A Shirley background

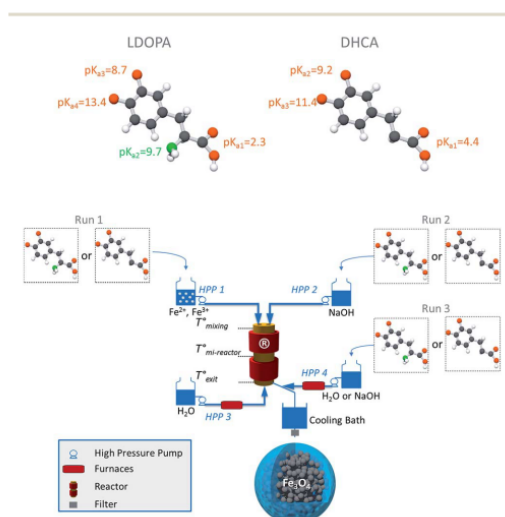


Fig. 1 Diagram of the experimental set-up for the continuous hydrothermal synthesis of iron oxide NPs functionalized with LDOPA or DHCA (HPP: High Pressure Pump, red ball: O, black ball: C, white ball: H, green ball: N).

was subtracted and a Gauss (70%)–Lorentz (30%) profile was used. Full Width at Half Maximum (FWHM) were fixed between 1.5 and 2.0 eV except for the curves fitting of the C1s ( $\pi$ – $\pi^*$ ) and N1s (2.0–2.3 eV) peaks.

### BET measurements

BET measurements were performed with a Micromeritics Tristar II apparatus. Samples were outgassed *in situ* under a pressure of 20 mTorr and at 100 °C. The measurements were performed at liquid N<sub>2</sub> temperature with N<sub>2</sub> as the adsorbing gas. The mean apparent particle diameters ( $\phi_{\text{BET}}$ ) were derived from the surface area assuming that the nanometric crystallites have a smooth and spherical shape with a narrow size distribution. They have been calculated using the equation:  $\phi_{\text{BET}} = 6000/(\rho \times S)$  where  $\phi_{\text{BET}}$  is the mean apparent particle diameter (nm),  $S$  is the surface area ( $\text{m}^2 \text{g}^{-1}$ ) and  $\rho$  the mass density ( $5.2 \text{ g cm}^{-3}$  in the case of magnetite).

### DLS measurements

Dynamic Light Scattering (DLS) measurements of suspensions at pH = 7.4 and in  $10^{-2} \text{ M NaCl}$  have been carried out at  $25 \pm 0.1$  °C using a Malvern Zetasizer Nano ZS by DTS Nano V4.2 software. Sample were ultrasonicated and filtered (filter of 0.45  $\mu\text{m}$ ).

## Results and discussion

According to the literature, catechols can react with oxidant species such as metallic cations ( $\text{Mn}^{4+}$  or  $\text{Fe}^{3+}$  for instance)

depending on the pH conditions. Under acid conditions and in presence of  $\text{Fe}^{3+}$  ions, catechols are oxidized into quinones. This is the case for LDOPA which transform into L-DOPAquinone in run type 1 (Fig. 1).<sup>28,29</sup> However a basic pH promotes the instability of these molecules (especially LDOPA).<sup>23,30</sup> Indeed, without metallic ions, dopaquinone can be formed. Then cyclization takes place spontaneously into leukodopachrome which can be transformed into L-DOPachrome by oxidation (Fig. 2).<sup>31,32</sup>

### Nature of the synthesized oxides

All XRD measurements in Fig. 3 show the formation of  $\text{Fe}_{3(1-\delta)}\text{O}_4$  magnetite ( $\delta$  is the deviation from oxygen stoichiometry)<sup>33</sup> whatever the order of the addition of the organic molecule, the concentration and the nature of the organic molecule (run{1/a/b}, run{2/a/b}, run{3/a/b}). The XRD patterns reveal the inverse cubic spinel structure of  $\text{Fe}_{3(1-\delta)}\text{O}_4$  magnetite ( $Fd\bar{3}m$ ) (magnetite ICDD: 19-0629). Raman measurements confirm this observation through the presence of the characteristic  $A_{1g}$  ( $668 \text{ cm}^{-1}$ ) and  $A_1$  ( $720 \text{ cm}^{-1}$ ) peaks of magnetite and maghemite respectively (Fig. S1†).

In addition to  $\text{Fe}_{3(1-\delta)}\text{O}_4$ , two other lattice structures are observed in the XRD patterns (run{1/DHCA/100%} and run{3/DHCA/100%}) (Fig. 3B). When DHCA is added to the ferrous and ferric solution (run{1/DHCA/100%}) or to the NaOH solution after the synthesis of the NPs (run{3/DHCA/100%}), 2-line ferrihydrite ( $\text{Fe}(\text{III})$  oxyhydroxide, precursor of goethite or hematite)<sup>34</sup> and wüstite ( $\text{Fe}_{1-x}\text{O}$ ) are produced respectively (2-line ferrihydrite ICDD: 058-0900 and wüstite ICDD: 089-0687). These

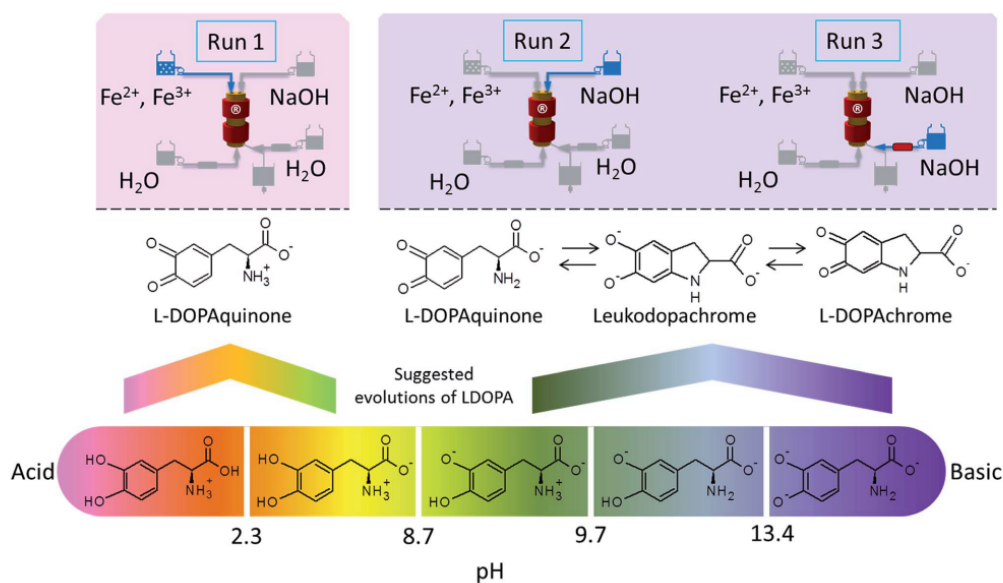


Fig. 2 Evolution of a catechol (LDOPA as example) according to the pH and the run type of the hydrothermal continuous synthesis.

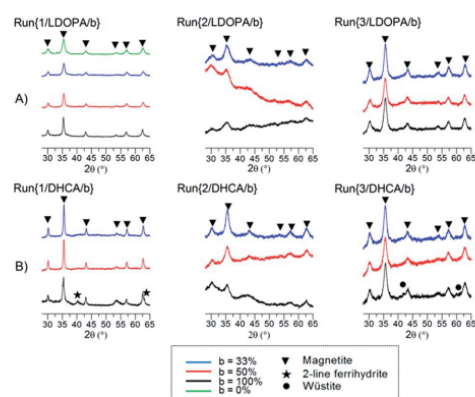


Fig. 3 XRD patterns of (A)  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -LDOPA and (B)  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -DHCA NPs from run(1/a/b), run(2/a/b) and run(3/a/b).

lattice structures appeared only for large concentrations of DHCA (molar ratio of 100%). When the molar ratio decreases (50% or 33%) only  $\text{Fe}_{3(1-b)}\text{O}_4$  magnetite NPs are produced. These structures are not observed by Raman spectroscopy. We should notice that according to the diffractograms and the previous publication,<sup>35</sup> the proportion of these two structures is very low compared to magnetite. Usually the ferrihydrite phase is poorly crystallized and the average size of the NPs is around 2 nm.<sup>36</sup> It can be converted into hematite ( $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ) at neutral pH and high temperature (>85 °C) or into goethite ( $\text{FeO}(\text{OH})$ ) under either acidic or basic conditions.<sup>36</sup> Previously, it has been reported that some catechols (with electronegative groups) form complexes with  $\text{Fe}^{3+}$ .<sup>37</sup> These complex precursors promote in our case the formation of  $\text{Fe}(\text{III})$  oxyhydroxides or  $\text{Fe}(\text{III})$  oxides such as 2-line ferrihydrite. In our study, the mixing of the metal salt ions and DHCA under acidic conditions enhances the formation of this phase. Moreover the formation of these new phases does not take place only during the nucleation step (run {1/DHCA/100%}) but also during the growth of the NPs and the cooling step (run {3/DHCA/100%}). The wüstite lattice structure is usually obtained at high temperature and/or pressure.<sup>38</sup> It decomposes into metal Fe and  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  when slowly cooled down to room temperature.<sup>39</sup> It can be kept as a metastable phase when quickly cooled.<sup>39,40</sup> Shultz *et al.*<sup>41</sup> reported the partial degradation of iron oxide NPs induced by the coordination of dopamine (chemical structure close to LDOPA) on the surface of NPs. An iron(II) hydroxide fragmentation occurs. In our study, the addition of DHCA at 150 °C and pH ~ 13 after the synthesis probably enhances this phenomenon. Indeed, DHCA molecules are already totally deprotonated. They can anchor by the two  $\text{CO}^-$  groups of the aromatic cycle on the surface of NPs very quickly. The surface degradation stage of the NPs comes faster with the formation of  $\text{Fe}(\text{II})$  hydroxide which lead to the generation of wüstite. We suggest that a high molar ratio of DHCA together with the rapid cooling conditions promote the formation of wüstite.

In summary the addition of DHCA organic molecules (with COOH groups) modifies the lattice structure of the iron oxide NPs unlike the addition of LDOPA (with COOH and  $\text{NH}_2$  groups). LDOPA prevents the formation of the metastable wüstite and 2-line ferrihydrite lattice structures.

#### Grafting efficiency

**Presence of organic molecules.** TGA, Raman and XPS measurements were used to check the grafting of the DHCA and LDOPA molecules at the surface of the iron oxide NPs. An increase of the molar ratio of organic molecules manifests as an additional weight loss after 100 °C which can be observed by TGA measurements (Fig. 4). The weight loss between 20 and 100 °C corresponds to physisorbed water. The presence of Raman peaks in the 1200-1700  $\text{cm}^{-1}$  wavenumber range is used to check the presence of the organic molecules (Fig. S3†). The narrow peak at 1485  $\text{cm}^{-1}$  ( $\nu_{19b}$ ) is assigned to the catechol moiety.<sup>23,42</sup> The skeletal mode of the benzene rings  $\nu_2$  at 1337  $\text{cm}^{-1}$  and the in-plane ring stretches ( $\nu_{8a}$  and  $\nu_{8b}$ ) at about 1586  $\text{cm}^{-1}$  are also observed.<sup>43</sup> A detailed study of these Raman spectra goes beyond the scope of this article. But we note that previous work have demonstrated an enhanced Raman scattering for catechol moieties linked to metal-oxide nanoparticles due to the formation of a charge-transfer complex resulting from a bidentate binding between the two hydroxyl catechols and the surface of the NPs.<sup>30</sup> This suggests that these molecules are probably very close to the surface of the NPs.

Finally XPS measurements show that the C1s and N1s contributions for NPs modified by LDOPA are more intense when organic molecules are introduced during the synthesis which confirms that DHCA and LDOPA are present on the surface of the NPs (Table 2 and Fig. S4†). Carbon peaks observed on naked NPs comes from the contamination resulting from the exposure of the NPs to ambient air. These measurements confirm the grafting of LDOPA and DHCA on the surface of iron oxide NPs.

**Effect of the molar ratio.** When the molar ratio of the organic molecules increases, the coating of the NPs increases too as

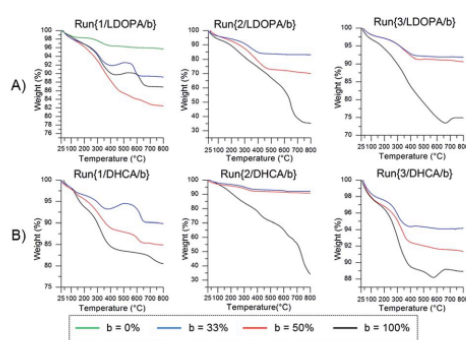


Fig. 4 TGA measurements of (A)  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -LDOPA and (B)  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -DHCA NPs from run(1/a/b), run(2/a/b) and run(3/a/b).

**Table 1**  $S_{\text{BET}}$  is the surface area of the NPs ( $\text{m}^2 \text{g}^{-1}$ ) determined from BET measurements. molec is short for molecules

Samples	a: DHCA		a: LDOPA	
	$S_{\text{BET}}$ ( $\text{m}^2 \text{g}^{-1}$ )	Number of molec per $\text{nm}^2$	$S_{\text{BET}}$ ( $\text{m}^2 \text{g}^{-1}$ )	Number of molec per $\text{nm}^2$
Naked $\text{Fe}_3\text{O}_4$	104 ± 1	—	104 ± 1	—
Run{1/a/100%}	40 ± 1	12.6	50 ± 2	5.9
Run{1/a/50%}	62 ± 1	5.8	81 ± 1	5.0
Run{1/a/33%}	84 ± 1	2.3	106 ± 1	1.9
Run{2/a/100%}	n.d	n.d	6 ± 1	n.d
Run{2/a/50%}	217 ± 1	0.7	51 ± 3	n.d
Run{2/a/33%}	202 ± 1	0.6	194 ± 1	2.0
Run{3/a/100%}	133 ± 1	1.7	48 ± 1	n.d
Run{3/a/50%}	172 ± 1	0.8	144 ± 1	1.1
Run{3/a/33%}	143 ± 1	0.4	139 ± 1	0.9

shown, in most cases, by the increased weight loss measured by TGA (Fig. 4). Thanks to these values combined to surface area measurements (Table 1), the coverage rates (number of organic molecules on the surface of NPs) have been determined: for example in run{1/LDOPA/100%}, 5.9 molecules per  $\text{nm}^2$  cover the surface of the NPs whereas 1.9 molecules per  $\text{nm}^2$  are observed in run{1/LDOPA/33%} (Table 1). The same fact is observed in run type 2 and 3 with LDOPA and DHCA. XPS measurements confirm this observation (Table 2). Indeed, whatever the run type (1, 2 or 3), both ratios of C (%) / Fe (%) and N (%) / Fe (%) (DHCA and LDOPA samples) increase (Table 2) when the amount of molecules rises. For example, C (%) / Fe (%) is equal to 0.5 in run{1/DHCA/33%} and 1.6 in run{1/DHCA/100%}. As expected, a higher surface coverage results from a higher molar ratio of organic agents.

#### Effect of the addition sequence of the organic molecules.

The addition sequence of the organic molecules plays an important role too. Indeed TGA and XPS measurements show that when DHCA and LDOPA are mixed with ferrous and ferric ions in solution in run type 1, the amount of organic molecules grafted on the surface of NPs is higher than in the other cases (Fig. 4 and Table 2). The ratio of the atomic concentrations C (%) / Fe (%) or N (%) / Fe (%) as determined by XPS in run type 1 is approximately equal or higher to the ones in the other runs.

For example, we observed that the ratio of C (%) / Fe (%) for DHCA is 0.6, 0.6 and 0.4 for run{1/DHCA/33%}, run{2/DHCA/33%} and run{3/DHCA/33%} respectively. The same trend is observed by TGA. For example we obtained 2.3 molecules of DHCA per  $\text{nm}^2$ , 0.6 DHCA per  $\text{nm}^2$  and 0.4 DHCA per  $\text{nm}^2$  in run{1/DHCA/33%}, run{2/DHCA/33%} and run{3/DHCA/33%} respectively. When LDOPA or DHCA are added after the synthesis of the NPs, the number of molecules per  $\text{nm}^2$  determined by TGA and the C (%) / Fe (%) ratio determined by XPS are lower than for the other run types (1 and 2) (Tables 1 and 2). In run type 1, DHCA or LDOPA are mixed with metallic ions. They form a “pre-complex” between ions and ligands which leads to a better grafting during the synthesis of the NPs. In run type 2 and 3 the ligands are exposed to high pH (they are totally deprotonated) and not mixed with ferrous and ferric ions before the synthesis of NPs. A partial amount of these ligands may be oxidized into semiquinones and/or quinones and submitted to a cyclization like leukodopachrome (Fig. 2). These new forms conjugated with the very short synthesis time may be less propitious to the grafting of the ligands.<sup>44</sup> In summary the grafting efficiency is improved in run type 1.

But a large quantity of organic molecules is also grafted on the surface of the NPs when DHCA and LDOPA are mixed with

**Table 2** Atomic concentration of naked  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ,  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -DHCA and  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -LDOPA NPs from run(1/a/b), run(2/a/b) and run(3/a/b) as determined by XPS

Samples	a: DHCA					a: LDOPA						
	C (%)	O (%)	Fe (%)	Na (%)	C (%) / Fe (%)	C (%)	O (%)	Fe (%)	N (%)	Na (%)	C (%) / Fe (%)	N (%) / Fe (%)
Naked $\text{Fe}_3\text{O}_4$	9	56	35	—	0.3	9	56	35	—	—	0.3	0
Run{1/a/100%}	29	53	18	—	1.6	27	49	20	4	—	1.4	0.2
Run{1/a/50%}	24	53	23	—	1.0	30	45	20	4	—	1.5	0.2
Run{1/a/33%}	17	52	31	—	0.5	17	50	30	3	—	0.6	0.1
Run{2/a/100%}	53	35	3	9	17.7	53	31	4	6	6	13.3	1.5
Run{2/a/50%}	11	54	35	—	0.3	30	49	17	4	—	1.8	0.2
Run{2/a/33%}	12	53	35	—	0.3	19	48	30	3	—	0.6	0.1
Run{3/a/100%}	18	49	28	5	0.7	33	39	19	4	5	1.7	0.2
Run{3/a/50%}	13	51	36	—	0.4	14	53	29	3	—	0.5	0.1
Run{3/a/33%}	11	54	35	—	0.3	13	50	33	2	—	0.4	0.1



the NaOH solution before the NPs synthesis with a 100% ratio. Atomic concentrations as determined by XPS (Table 2) show a large decrease of the iron atomic concentration from 35% ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) to 3% (run{2/DHCA/100%}) and 4% (run{2/LDOPA/100%}) when the molar ratio increases from 0% to 100%. Moreover C (%) / Fe (%) is larger for run{2/LDOPA/100%} (13.3) compared to run{1/LDOPA/100%} (1.4). This shows that the grafting is significant at high pH and high concentration during run type 2. The coating is larger in this case (Fig. 4). This observation is confirmed by the Raman measurements. Whatever the parameters (run{1/a/b}, run{2/a/b}, run{3/a/b}), no shifts are observed for the  $\nu_3$ ,  $\nu_{8a}$ ,  $\nu_{8b}$  and  $\nu_{19b}$  vibrations (Fig. S3†). However for large pH and large molar ratio (100% and 50%), new bands (torsion  $\tau(\text{HOCC})$ )<sup>45</sup> are observed (run{2/DHCA/100%}, run{2/LDOPA/100%}, run{2/LDOPA/50%} and run{3/LDOPA/100%}) (Fig. S1†). These may be assigned to the different arrangement due to the larger amount of DHCA and LDOPA on the surface of the NPs as observed by TGA and XPS measurements.

**Effect of large concentrations and of the addition sequence of DHCA and LDOPA.** Two drawbacks have to be taken into account at pH  $\sim$  13 (run types 2 and 3). First, a high pH can modify the structure of LDOPA and DHCA (Fig. 2). For instance, when LDOPA is mixed with a NaOH solution with a significant molar ratio (100% and 50%) it can transform into leukodopachrome or L-DOPachrome<sup>30</sup> as shown by the presence of new peaks at 398.1 eV (run{3/LDOPA/100%}) and 398.2 eV (run{2/LDOPA/100%}) in the N1s contribution (Fig. S4C†) in the XPS spectra. The conformation of this nitrogen atom is similar to the one observed for pyridinic compounds.<sup>46–48</sup> This weak N1s peak is assigned to C–N cyclic compounds. The second drawback comes from the reactivity of the functional groups of catechols moieties. Under basic pH, the reactive groups are ( $\text{COO}^-$ ,  $\text{NH}_2$  and  $\text{CO}^-$ , the latter coming from the hydroxyl groups linked to the cycle). Indeed in runs 2 (pH  $\sim$  13) all the functional groups of the ligands are fully deprotonated (Fig. 2). Consequently the interaction between ferrous ions, ferric ions and organic molecules is probably promoted. Furthermore if each group interacts with the surface of the NPs then the following step of grafting between the catechols and other molecules such as PolyEthylene Glycol (PEG) will be inefficient. It is important to avoid this situation in order to allow subsequent graftings to improve the long-time circulation and the stability of the NPs which is required for biomedical applications.

Other contributions in the region of the N1s XPS peak were observed for all samples modified by LDOPA (Fig. S4C†). Whatever the run type (1, 2 or 3),  $\text{NH}_3^+$  groups remain after the synthesis when the molar ratio increases to 100%.<sup>49</sup> However the  $\text{NH}_3^+$  contribution is significantly smaller than the  $\text{NH}_2$  one (9% in run{2/LDOPA/b}) at 399.9 eV.<sup>49</sup> This latter represents neutral amino  $\text{NH}_2$  groups obtained thanks to a basic pH at the outlet of the synthesis. Finally when DHCA and LDOPA are mixed with the NaOH solution with a 100% molar ratio, a high atomic concentration of Na is observed (9 and 6% for run{2/DHCA/100%} and run{2/LDOPA/100%} respectively and 5% for run{3/DHCA/100%} and run{3/LDOPA/100%}) (Table 2). A possible explanation is that organic molecules at high

concentration form a complex with sodium ions. TGA, Raman and XPS measurements confirm that DHCA and LDOPA molecules have been grafted during the continuous synthesis under hydrothermal conditions (150 °C, 25 MPa and  $4 \times 20 \text{ mL min}^{-1}$ ) whatever the sequence of the addition of the organic molecules and the concentration. Large molar ratios increase grafting. In order to fix a large amount of LDOPA and DHCA on the NPs, a molar ratio of 100% is preferred.

#### Anti-oxidizing effect of organic molecules on iron oxide NPs

**Effect of the molar ratio.** Unmodified NPs have a lattice parameter of  $8.385 \pm 0.002 \text{ \AA}$ . The deviation from oxygen stoichiometry  $\delta$  in the formula  $\text{Fe}_{3(1-\delta)}\text{O}_4$  determined from the lattice parameter shows that unmodified NPs are partially oxidized ( $\delta = 0.023$ ).<sup>33,30</sup>

Whatever the run type (1, 2 or 3), increasing the molar ratio of DHCA and LDOPA results in an increase of the lattice parameter ( $a$ ) and a decrease of the deviation from oxygen stoichiometry ( $\delta$ ). NPs are better protected against oxidation during the synthesis by larger molar ratios. For example, when the molar ratio of LDOPA or DHCA increases from 33% to 100% in run type 3, the lattice parameter of the coated NPs increases from  $8.346 \pm 0.003 \text{ \AA}$  (run{3/LDOPA/33%}) to  $8.374 \pm 0.003 \text{ \AA}$  (run{3/LDOPA/100%}) and the deviation from oxygen stoichiometry decreases from 0.105 (33%) to 0.045 (100%). These observations are confirmed by Raman spectroscopy. Indeed, with a low percentage of organic molecules (33% and 50%), whatever the run type (1, 2 or 3), a slight shoulder at  $720 \text{ cm}^{-1}$  characteristic of the  $A_1$  peak of maghemite ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ) is observed (Fig. S1†). The anti-oxidizing effect results from the formation of a “protective layer” at the surface of the NPs whose coverage increases when the molar ratio increases as demonstrated previously (Fig. 6). Only the  $A_{1g}$  Raman peak is observed for non-oxidized samples (run{1/LDOPA/100%} and run{1/LDOPA/100%}). This latter is characteristic of magnetite. Raman spectroscopy supports the XRD results.

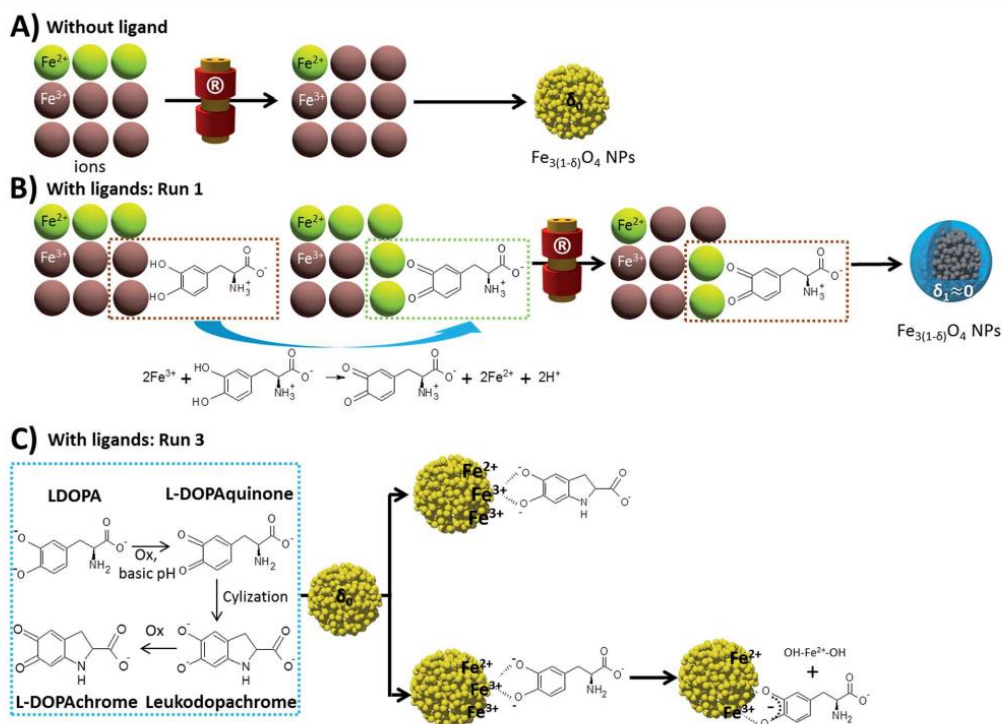
For each sample, the  $\text{Fe}2p_{3/2}$ ,  $\text{Fe}2p_{1/2}$  and  $\text{Fe}2p_{3/2}$  satellite peaks are observed in the XPS spectra (Fig. S2†).<sup>51</sup> In the case of unmodified NPs, the binding energies are respectively 710.4 eV, 723.9 eV and 718.6 eV. The binding energy difference between the  $\text{Fe}2p_{3/2}$  and the satellite peak of the  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -LDOPA and  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -DHCA NPs obtained in all cases with run{1/a/b}, run{2/a/b} and run{3/a/b} is always approximately 8.2 eV. This value is usually linked to the oxidation degree of iron cations and changes with the presence of  $\text{Fe}^{2+}$  or  $\text{Fe}^{3+}$ . It does not enable us to conclude about the oxidation state of the iron cations (Table S1†).<sup>51,52</sup>

**Effect of the addition sequence (run type).** The anti-oxidizing effect is more pronounced for run type 1 (pH  $\sim$  3) than for the two others (Table 3). Indeed the lattice parameters in run type 1 are higher than in run types 2 and 3. Additionally when DHCA and LDOPA are mixed with  $\text{Fe}^{2+}$  and  $\text{Fe}^{3+}$  ions with a molar ratio of 100% (run{1/LDOPA/100%} and run{1/DHCA/100%}), the lattice parameters are very close to pure magnetite ( $a = 8.396 \text{ \AA}$ )<sup>53</sup> and higher than that of unmodified NP ( $8.385 \pm 0.002 \text{ \AA}$ ) (Table 3). A high concentration of organic agents and an acid

**Table 3** Structural parameters of naked  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  NPs and  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  NPs modified by DHCA and LDOPA from run(1/a/b), run(2/a/b) and run(3/a/b).  $a$  (Å) is the lattice parameter,  $\delta$  the deviation from oxygen stoichiometry of  $\text{Fe}_{3(1-\delta)}\text{O}_4$ ,  $\varnothing_{\text{TEM}}$  the mean diameter of the crystallites as determined from the TEM images (100 crystallites),  $\varnothing_{\text{BET}}$  is the diameter of the nanoparticles resulting from surface area measurements and  $\varnothing_{\text{XRD}}$  the diameter of the crystallites as determined from the XRD patterns. n.d is short for not determined

Samples	a: DHCA					a: LDOPA				
	$\varnothing_{\text{TEM}}$ (nm)	$\varnothing_{\text{XRD}}$ (nm)	$a$ (Å)	$\delta$	$\varnothing_{\text{BET}}$ (nm)	$\varnothing_{\text{TEM}}$ (nm)	$\varnothing_{\text{XRD}}$ (nm)	$a$ (Å)	$\delta$	$\varnothing_{\text{BET}}$ (nm)
Naked $\text{Fe}_3\text{O}_4$	8 ± 2	10.4 ± 0.1	8.385 ± 0.002	0.023	11.1 ± 0.1	8 ± 2	10.4 ± 0.1	8.385 ± 0.002	0.023	11.1 ± 0.1
Run{1/a/100%}	22 ± 5	18.7 ± 0.7	8.392 ± 0.007	0.006	28.8 ± 0.7	20 ± 5	19.7 ± 0.3	8.396 ± 0.007	0	23.1 ± 0.9
Run{1/a/50%}	23 ± 7	26.5 ± 0.3	8.386 ± 0.001	0.015	18.7 ± 0.3	15 ± 4	16.1 ± 0.2	8.382 ± 0.002	0.028	14.2 ± 0.1
Run{1/a/33%}	25 ± 7	25.8 ± 0.3	8.374 ± 0.001	0.045	13.8 ± 0.1	11 ± 3	13.3 ± 0.2	8.373 ± 0.002	0.048	10.9 ± 0.1
Run{2/a/100%}	n.d	5 ± 2	n.d	n.d	n.d	n.d	5 ± 3	n.d	n.d	231 ± 9
Run{2/a/50%}	6 ± 1	6.3 ± 0.2	8.372 ± 0.008	0.050	5.3 ± 0.1	6 ± 1	4 ± 1	n.d	n.d	22.4 ± 1.2
Run{2/a/33%}	7 ± 1	7.5 ± 0.1	8.367 ± 0.001	0.060	5.7 ± 0.1	5 ± 2	4.7 ± 0.1	8.347 ± 0.010	0.102	6.0 ± 0.1
Run{3/a/100%}	8 ± 1	12.5 ± 0.2	8.365 ± 0.003	0.064	8.7 ± 0.1	8 ± 4	12.4 ± 0.2	8.374 ± 0.003	0.045	24.0 ± 0.5
Run{3/a/50%}	8 ± 1	7.9 ± 0.1	8.352 ± 0.003	0.093	6.7 ± 0.1	7 ± 1	8.4 ± 0.1	8.367 ± 0.004	0.060	8.0 ± 0.1
Run{3/a/33%}	8 ± 1	9.1 ± 0.1	8.359 ± 0.003	0.091	8.1 ± 0.1	8 ± 2	9.4 ± 0.1	8.346 ± 0.003	0.105	8.3 ± 0.1

pH promote the anti-oxidizing effect on the NPs during the synthesis step. Indeed, before the synthesis of the NPs, these molecules which are mixed with ferrous and ferric ions (pH ~ 3) in run type 1 are hardly deprotonated (Fig. 2 and 5). Only the COOH groups can be a little deprotonated and bind with other ions. On the contrary under basic conditions (pH ~ 13 as in run types 2 and 3), the  $\text{NH}_2$  and OH groups from the catechol moieties are deprotonated and can bind with iron ions (run type 2) or with the surface of the NPs (run type 3). Under acidic conditions, catechol moieties and  $\text{Fe}^{3+}$  ions can react to produce



**Fig. 5** Mechanisms and evolution of ferrous and ferric ions in run type 1, (A) without catechol and (B) with catechol (LDOPA as example) in run type 1 and (C) in run type 3.

quinone moieties leading to a reduction of  $\text{Fe}^{3+}$  into  $\text{Fe}^{2+}$ .<sup>29</sup> Thanks to this process and despite the fact that  $\text{Fe}^{2+}$  ions transform easily into  $\text{Fe}^{3+}$  ions at high temperature and pressure,<sup>17</sup> it is possible to keep a 1 : 2 molar ratio which is required to have pure magnetite (Fig. 5). This may be the reason of the appearance of an anti-oxidizing effect in this work. Under basic conditions, DHCA and LDOPA are fully deprotonated in run type 2 and 3 and a significant oxidation of the iron oxide NPs is observed. At the same pH value (pH  $\sim$  13 in run type 2 and 3) and concentration (33%, 50% and 100% molar ratios) there is a difference between run type 2 and 3. Indeed, when DHCA is introduced before the synthesis of the NPs (run{2/DHCA/b}), the lattice parameter and the deviation from stoichiometry reveal a moderate oxidation compared to run{3/DHCA/b}. In run type 3, the measured lattice parameters are lower than those of bare NPs. For example, in run{3/LDOPA/100%} the lattice parameter is equal to that of maghemite ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ,  $a = 8.345 \text{ \AA}$ ).<sup>54</sup> It has been reported that some catechols strongly bind to  $\text{Fe}^{3+}$  ions at the surface of NPs and can be removed from the surface and reduced into  $\text{Fe}^{2+}$  with an oxidation of the organic molecules into semi-quinones or/and quinones (Fig. 5).<sup>29,37,41,44</sup> Compared to run type 1, organic molecules are introduced with higher pH value and temperature. These parameters can promote the oxidation of LDOPA and DHCA into semi-quinones and/or quinones before cyclization (Fig. 5). Totally deprotonated, the bidentate binding is accelerated and the ligands promote and speed up the degradation of the nanoparticle surface. A loss of  $\text{Fe}^{3+}$  is observed (Fig. 5). This cation deficiency in the  $\text{Fe}_{3(1-\delta)}\text{O}_4$  structure may explain the high oxidation of the NPs in run type 3.

However no conclusion can be reached for run type 2 concerning the LDOPA and DHCA samples because the NPs are poorly crystallized (see below). We have shown above that organic molecules are present on the surface of the NPs. They form a layer whatever the run type (Fig. 6). In run type 1, DHCA and LDOPA protect the NPs from oxidation during the synthesis. In run types 2 and 3, oxidation occurs but is limited when using a large molar ratio. DHCA and LDOPA do not act only before or during the synthesis step but also after. They

modify the oxidation degree of the NPs depending on the order of their addition (Fig. 6). A high concentration and a mixing of the organic agents (LDOPA and DHCA) with ferrous and ferric ions (run 1) are preferred to synthesize non-oxidized  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  NPs. Moreover the modification of the oxidation degree cannot be explained by the size of NPs. Indeed as demonstrated in the next part, for run type 3 the size of the NPs is equal to the one of the bare NPs but they are more oxidized (Table 3).

#### Effect of the organic molecules on the size and morphology of iron oxide NPs

**Effect of the addition sequence (run type).** The addition of DHCA and LDOPA plays a role on the crystallite size of the NPs as determined by XRD (Fig. 3 and Table 3), TEM images (Fig. 7, Table 3 and Fig. S5†) and BET measurements (Table 1). The size of naked NPs is  $\phi_{\text{XRD}} = 10.4 \pm 0.1 \text{ nm}$ . When adding DHCA and LDOPA with ferric ions, the average size of the crystallites increases by a factor of two approximately whatever the molar ratio (33, 50 and 100%). For example with LDOPA the mean size increases to  $19.7 \pm 0.3 \text{ nm}$  (run{1/LDOPA/100%}). However when the agents are added in run type 2 with the NaOH solution, the effect is opposite. The mean size of the crystallites decreases by a factor of two approximately ( $4.7 \pm 0.1 \text{ nm}$  for run {2/LDOPA/33%} for example). In run type 3 the mean size of the crystallites is unchanged (approximately 8 nm as determined by TEM measurements, Table 3 and Fig. S5†). When DHCA and LDOPA are almost completely protonated (run{1/a/b}), their addition result in an increase the size of the crystallites. Contrary to run type 1, when DHCA and LDOPA are fully deprotonated under basic conditions (run{2/a/b}) they prevent the growth of the crystallites. The interaction between their functional groups and the metallic species is increased. The ferrous and ferric ions bind immediately to the hydroxyls groups of the catechol species during the synthesis. As a result the growth is stopped quickly. Moreover the interaction of the NPs with the surrounding medium occurs at their surface. The larger sizes of the NPs obtained for run type 1 result in a smaller surface to volume ratio. This explains at least in part why the NPs obtained in run type 1 are less oxidized than those obtained in run types 2 and 3 (Fig. 6).

The addition sequence induces also some modifications of the NPs morphology and more particularly when ligands are mixed with metallic ions (run type 1). The NPs look like nanoflowers (Fig. 7B, D and G) as reported previously by Hugouenq *et al.*<sup>55</sup> They are made of spherical NPs resulting from an assembly of small crystallites (Fig. 7B, D and G). This particular morphology is not observed in run type 2 and 3. Indeed, well-defined NPs with spherical and polyhedral shapes are observed (Fig. 7H and I) as well as in the case of bare NPs (Fig. 7A).

In addition, a high agglomeration is observed in run type 2 particularly for LDOPA sample (Fig. 7E). This state in run type 2 could explain the low  $S_{\text{BET}}$  measured in Table 1 ( $S_{\text{BET}} = 6 \pm 1$  and  $S_{\text{BET}} = 51 \pm 3 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$  for run{2/LDOPA/100%} and run{2/LDOPA/50%}). As observed in Fig. S6A–C,† NPs are organized in large aggregates (size around 200 nm) in which crystallized NPs (Fig. S6D†) have an individual size inferior to 10 nm. NPs seem

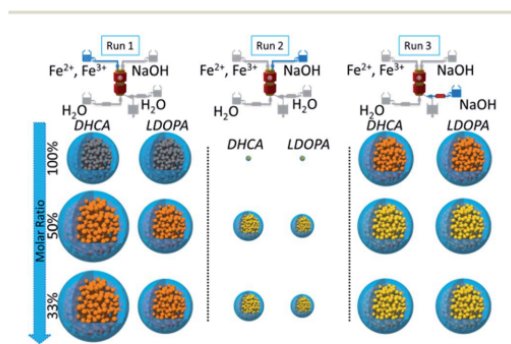


Fig. 6 Effects of DHCA and LDOPA on the oxidation degree and size of the nanoparticles according to the run type and the molar ratio of organic molecules.



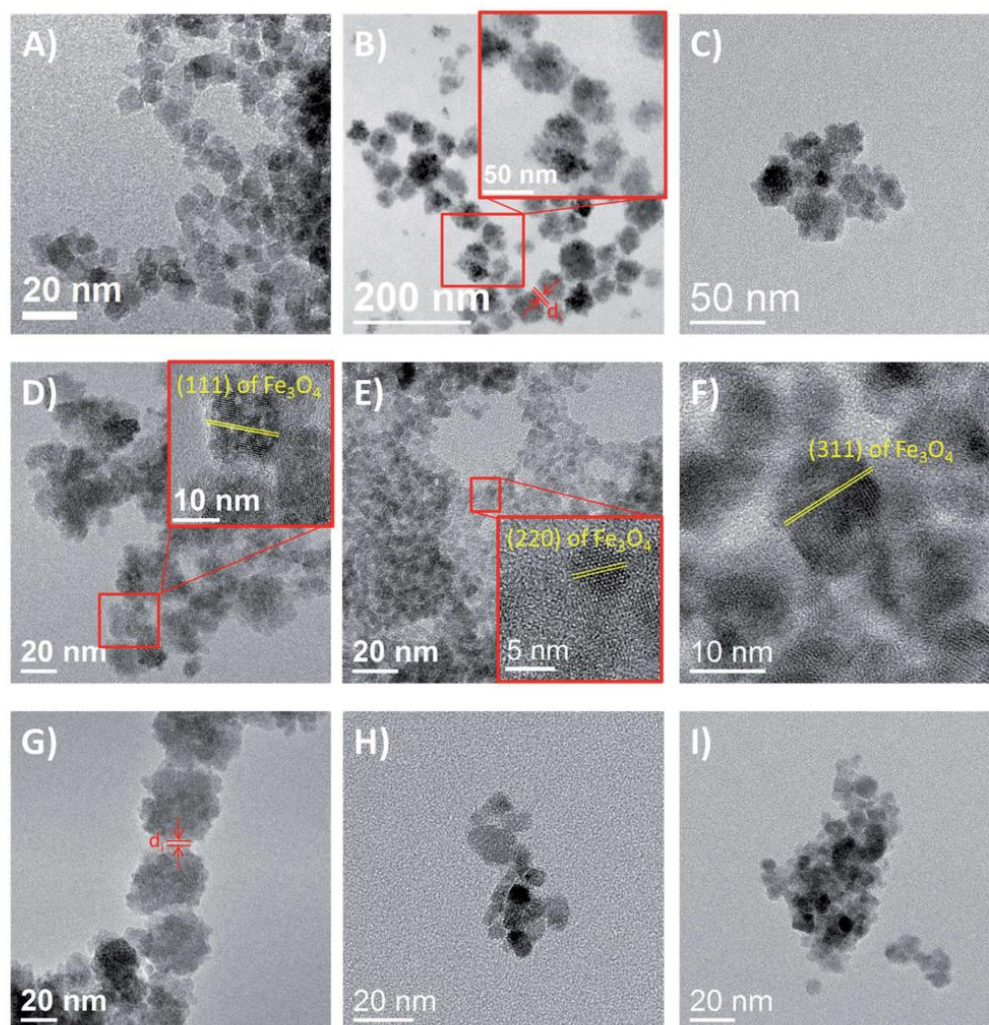


Fig. 7 TEM images of (A) naked  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  NPs, NPs from (B) run{1/LDOPA/100%} (C) run{1/LDOPA/33%}, (D) run{1/LDOPA/50%} and (E) run{2/LDOPA/50%}. (F) HRTEM image for NPs from run{3/LDOPA/50%} (G) run{1/DHCA/33%}, (H) run{2/DHCA/33%} and (I) run{3/DHCA/50%}.

to be more dispersed in run type 1 and 3 (Fig. 7B). In addition, the interparticle edge to edge separation distance of adjacent NPs ( $d_i$ ) in run type 1 is larger (Fig. 7B) than in run type 2 and 3. It confirms the low agglomeration state in run type 1. This interval reveals the presence of a larger organic shell in the nano-gaps of NPs in run type 1 in good agreement with TGA measurements.

NPs synthesized according to run{1/a/100%} are less aggregated compared to naked NPs (Fig. 7A and B). This increased colloidal stability is also proven *via* hydrodynamic size measurements. Indeed, in the case of run{1/LDOPA/100%} and

run{1/DHCA/100%}, we obtained hydrodynamic sizes of  $106 \pm 2$  nm and  $124 \pm 2$  nm respectively at  $\text{pH} = 7.4$  and in  $\text{NaCl } 10^{-2}$  M. In comparison, for naked NPs the hydrodynamic size is  $434 \pm 26$  nm. This state is also observed in Fig. S7.† After 6 hours the suspensions of modified NPs remain stable.

HRTEM images (Fig. 7D–F) show good crystallization (in Fig. 7F, the 0.25 nm interatomic distance which corresponds to (311) plans is highlighted). Sizes obtained thanks to TEM and HRTEM are in quite good agreement with those obtained thanks to XRD (Table 3, Fig. 7 and S5†).



**Effect of organic molecules.** Finally there is a difference between LDOPA and DHCA in run type 1 (Fig. 6). When the molar ratio of DHCA increases from 33% to 100%, the average size decreases (from  $\phi_{\text{XRD}} = 25.8 \pm 0.3$  nm to  $\phi_{\text{XRD}} = 18.7 \pm 0.7$  nm, respectively). In the case of LDOPA, the average size increases (from  $\phi_{\text{XRD}} = 13.3 \pm 0.2$  nm to  $\phi_{\text{XRD}} = 19.7 \pm 0.3$  nm respectively). We suggest that this is the result of the  $\text{NH}_2$  groups of LDOPA. They can prevent an interaction between the  $\text{COO}^-$  groups and the surface of the NPs before and during the synthesis step, interaction that may limit the crystallite growth when it occurs. This explanation is in good agreement with the XPS results. The peak shift of the carboxyl groups of the NPs is smaller for LDOPA than for DHCA (1.5 eV for run{1/DHCA/100%} vs. 0.6 eV for run{1/LDOPA/100%}) (Fig. S4†). Weinhold *et al.*<sup>56</sup> assigned this shift to an interaction between the charge state of  $\text{CO}_2^-$  group and the Au(110) surface.

## Conclusions

Using a continuous process, we have pointed out the impact of the ligand addition sequence on the properties of iron oxide NPs. Such a study would not have been possible using a batch reactor. Despite the short duration of the reaction (11 s), we have shown that the chelating agent (DHCA or LDOPA) concentration and the sequence of its addition (pH) have a significant influence on the structure, the grafting efficiency, the oxidation degree and the size of the magnetite NPs. Finally a high molar ratio ([organic molecules]/ $[\text{Fe}^{2+} + \text{Fe}^{3+}]$ ) (100%) introduced under acidic conditions (run type 1) prevents the further oxidation of the NPs. These optimized parameters lead to crystallites smaller than 20 nm which is preferred for MRI applications (superparamagnetic properties). In run type 2 for which the addition occurs at basic pH and before the synthesis of the NPs, DHCA and LDOPA slow down and stop the growth of the NPs through the interaction between their functional groups and the metallic ions. In run type 3 for which the addition occurs after the synthesis of the NPs, their addition modifies only the lattice structure and the oxidation degree of the NPs. We have therefore demonstrated the effect of both the addition sequence and pH of the organic ligands on the formation of the final functionalized NPs under continuous hydrothermal conditions. We determined that for further biomedical applications needing other graftings (polymers like PEG, chelates to sequester radioelements for bimodal imaging or fluorophores), run type 1 with 100% of organic molecules is preferred. Indeed, it leads to the best results concerning the particle size (lower than 20 nm), oxidation degree (composition close to magnetite), grafting rates (from 6 to 12 LDOPA or DHCA/nm<sup>2</sup>) and conformation of these molecules (carboxylic and amine groups free for further graftings). This study opens new perspective for the grafting and synthesis of oxide NPs under continuous hydrothermal conditions.

## Acknowledgements

This work was supported by the Conseil Régional de Bourgogne. The authors thank Dr Rémi Chassagnon for TEM observations and Maxime Guérineau for BET measurements.

## Notes and references

- 1 R. M. Fratila, S. G. Mitchell, P. del Pino, V. Grazu and J. M. de la Fuente, *Langmuir*, 2014, **30**, 15057–15071.
- 2 S. Laurent, D. Forge, M. Port, A. Roch, C. Robic, L. Vander Elst and R. N. Muller, *Chem. Rev.*, 2008, **108**, 2064–2110.
- 3 A. S. Teja and P.-Y. Koh, *Prog. Cryst. Growth Charact. Mater.*, 2009, **55**, 22–45.
- 4 Y.-X. Wang, S. Hussain and G. Krestin, *Eur. J. Radiol.*, 2001, **11**, 2319–2331.
- 5 J. R. McCarthy and R. Weissleder, *Adv. Drug Delivery Rev.*, 2008, **60**, 1241–1251.
- 6 L. Zhang, W. F. Dong and H. B. Sun, *Nanoscale*, 2013, **5**, 7664–7684.
- 7 L. Maurizi, A.-L. Papa, L. Dumont, F. Bouyer, P. Walker, D. Vandroux and N. Millot, *J. Biomed. Nanotechnol.*, 2015, **11**, 126–136.
- 8 E. D. Smolensky, H. Y. E. Park, T. S. Berquo and V. C. Pierre, *Contrast Media Mol. Imaging*, 2011, **6**, 189–199.
- 9 F.-Y. Cheng, C.-H. Su, Y.-S. Yang, C.-S. Yeh, C.-Y. Tsai, C.-L. Wu, M.-T. Wu and D.-B. Shieh, *Biomaterials*, 2005, **26**, 729–738.
- 10 T. Adschiri, K. Kanazawa and K. Arai, *J. Am. Ceram. Soc.*, 1992, **75**, 1019–1022.
- 11 T. Togashi, S. Takami, K. Kawakami, H. Yamamoto, T. Naka, K. Sato, K. Abe and T. Adschiri, *J. Mater. Chem.*, 2012, **22**, 9041–9045.
- 12 T. Togashi, M. Umetsu, T. Naka, S. Ohara, Y. Hatakeyama and T. Adschiri, *J. Nanopart. Res.*, 2011, **13**, 3991–3999.
- 13 S. Laurent, D. Forge, M. Port, A. Roch, C. Robic, L. Vander Elst and R. N. Muller, *Chem. Rev.*, 2009, **110**, 2574.
- 14 S. Takami, T. Sato, T. Mousavand, S. Ohara, M. Umetsu and T. Adschiri, *Mater. Lett.*, 2007, **61**, 4769–4772.
- 15 M. D. de Tercero, C. Röder, U. Fehrenbacher, U. Teipel and M. Türk, *J. Nanopart. Res.*, 2014, **16**(2350), 1–27.
- 16 L. Maurizi, F. Bouyer, J. Paris, F. Demoisson, L. Saviot and N. Millot, *Chem. Commun.*, 2011, **47**, 11706–11708.
- 17 L. Maurizi, F. Bouyer, M. Ariane, R. Chassagnon and N. Millot, *RSC Adv.*, 2014, **4**, 45673–45678.
- 18 M. D. de Tercero, M. Bruns, I. G. Martínez, M. Türk, U. Fehrenbacher, S. Jennewein and L. Barner, *Part. Part. Syst. Charact.*, 2013, **30**, 229–234.
- 19 G. Liu, J. Gao, H. Ai and X. Chen, *Small*, 2013, **9**, 1533–1545.
- 20 N. Mizutani, T. Iwasaki, S. Watano, T. Yanagida, H. Tanaka and T. Kawai, *Bull. Mater. Sci.*, 2008, **31**, 713–717.
- 21 J. Santoyo Salazar, L. Perez, O. de Abril, L. Truong Phuoc, D. Ihiwakrim, M. Vazquez, J.-M. Greneche, S. Begin-Colin and G. Pourroy, *Chem. Mater.*, 2011, **23**, 1379–1386.
- 22 O. Horner, S. Neveu, S. Montredon, J.-M. Siaugue and V. Cabuil, *J. Nanopart. Res.*, 2009, **11**, 1247–1250.
- 23 N. Lee, D. R. Hummer, D. A. Sverjensky, T. Rajh, R. M. Hazen, A. Steele and G. D. Cody, *Langmuir*, 2012, **28**, 17322–17330.
- 24 M. Chen, J. Kim, J. P. Liu, H. Fan and S. Sun, *J. Am. Chem. Soc.*, 2006, **128**, 7132–7133.
- 25 M. Daschner de Tercero, I. Gonzáles Martínez, M. Herrmann, M. Bruns, C. Kübel, S. Jennewein,

- U. Fehrenbacher, L. Barner and M. Türk, *J. Supercrit. Fluids*, 2013, **82**, 83–95.
- 26 D. Aymes, M. Ariane, F. Bernard, H. Muhr and F. Demoisson, WO patent, 2011010056 A1, 2011.
- 27 A. Aimable, B. Xin, N. Millot and D. Aymes, *J. Solid State Chem.*, 2008, **181**, 183–189.
- 28 W. Byszewska and M. Kanska, *J. Radioanal. Nucl. Chem.*, 2014, **299**, 1373–1378.
- 29 D. E. Fullenkamp, D. G. Barrett, D. R. Miller, J. W. Kurutz and P. Messersmith, *RSC Adv.*, 2014, **4**, 25127–25134.
- 30 W. J. Barreto, S. Ponzoni and P. Sassi, *Spectrochim. Acta, Part A*, 1999, **55**, 65–72.
- 31 E. Herlinger, R. F. Jameson and W. Linert, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, 1995, 259–263.
- 32 G. Robinson and M. Smyth, *Analyst*, 1997, **122**, 797–802.
- 33 P. Poix, *Bull. Soc. Chim. Fr.*, 1965, **4**, 1085–1087.
- 34 Y. Cudenec and A. Lecerf, *J. Solid State Chem.*, 2006, **179**, 716–722.
- 35 T. Belin, N. Millot, N. Bovet and M. Gailhanou, *J. Solid State Chem.*, 2007, **180**, 2377–2385.
- 36 S. Das, M. J. Hendry and J. Essilfie-Dughan, *Environ. Sci. Technol.*, 2011, **45**, 268–275.
- 37 E. Amstad, A. U. Gehring, H. Fischer, V. V. Nagaiyanallur, G. Hahner, M. Textor and E. Reimhult, *J. Phys. Chem. C*, 2011, **115**, 683–691.
- 38 Y. Sugii, M. Inada, H. Yano, Y. Obora, Y. Iwasaki, R. Arakawa and H. Kawasaki, *J. Nanopart. Res.*, 2013, **15**(1379), 1–8.
- 39 J. C. Park, D. Kim, C. S. Lee and D. K. Kim, *Bull. Korean Chem. Soc.*, 1999, **20**, 1005–1009.
- 40 X. L. Yu, Z. Y. Jiang, D. J. Yang, D. B. Wei and Q. Yang, *Adv. Mater. Res.*, 2012, **572**, 249–254.
- 41 M. D. Shultz, J. U. Reveles, S. N. Khanna and E. E. Carpenter, *J. Am. Chem. Soc.*, 2007, **129**, 2482–2487.
- 42 S. J. Hurst, H. C. Fry, D. J. Gosztola and T. Rajh, *J. Phys. Chem. C*, 2010, **115**, 620–630.
- 43 M. L. McGlashen, K. L. Davis and M. D. Morris, *AIP Conf. Proc.*, 1989, **191**, 707–712.
- 44 A. K. L. Yuen, G. A. Hutton, A. F. Masters and T. Maschmeyer, *Dalton Trans.*, 2012, **41**, 2545–2559.
- 45 S. A. Siddiqui, A. K. Pandey, A. Dwivedi, S. Jain and N. Misra, *J. Chem. Pharm. Res.*, 2010, **2**, 835–850.
- 46 J. Lahaye, G. Nansé, A. Bagreev and V. Strelko, *Carbon*, 1999, **37**, 585–590.
- 47 X. Zhang, X. Chen, S. Dong, Z. Liu, X. Zhou, J. Yao, S. Pang, H. Xu, Z. Zhang, L. Li and G. Cui, *J. Mater. Chem.*, 2012, **22**, 6067–6071.
- 48 H. Schmiere, J. Friebel, P. Streubel, R. Hesse and R. Köpsel, *Carbon*, 1999, **37**, 1965–1978.
- 49 A. Schiffrin, A. Riemann, W. Auwarter, Y. Pennec, A. Weber-Bargioni, D. Cvetko, A. Cossaro, A. Morgante and J. V. Barth, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2007, **104**, 5279–5284.
- 50 T. Belin, N. Millot, F. Villieras, O. Bertrand and J. P. Bellat, *J. Phys. Chem. B*, 2004, **108**, 5333–5340.
- 51 T. Yamashita and P. Hayes, *Appl. Surf. Sci.*, 2008, **254**, 2441–2449.
- 52 P. Perriat, E. Fries, N. Millot and B. Domenichini, *Solid State Ionics*, 1999, **117**, 175–184.
- 53 N. Millot and P. Perriat, *J. Solid State Chem.*, 2011, **184**, 2776–2784.
- 54 T. Belin, N. Guigue-Millot, T. Caillot, D. Aymes and J. C. Niepce, *J. Solid State Chem.*, 2002, **163**, 459–465.
- 55 P. Hugouenq, M. Levy, D. Alloyeau, L. Lartigue, E. Dubois, V. Cabuil, C. Ricolleau, S. Roux, C. Wilhelm, F. Gazeau and R. Bazzi, *J. Phys. Chem. C*, 2012, **116**, 15702–15712.
- 56 M. Weinhold, S. Soubatch, R. Temirov, M. Rohlfing, B. Jastorff, F. S. Tautz and C. Doose, *J. Phys. Chem. B*, 2006, **110**, 23756–23769.



### 2.5.3 Conclusion et analyse

Cette étude et l'originalité du dispositif de synthèse montrent ainsi que le lieu d'ajout influence fortement l'état d'oxydation des nanoparticules ainsi que leur taille. La modification du degré d'oxydation est induite par des interactions entre les groupements des molécules organiques (COOH et/ou NH<sub>2</sub>) avec la surface des nanoparticules et/ou les ions ferreux et ferriques.

Pour éviter la libération du fer dommageable pour les applications biologiques visées (Figure 54-C), une solution consisterait à employer la nitroDOPA ou nitrodopamine (Figure 55) qui par la présence du groupement NO<sub>2</sub> sur le cycle aromatique du catéchol induit des délocalisations électroniques des nitrocatechols liés aux Fe<sup>2+</sup>.<sup>272</sup> Cette molécule reste fixée à la surface des nanoparticules et la proximité du groupement NO<sub>2</sub> avec le NH<sub>2</sub> de la molécule est susceptible d'éviter les transformations de la LDOPA en leukodopachrome et donc des libérations de fer comme observé en run 3.

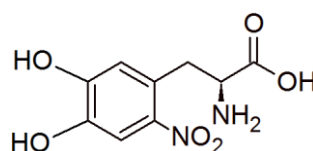


Figure 55 : Schéma d'un nitrocatechol (nitroDOPA)

Il serait aussi intéressant de faire varier le pH sur le run 3 afin d'empêcher l'oxydation trop rapide des catéchols et réduire ainsi la dégradation de la surface des nanoparticules comme il a été observé précédemment.

## 2.6 Greffage de l'acide 6-phosphonohexanoïque en milieu hydrothermal continu

Toujours dans l'optique de greffer une molécule bifonctionnelle à la surface des nanoparticules ayant d'un côté une complexation forte avec les oxydes de fer et de l'autre côté des groupements réactifs pouvant générer un effet électrostatique susceptible d'améliorer la stabilité colloïdale des nanoparticules, cette étude se consacre à un agent organique à base de phosphonate.

### 2.6.1 Contexte du greffage de cette molécule

Les molécules organiques à base de phosphonate sont très largement employées dans des applications industrielles en raison de leur forte affinité avec les oxydes et hydroxydes métalliques. Ces molécules constituent un macroélément nécessaire au fonctionnement des écosystèmes. Cependant, une consommation importante voir excessive de celles-ci conduit à une croissance anormale d'algues dans les eaux. Le nettoyage de ces eaux de cet excès de phosphates devient alors un enjeu crucial.

Les interactions entre les agents phosphonates et les particules de maghémite ou magnétite ont été largement abordées dans la littérature.<sup>153, 283-285</sup> Cependant, à notre connaissance, aucune étude ne traite du greffage *in situ* et en continu de phosphonates en milieu hydrothermal. C'est pour cette raison que cette étude se consacre à la synthèse et à la modification de surface en continu d'oxydes de fer par l'acide 6-phosphonohexanoïque (PHA) *via* le dispositif hydrothermal en continu (Figure 56). Ce travail a pour objectifs (i) de vérifier si ce ligand améliore la stabilité des nanoparticules, (ii) de s'intéresser à sa complexation avec la surface de l'oxyde de fer et (iii) de vérifier si les études menées précédemment sont transposables sur d'autres molécules organiques. Les groupements -COOH peuvent être utilisés pour accrocher ultérieurement d'autres molécules d'intérêts (fluorophores, PEG, macrocycles...).

Certaines études, portant sur le greffage de ce type de molécule, s'attardent sur le complexe formé entre la molécule organique et la surface de l'oxyde. Généralement, il a été constaté qu'un ou deux atomes d'oxygène du groupement phosphonate se lient à un ou deux atomes de fer respectivement.<sup>286, 287</sup> Cependant, la formation de complexe mono-, bi- et tridentés n'est pas encore clairement mise en évidence.<sup>153</sup>

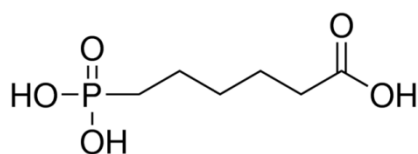


Figure 56 : Schéma de l'acide 6-phosphonohexanoïque

Compte tenu des résultats précédemment observés avec les molécules LDOPA, DHCA et CA (effet antioxydant, effet de taille et stabilité des suspensions), le PHA sera ajouté avec les ions ferreux et ferriques sur la voie 1 et dans les mêmes proportions (1:1) et concentrations molaires ( $[PHA] = 24 \cdot 10^{-3} \text{ M}$ ,  $[NaOH] = 0,33 \text{ M}$  et  $[Fe^{2+} + Fe^{3+}] = 24 \cdot 10^{-3} \text{ M}$ ). La poudre synthétisée est analysée par DRX, MET, BET, IR, ATG, zêtamétrie et DLS.

## 2.6.2 Nature de la phase synthétisée

Le diffractogramme de la poudre  $Fe_3O_4$ -PHA (Figure 57-a) et les images MET (Figure 57-b)) confirment la formation de la structure spinelle de la magnétite  $Fe_{3(1-\delta)}O_4$ . Le cliché SAD révèle la diffraction des plans cristallins (220), (311), (400), (511) et (440) de cette phase. Les distances interatomiques mesurées coïncident avec les mesures DRX (ICDD: 19-0629) (Figure 57-b). Aucune amorphisation en surface de la particule n'apparaît sur le cliché METHR (Figure 58). Par ailleurs, aucune modification de phase n'est observée comme ce fut le cas avec la molécule DHCA. Ainsi, le PHA ne modifie pas la nature de la phase synthétisée.



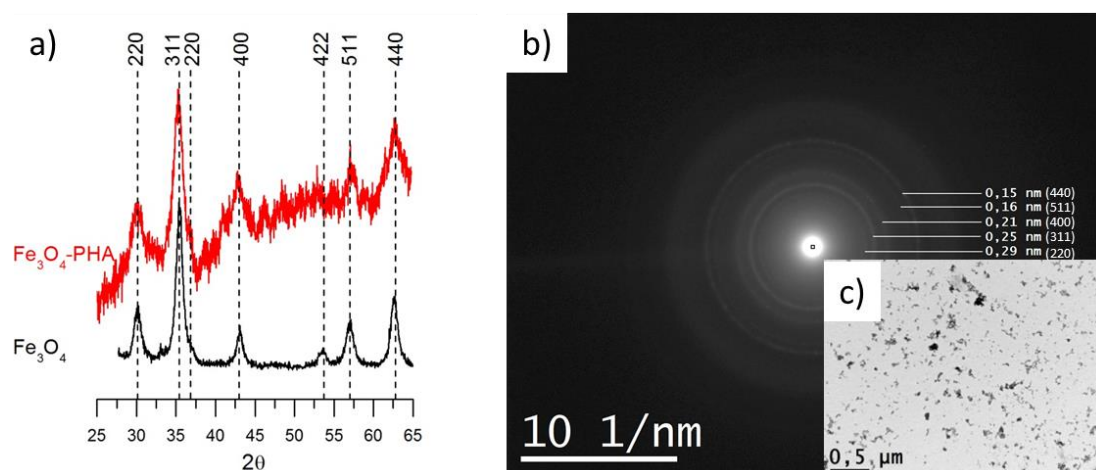


Figure 57 : a) Diffractogrammes des poudres  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  et  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-PHA}$ , b) cliché SAD de l'échantillon  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-PHA}$  et c) image MET de  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-PHA}$

	a (Å)	$\varnothing_{\text{DRX}}$ (nm)	$\delta$	$S_{\text{BET}}$ ( $\text{m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ )	$\varnothing_{\text{BET}}$ (nm)	$\varnothing_{\text{MET}}$ (nm)	$\varnothing_{\text{DLS}}$ (nm)
$\text{Fe}_3\text{O}_4$	$8,385 \pm 0,002$	$10,4 \pm 0,1$	0,023	$104 \pm 1$	$11,1 \pm 0,1$	$8 \pm 2$	$434 \pm 26$
$\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-PHA}$	$8,365 \pm 0,011$	$6,6 \pm 0,2$	0,065	$147 \pm 1$	$7,9 \pm 0,1$	$7 \pm 2$	$174 \pm 3$

Tableau 9 : Tableau récapitulatif des diamètres des nanoparticules non modifiées et modifiées par le PHA ( $\varnothing_{\text{DRX}}$ : diamètre DRX des cristallites,  $\delta$ : déviation par rapport à la stœchiométrie en oxygène,  $S_{\text{BET}}$ : surface spécifique mesurée par la méthode BET,  $\varnothing_{\text{BET}}$ : diamètre calculé à partir de la  $S_{\text{BET}}$ ,  $\varnothing_{\text{MET}}$ : diamètre mesuré par MET sur 100 cristallites et  $\varnothing_{\text{DLS}}$ : diamètre hydrodynamique des NPs en milieu salin ( $10^{-2}\text{M}$ ) à pH physiologique

Aucun effet antioxydant ne ressort de cette analyse contrairement aux études menées sur le DHCA et la LDOPA : le paramètre de maille est de  $8,365 \pm 0,011$  Å (Tableau 9). Une oxydation partielle des nanoparticules modifiées par le PHA s'est produite au cours de la synthèse comparée aux nanoparticules non modifiées en surface ( $8,385 \pm 0,002$  Å). Cette oxydation peut sans doute s'expliquer par un effet nanométrique. La réactivité de surface vis-à-vis de l'environnement est plus importante du fait de la faible taille des cristallites ( $6,6 \pm 0,2$  nm). En effet, la taille a diminué ( $\varnothing_{\text{DRX}}$ ,  $\varnothing_{\text{BET}}$  et  $\varnothing_{\text{MET}}$ ). La molécule PHA n'a pas protégé les nanoparticules de l'oxydation : le phénomène inverse s'est produit par diminution de la taille des nanoparticules.

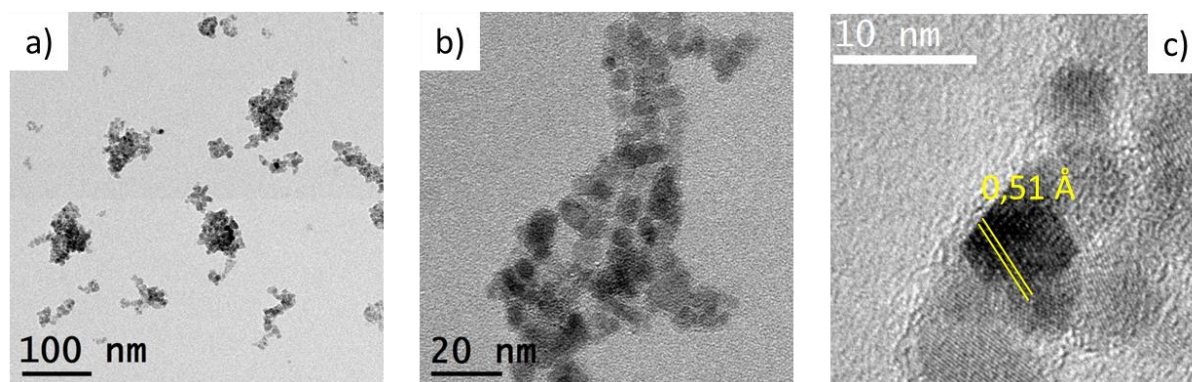


Figure 58 : a) et b) Images MET des poudres modifiées par le PHA et c) cliché METHR

### 2.6.3 Confirmation du greffage de l'acide 6-phosphonohexanoïque à la surface de l'oxyde de fer

Les analyses XPS, zétamétriques, ATG, ATR-FTIR et DLS mettent en évidence la présence de la molécule organique à la surface des nanoparticules d'oxydes de fer. Par la suite, la dénomination ATR-FTIR sera remplacée par IR.

Premièrement, les mesures ATG (Figure 59) indiquent une variation de masse plus importante quand les nanoparticules ont été synthétisées en présence de PHA. La perte de masse significative (26,5%) observée à 475°C est caractéristique de la molécule organique.

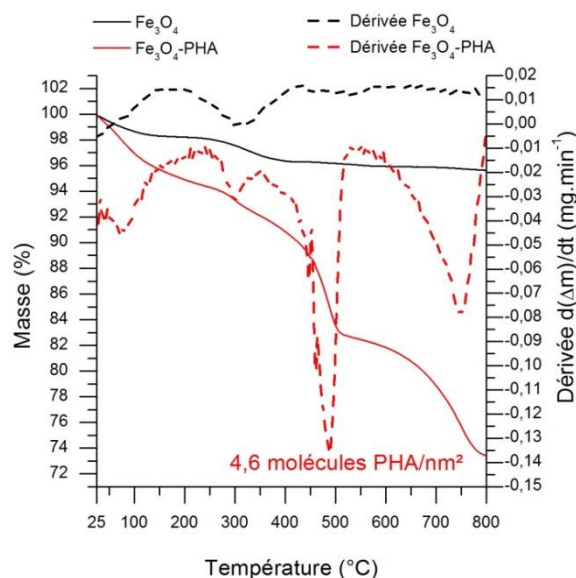


Figure 59 : Analyse thermogravimétrique des poudres non modifiées et modifiées en surface par le PHA sous N<sub>2</sub> (25 mL/min avec une rampe de 5°C/min)

L'analyse du potentiel zêta des poudres modifiées en surface par le PHA et non modifiées (Figure 60) confirme elle aussi la présence des molécules organiques à la surface des nanoparticules de l'oxyde de fer. En effet, le PIE des poudres Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-PHA est décalé vers les pH acides. Ce dernier se situe à 4,3 contre 7,7 pour les poudres Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>. La valeur obtenue dans notre étude est équivalente à celle retrouvée dans d'autres études menées sur la fonctionnalisation de phosphate à la surface de particules d'oxydes de fer.<sup>153, 287</sup> Par ailleurs, au-delà du pH physiologique, un plateau de stabilité se forme en raison de la présence des groupements carboxyliques. Après avoir atteint et dépassé le pK<sub>a</sub>, l'acide se déprotonne et la charge négative formée conduit au potentiel zêta négatif dans cette gamme de pH (pH compris entre 4,5 et 12).

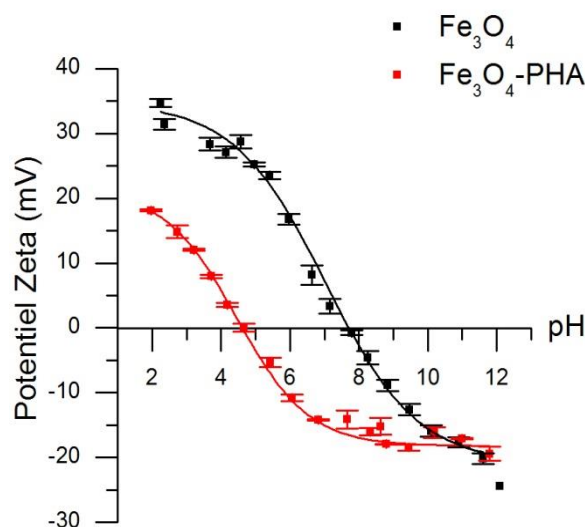


Figure 60 : Courbe de zétamétrie des nanoparticules non modifiées en surface  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  et modifiées par le PHA

Par ailleurs, par IR (Figure 61), les vibrations caractéristiques du PHA (phosphore, carbone et oxygène) sont présentes. Le premier élément (phosphore) est mis en évidence par la présence de vibrations dans la région  $1360\text{-}800\text{ cm}^{-1}$ . Elles sont associées au groupement  $\text{P}=\text{O}$ .<sup>153</sup> Ainsi, ce groupement est conservé au cours de la synthèse. Les vibrations et étirements asymétriques et symétriques des groupes  $\text{CH}_2$  sont observés à  $2930\text{ cm}^{-1}$ ,  $2854\text{ cm}^{-1}$  et  $1404\text{ cm}^{-1}$ .<sup>288</sup> Un épaulement apparaît entre  $3500\text{-}3000\text{ cm}^{-1}$  et est associé à la molécule d'eau et à la liaison  $\text{OH}$  du groupement carboxylique.<sup>288</sup> Les groupements  $\text{COOH}$  sont quant à eux détectés par la vibration se situant à  $1556\text{ cm}^{-1}$  attribuée aux étirements asymétriques de ce groupe.<sup>288, 289</sup>

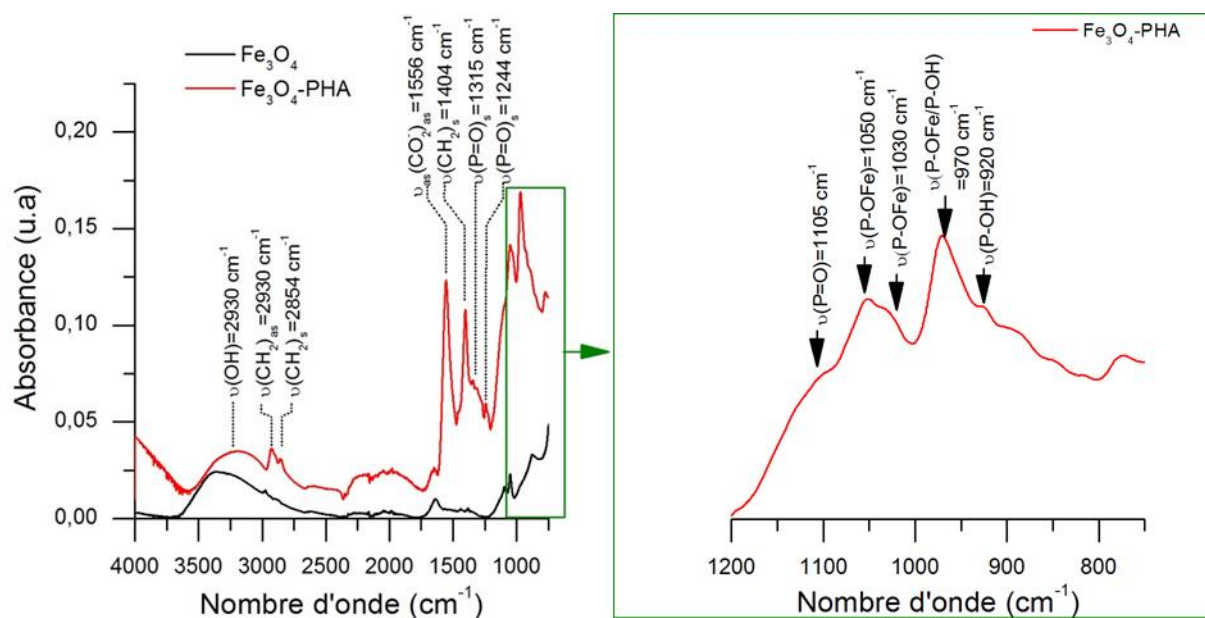


Figure 61 : IR de la poudre  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-PHA}$

Afin de confirmer la présence de la molécule organique sur la surface des nanoparticules, des mesures XPS ont été réalisées.



Echantillons	C1s (%)	O1s (%)	Fe2p (%)	P2p (%)
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	9	86	35	-
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -PHA	14	53	31	2

Tableau 10 : Concentrations atomiques en % (C, O, Fe et P) déterminées par XPS des poudres Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> non modifiées en surface et Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> modifiées par le PHA

Lorsque le PHA a été ajouté au cours de la synthèse en continu, la concentration atomique mesurée par XPS en carbone augmente passant de 9% à 14% (Tableau 10). Cette augmentation s'explique par la présence de la chaîne carbonée de la molécule PHA. Cette chaîne est conservée malgré la température de synthèse de 150°C et la pression de 25 MPa. En parallèle, la concentration en fer diminue passant de 35% à 31%, indiquant ici un recouvrement des nanoparticules d'oxydes de fer par la molécule organique. Enfin, la présence de l'élément phosphore conforte les précédents résultats. Même si le PHA n'améliore pas l'état d'oxydation des nanoparticules, il modifie la taille des cristallites et reste présent à la surface des nanoparticules au cours de la synthèse.

#### 2.6.4 Estimation de la quantité de PHA à la surface des nanoparticules

Compte tenu de la surface spécifique ( $147 \pm 1 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ ), il est possible de remonter au nombre de molécules présentes à la surface des NPs : 4,6 molécules de PHA par nm<sup>2</sup> sont à la surface de l'oxyde de fer (Figure 59). Ce taux de recouvrement est en accord avec d'autres synthèses réalisées en réacteur batch. En effet, Daou *et al.* ont obtenu 3,3 phosphates par nm<sup>2</sup>.<sup>153</sup> Par ailleurs, en comparant ces données ATG avec celles obtenues précédemment sur les poudres Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-LDOPA (8,9 molécules de LDOPA/nm<sup>2</sup>) et Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-DHCA (6,6 molécules de DHCA/nm<sup>2</sup>), les quantités présentes en surface sont comparables. Elles sont cependant supérieures, comparées à l'échantillon Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-CA (0,3 molécule de CA/nm<sup>2</sup>).

#### 2.6.5 Nature du complexe formé

A l'aide des analyses IR et XPS, il est possible de donner des informations sur la conformation de l'agent organique à la surface de l'oxyde de fer. Les vibrations des groupements carboxylates sont généralement situées vers 1620 cm<sup>-1</sup> lorsqu'ils sont libres (sans interaction avec d'autres éléments ou groupements fonctionnels).<sup>60</sup> Cependant, un shift vers les faibles nombres d'ondes est observé. Il est caractéristique des vibrations asymétriques des groupements COO<sup>-</sup>.<sup>288, 289</sup> Ce faible décalage peut s'expliquer par la coordination du groupement carboxylique avec la surface des nanoparticules (de type « ester »).<sup>60, 290</sup> Plusieurs types de coordination sont susceptibles d'exister (Figure 62). En effet, si le ligand forme un complexe dit monodenté (Figure 62-c et -e) avec la surface de l'oxyde métallique, il aura alors plus de facilité à se déformer (en se couchant sur la surface de la particule par exemple) et à former une liaison de type électrostatique entre le groupement COOH et la surface. Ce groupement prend alors une configuration de type « ester ».<sup>290</sup> Il est aussi possible que les groupements COOH soient reliés à d'autres particules pour former des clusters (Figure 62-d).

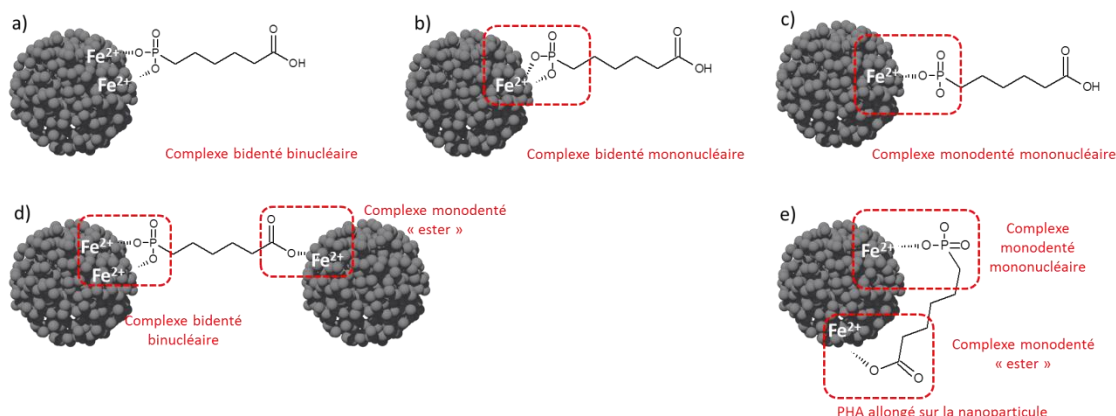


Figure 62 : Suggestions de conformation spatiale du PHA à la surface de la nanoparticule : a) conformation bidentée binucléaire, b) conformation bidentée mononucléaire, c) conformation monodenté mononucléaire d) formation de cluster (complexe monodenté type « ester ») et e) PHA allongé (inspirée de Adra)<sup>291</sup>

La région en nombres d'onde comprise entre 1200 et 900  $\text{cm}^{-1}$  présente quant à elle les liaisons de types P-OH et P-Ofé. De nombreuses études tentent d'identifier et attribuer les bandes de cette région. Il est cependant difficile de les assigner à un complexe donné. En effet, les densités électroniques autour de l'élément phosphore se trouvent fortement influencées par les différents groupes tels que l'oxygène, le carbone ou encore le fer. Cette influence conduit à des shifts sur les bandes associées à cet élément (Figure 61). Le groupement P=O est mis en évidence par la vibration présente à 1105  $\text{cm}^{-1}$ .<sup>153, 292</sup> Les bandes situées quant à elles à 970, 1030 et 1050  $\text{cm}^{-1}$  sont associées aux vibrations de type P-Ofé.<sup>153, 290, 292, 293</sup> Ces vibrations confirment que la liaison de la molécule PHA sur la surface de la nanoparticule ne se fait pas uniquement par les groupements carboxyliques mais aussi *via* le groupement phosphonate.

Il a été observé que le pH ainsi que la concentration en molécule organique influent sur la nature du complexe formé. Par exemple, à faible pH, un complexe avec un pont protoné se forme préférentiellement alors qu'une augmentation du pH favorise la formation d'un complexe bidenté.<sup>292</sup> Ainsi, le pH élevé de notre synthèse (pH = 12), le ratio molaire 1:1 et le léger épaulement proche de 1030  $\text{cm}^{-1}$  pourrait laisser suggérer la formation du complexe bidenté de type  $(\text{FeO})_2\text{PO}(\text{CH}_3)^{2(x-1)}$  (avec x la charge de surface résiduelle de l'ion métallique) avec la surface de la nanoparticule.<sup>153, 292</sup> Les molécules organiques PHA greffées sur les nanoparticules d'oxydes de fer en conditions hydrothermales et en continu s'organiseraient selon la configuration décrite sur la Figure 62-b. Un complexe bidenté se serait formé entre la surface de la nanoparticule et deux atomes d'oxygène liés au phosphore. Il est possible qu'un complexe monodenté type « ester » entre le groupement carboxylate du PHA et la surface d'une nanoparticule se forme aussi (Figure 62-d). Enfin les légers décalages sur les vibrations observées en infrarouge (Figure 61) comprises entre 1100 et 900  $\text{cm}^{-1}$  par rapport à celles observées dans la littérature peuvent aussi suggérer la présence d'autres conformations.<sup>153, 292, 293</sup> Ces conformations favorisées à faible pH peuvent être monodenté (lorsque le PHA est initialement mélangé avec les ions  $\text{Fe}^{2+}$  et  $\text{Fe}^{3+}$  en synthèse hydrothermale (Figure 62-c)).<sup>292</sup> Il est difficile à partir de l'infrarouge de débattre efficacement sur la nature finale du complexe.

Concernant l'analyse des régions C1s, O1s et P2p obtenues en XPS (Figure 63), il est complexe de pouvoir débattre sur la configuration spatiale de la molécule organique à la surface de l'oxyde de fer. En effet, sur la région O1s (Figure 63-b), aucune nouvelle contribution de type P=O n'est apparue à 532,5 eV. De plus, les liaisons de type P-O-Fe coïncident avec la contribution OH des nanoparticules. Cependant, la largeur à mi-hauteur de la contribution OH de la poudre  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -PHA a diminué passant de 1,9 pour l'échantillon non modifié en surface ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) à 1,7 eV pour l'échantillon  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -PHA. Cette modification peut être induite par la proximité des groupements P-O du PHA proche de la surface des nanoparticules. Compte tenu de ces premiers résultats, la détermination de la nature du complexe formé (mono-, bi-, tridenté) *via* l'analyse XPS de cette région n'est pas aisée.

Les molécules à base de phosphonate montrent normalement deux pics XPS sur la région P2p situés à environ 133,8 eV et 134,7 eV correspondant respectivement aux composantes  $\text{P}2p_{3/2}$  et  $\text{P}2p_{1/2}$  du  $\text{P}2p$ .<sup>154</sup> Mais la faible énergie théorique séparant ces deux contributions (0,9 eV) conduit à ajuster une seule composante sur le pic  $\text{P}2p$ .<sup>153</sup> Lorsque les molécules de phosphonate sont greffées sur les nanoparticules, un shift de (1,3 eV) vers les faibles énergies est observé (pic situé aux alentours de 132,5-133,4 eV). Pour les nanoparticules fonctionnalisées par le PHA en conditions hydrothermales et en continu, ce pic se situe à 132,6 eV (Figure 63)-b). Ce shift est caractéristique de la formation de liaison de type P-O-Fe. Un tel écart signifie que la densité électronique autour de l'atome P est plus faible dans le cas des nanoparticules recouvertes de phosphates et que le complexe formé est au moins de type binucléaire.<sup>154</sup> Les résultats XPS corroborent les résultats IR sur la formation possible d'un tel complexe (Figure 62-a) au lieu d'un complexe bidenté mononucléaire (Figure 62-b).

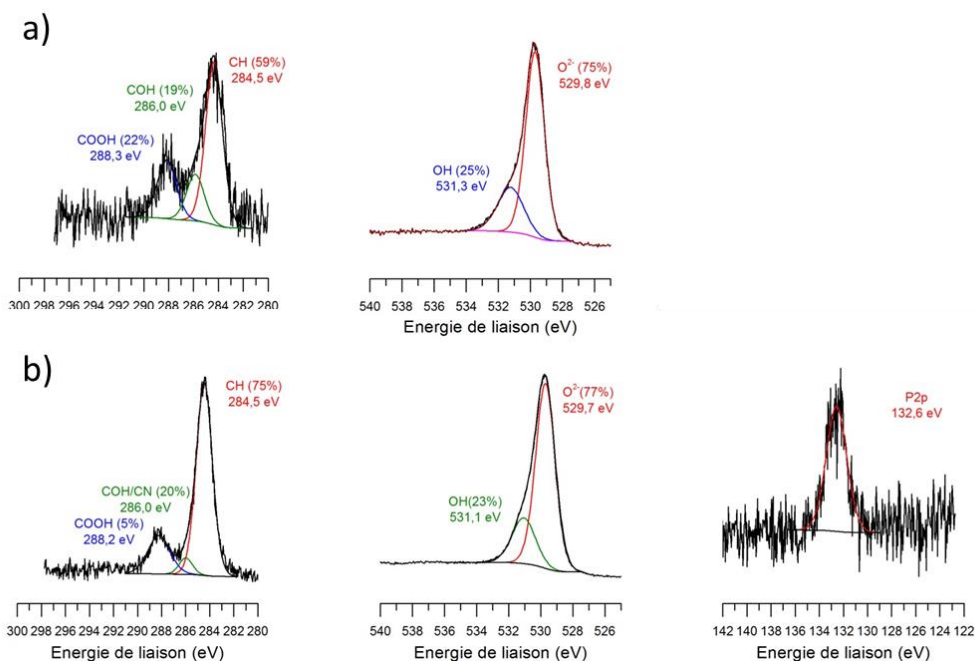


Figure 63 : a) Régions C1s et O1s de l'échantillon  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  et b) régions C1s, O1s et P2p de l'échantillon  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -PHA

Compte tenu de l'analyse de l'ensemble des techniques des caractérisations mises en œuvre dans cette étude, le PHA présente plusieurs conformations possibles sur la surface des nanoparticules. Un

complexe bidenté binucléaire, monodenté mononucléaire et monodenté « ester » sont possibles (Figure 64).

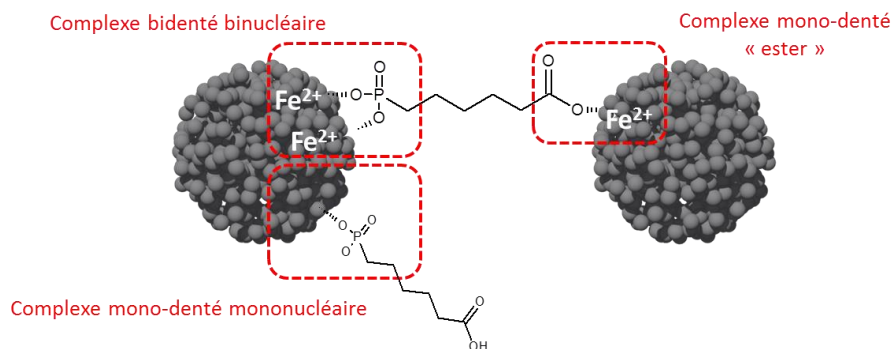


Figure 64 : Conformations les plus probables et majoritaires du PHA sur les nanoparticules d'oxydes de fer synthétisées en milieu hydrothermal et en continu

### 2.6.6 Effet sur la dispersion des nanoparticules en suspension

A travers les images MET (Figure 58-a), une dispersion des nanoparticules apparaît. Des agrégats de taille moyenne comprise entre 50 et 100 nm et bien dispersés sont observés. Cet état de dispersion est en accord avec les résultats zétamétriques et DLS. En effet, le plateau de stabilité déjà formé à pH physiologique et le décalage du PIE vers les pH acides en raison de la présence des acides carboxyliques de la molécule organique PHA assurent une répulsion électrostatique qui conduit à la formation d'agrégats de faibles tailles comparés aux agrégats non modifiés. Cet effet est corroboré avec les mesures DLS. La taille hydrodynamique est de  $174 \pm 3$  nm ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -PHA) à pH physiologique en milieu salin ( $10^{-2}$  M en NaCl) (Figure 65). Tout comme pour l'acide citrique, le DHCA et la LDOPA, un effet dispersant est observé par la nature du complexe formé. Cependant, la taille hydrodynamique reste supérieure à celle obtenue sur les particules précédentes :  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -CA ( $137 \pm 4$  nm),  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -LDOPA ( $106 \pm 2$ ) et  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -DHCA ( $124 \pm 2$ ).

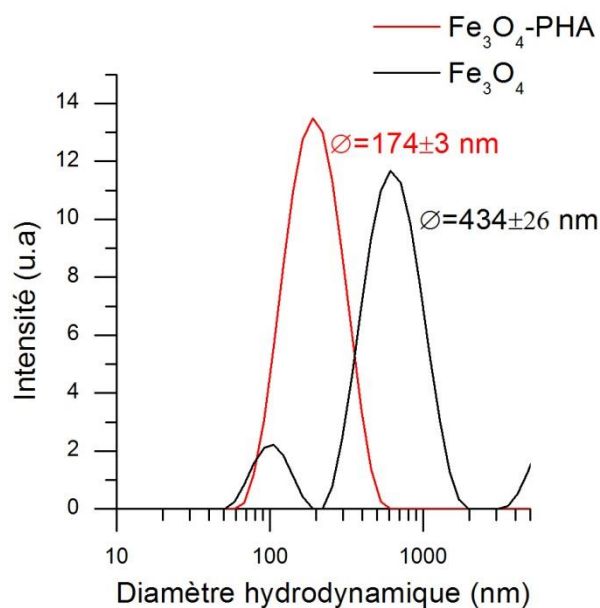


Figure 65 : Mesure DLS à pH = 7,4 ( $10^{-2}$ M de NaCl) après traitement ultrasons (cane à US pendant 30 sec à 100%)

Toutes ces techniques de caractérisation (IR, ATG, BET, XPS zétamétrie et XPS) mettent en évidence la présence de molécules PHA sur les nanoparticules. Elles soulignent une grande quantité de molécules formant un complexe binucléaire à la surface des NPs.

### 2.6.7 Influence de la molécule organique sur la taille des nanoparticules

A travers les techniques d'analyses BET et DRX, une modification de la taille des cristallites est observée. Par DRX, la taille moyenne des cristallites modifiées par le PHA est de  $6,6 \pm 0,2$  nm. Elle est inférieure à celle obtenue sur les poudres  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  non modifiées en surface ( $10,4 \pm 0,1$  nm). Cette tendance est aussi observée en BET et MET (Tableau 9). En effet, la surface spécifique mesurée en BET augmente pour les particules  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -PHA, soit  $146 \pm 1$   $\text{m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ . Le diamètre apparent résultant est égal à  $7,9 \pm 0,1$  nm. En MET, la taille des cristallites mesurée reste identique :  $8 \pm 2$  nm ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) et  $8 \pm 1$  nm ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -PHA) (Figure 66 et Tableau 10). Les différents diamètres  $\varnothing_{\text{MET}} = \varnothing_{\text{DRX}} = \varnothing_{\text{BET}}$  confirment que les nanoparticules sont monocristallines et lisses en surface. La taille finale des nanoparticules obtenues lors de cette étude *via* le dispositif hydrothermal est inférieure à celles retrouvées habituellement dans la littérature. Muthukumaran *et al.* ont obtenu des particules de diamètre MET moyen de  $14 \pm 2$  nm.<sup>294</sup> Grâce au dispositif hydrothermal en continu, il est possible de diminuer drastiquement (d'un facteur 2) la taille moyenne des nanoparticules modifiées par des phosphonates.

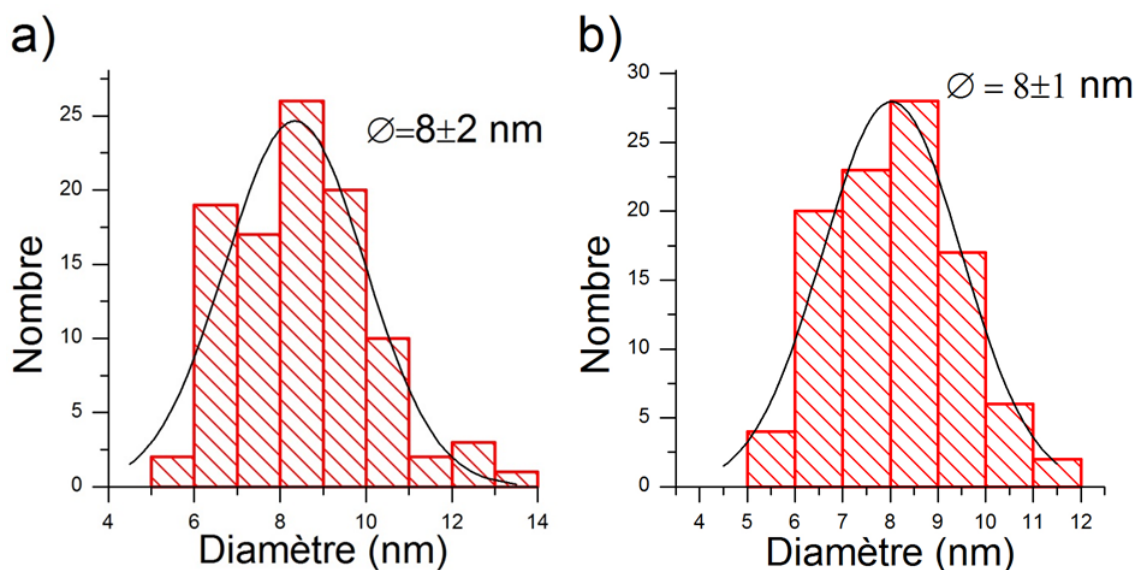


Figure 66 : Distribution en taille des cristallites mesurée en MET des a) nanoparticules non modifiées en surface ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) (100 NPs) et b) modifiées en surface par le PHA ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -PHA) (100 NPs)

Enfin, à partir des résultats MET et comparées aux nanoparticules non modifiées en surface ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ), les nanoparticules  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -PHA présentent une taille moyenne identique ( $8 \pm 1$  nm) avec cependant une distribution en taille plus fine comprise entre 5 et 12 nm contre 5 et 14 nm pour l'échantillon  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ .

### 2.6.8 Conclusion

Une quantité comparable en PHA par rapport aux trois autres molécules est retrouvée sur la surface des oxydes de fer. Cette fonctionnalisation n'induit pas la formation de phase autre que la magnétite. Cependant, même si une oxydation partielle des nanoparticules est observée par rapport aux particules non modifiées, ce phénomène peut être relié à la diminution de la taille moyenne des nanoparticules déterminée par DRX et mesure de surface spécifique. Ces résultats sont très prometteurs en vue de réaliser d'autres types de greffage sur le dispositif ou encore de réaliser des greffages multiples. Les nanoparticules se révèlent stables en suspension avec une taille hydrodynamique inférieure à 200 nm. Par ailleurs, il peut être intéressant d'envisager des greffages de bi ou triphosphonates qui auront un pouvoir complexant plus important vis-à-vis du fer. La stabilité pourrait être améliorée (taille hydrodynamique plus faible). Une fois de plus, à l'aide du dispositif hydrothermal en continu, il est possible de modifier favorablement les propriétés physico-chimiques des nanoparticules en les rendant stables en suspension, avec une taille moyenne de cristallites inférieure à 20 nm et en les fonctionnalisant (groupements chimiques réactifs présents à la surface des nanoparticules) pour greffer d'autres molécules (macrocycles, PEG...).

## 2.7 Conclusion

Les paramètres tels que la température, l'agent organique ajouté au cours de la synthèse et le lieu d'ajout des ligands sur le dispositif hydrothermal influencent fortement la synthèse des oxydes de fer. En effet, acide citrique, LDOPA, DHCA et PHA sont capables de :

- Stabiliser la phase spinelle dans la plupart des cas,
- modifier l'état d'oxydation des nanoparticules (effet antioxydant pour les molécules LDOPA et DHCA),
- modifier la taille des nanoparticules (croissance cristalline lors de l'emploi du DHCA ou de la LDOPA et diminution dans le cas de l'acide citrique et du PHA)
- améliorer la dispersion des nanoparticules en suspension (stabilité).

Cependant, en comparant chacune de ces molécules organiques sur la synthèse des nanoparticules, il est préférable d'utiliser la LDOPA. En plus d'avoir un groupement  $\text{NH}_2$  intéressant pour des greffages ultérieurs pour faire de l'imagerie bimodale, cet agent organique a montré une forte amélioration de l'état de dispersion des nanoparticules notamment en milieu de culture MEM et un potentiel  $\zeta$  élevé (négatif) à pH physiologique (garantissant un effet électrostatique suffisant pour rendre les nanoparticules stables en suspension). Ces effets bénéfiques en font un très bon candidat pour des tests biologiques. C'est pour cette raison que la suite des travaux va se consacrer principalement à l'utilisation de nanoparticules modifiées par la LDOPA en surface.

Ces études présentent un caractère novateur car, pour la première fois, les molécules LDOPA et PHA sont greffées en continu et en une seule étape (lors de la synthèse des particules) sur la surface des nanoparticules d'oxydes de fer. De plus, les catéchols (DHCA et LDOPA) ont favorisé la formation d'une nouvelle morphologie de type nanofleur déjà obtenue en réacteur batch et avec d'autres ligands organiques. De plus, cette première étude sur l'influence de la température de synthèse et des molécules organiques a permis de mettre en évidence le caractère antioxydant des molécules DHCA et LDOPA, leur effet stabilisant et dispersant comparées aux nanoparticules non modifiées. Cependant, il est certainement possible d'améliorer les protocoles et de réduire les étapes de synthèse nécessaires à l'élaboration d'une nanoparticule multifonctionnelles. Des suggestions sont présentées ci-dessous.

## **Chapitre 3**

**Fonctionnalisation post-synthèse des  
nanoparticules d'oxyde de fer en vue  
d'une utilisation en imagerie bimodale  
IRM/TEP ou IRM/IO**





## 3.1 Greffages de molécules de PEG<sub>n</sub> (2 000 Da et 10 000 Da) sur les nanoparticules Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-DHCA et Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-LDOPA synthétisées en milieu hydrothermal

### 3.1.1 Contexte et objectifs

Au cours du chapitre 2, la synthèse de nanoparticules d'oxydes de fer de type magnétite préfonctionnalisées a été optimisée sur un dispositif hydrothermal en continu. Cette optimisation a consisté à contrôler l'état d'oxydation, la taille moyenne, la stabilité des nanoparticules en suspension ainsi que l'état de surface de ces dernières le tout en une seule étape. Les résultats ont montré que les catéchols (DHCA et LDOPA) se greffent en grande quantité à la surface des nanoparticules et améliorent leur stabilité dans différents milieux (notamment la LDOPA en milieu biologique MEM) tout en évitant l'oxydation de ces dernières. Cette première couche organique de DHCA ou LDOPA a également pour rôle de servir de support pour greffer des molécules d'intérêts comme les polymères à l'aide des groupements chimiques disponibles à la surface des nanoparticules.

Cette partie se destine donc à fonctionnaliser la surface des nanoparticules d'oxydes de fer par des polymères de type PEG de différentes masses molaires (2 000 ou 10 000 Da). L'objectif est de conférer aux nanoparticules une stabilité en milieu biologique (en maintenant un diamètre hydrodynamique idéal 20-200 nm pour éviter leur élimination trop rapide par le SRE, voir paragraphe 1.4.2) avec un temps de demi-vie dans la circulation sanguine suffisamment long pour l'imagerie médicale. Les PEG sont greffés sur les groupements COOH de la LDOPA ou du DHCA. L'étude porte notamment sur l'influence du PEG vis-à-vis du diamètre hydrodynamique et du potentiel zêta des nanoparticules d'oxydes de fer.

### 3.1.2 Synthèse des nanoparticules Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-DHCA-PEG<sub>n</sub> et Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-LDOPA-PEG<sub>n</sub> (n = 2 000 ou 10 000)

Des suspensions de nanoparticules de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-DHCA et de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-LDOPA synthétisées selon les conditions établies dans le chapitre 2 en voie 1 sont utilisées pour greffer des MeO-PEG-NH<sub>2</sub> de masses molaires différentes (2 000 Da et 10 000 Da) (MeO : fonction méthoxy). Le greffage s'effectue par la formation d'une liaison amide entre les groupements amines du PEG et les groupements carboxyliques du DHCA et de la LDOPA. Cette étude a pour but d'étudier l'influence de la longueur de la chaîne polymère et également de vérifier la disponibilité des groupements chimiques de la LDOPA et du DHCA. L'effet de la couche de polymère sur le comportement des nanoparticules en milieu biologique sera aussi déterminé. Les groupements NH<sub>2</sub> de la LDOPA seront utilisés ultérieurement pour greffer des molécules d'intérêts (notamment des macrocycles).

Le greffage des polymères PEG<sub>2000</sub> et PEG<sub>10000</sub> est réalisé selon une activation EDC/NHS (EDC : 1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide et NHS : N-hydroxysuccinimide) dans deux milieux d'activation différents (MES ou PBS) (Figure 67). 1,6.10<sup>-4</sup> mol de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> recouvertes de 2,3.10<sup>-5</sup> mol de DHCA ou 1,6 mol de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> recouvertes de 3,7.10<sup>-5</sup> mol de LDOPA sont introduites dans des tampons MES

(0,1M) ou PBS (1X) (tampons d'activation) dans un volume de 10 mL. Ensuite, l'EDC est ajouté à la suspension ajustée avec une solution de HCl (1M) à pH = 4,7, selon un ratio molaire 1:10 (ligand LDOPA ou DHCA:EDC) durant 15 min.<sup>295, 296</sup> Cette étape a pour objectif de réaliser l'activation du groupement carboxylique. Ensuite, le NHS (selon un ratio molaire 1:25 (ligand LDOPA ou DHCA:NHS)) et du PEG<sub>n</sub> sont ajoutés à la réaction (ratio molaire 1:1 par rapport à la LDOPA ou au DHCA). Un volume de 10 mL de solution PBS est ajouté et le pH de la solution est ajusté à 7,4 si nécessaire. Un NHS ester intermédiaire est produit et réagit avec les amines primaires (-NH<sub>2</sub>) du MeO-PEG<sub>n</sub>-NH<sub>2</sub> en formant une liaison amide. La suspension est placée sous agitation magnétique durant 4 heures à température ambiante (20°C). Elle est ensuite ultrafiltrée (Amicon® UltraCel 30 KDa) puis le tout lyophilisé afin d'obtenir des poudres sèches pour être caractérisées.

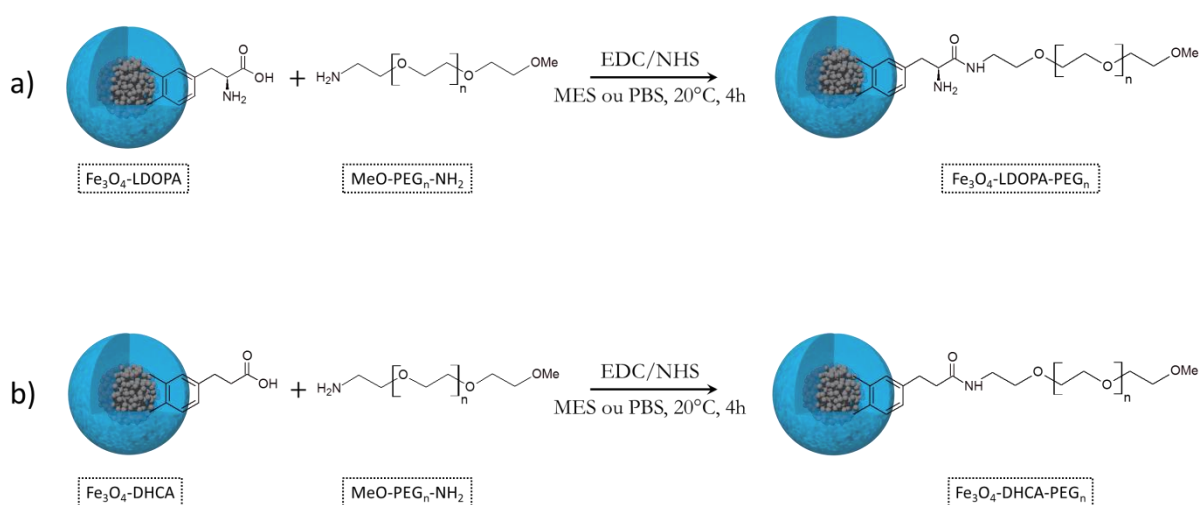


Figure 67 : Schéma de synthèse des nanoparticules a) Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-DHCA-PEG<sub>2000</sub> et 10000 et b) Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-LDOPA-PEG<sub>2000</sub> et 10000

### 3.1.3 Mise en évidence des PEG<sub>n</sub> à la surface des nanoparticules d'oxydes de fer modifiées par le DHCA et la LDOPA

Pour prouver la présence des molécules de PEG<sub>n</sub> sur les nanoparticules d'oxydes de fer modifiées par le DHCA et la LDOPA, des analyses en ATG, IR, XPS, MET, zêtamétrie et DLS ont été menées sur chacun des échantillons.

#### 3.1.3.1 Formation de la liaison covalente entre les groupements COOH et NH<sub>2</sub>

Des mesures IR (Figure 68) sont menées pour mettre en évidence la formation de la liaison amide. Une nouvelle vibration à 1625 cm<sup>-1</sup> est observée quel que soit le tampon d'activation (PBS ou MES). Cette contribution est attribuée aux amides.<sup>115, 297</sup> Elle représente la formation de la liaison covalente entre le groupement COOH de la molécule LDOPA ou DHCA et NH<sub>2</sub> du PEG<sub>2000</sub> ou PEG<sub>10000</sub>. Ceci confirme que le greffage des PEG sur les sites COOH des molécules DHCA et LDOPA a bien eu lieu.

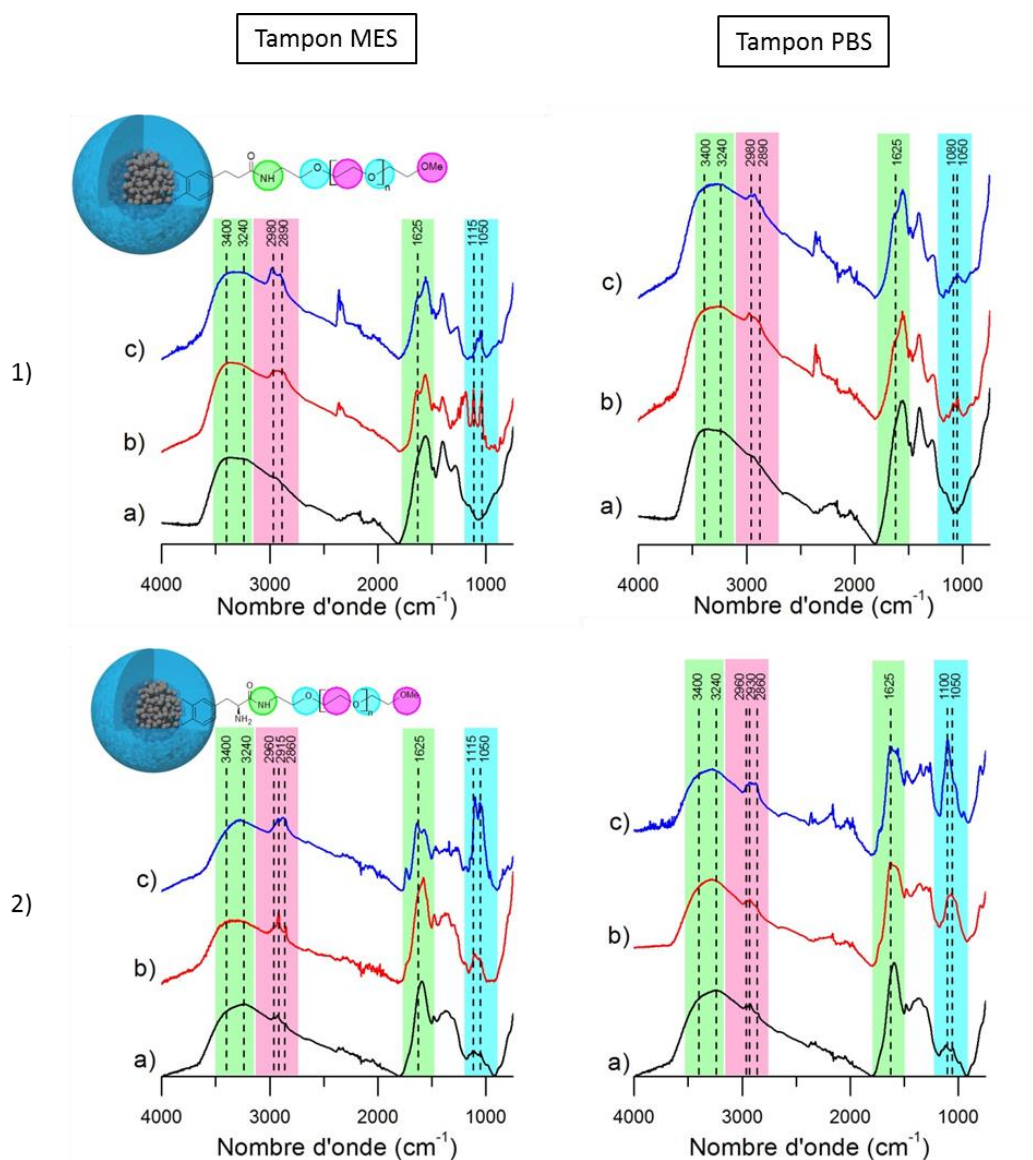


Figure 68 : 1) Spectres IR en mode ATR des poudres a)  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -DHCA, b)  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -DHCA-PEG<sub>2000</sub> et c)  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -DHCA-PEG<sub>10000</sub> réalisées en tampon d'activation PBS ou MES et 2) spectres IR en mode ATR des poudres a)  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -LDOPA, b)  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -LDOPA-PEG<sub>2000</sub> et c)  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -LDOPA-PEG<sub>10000</sub> réalisées en tampon d'activation PBS ou MES

Les analyses XPS (Tableau 11, Figure 69, Figure 70, Figure 71 et Figure 72) tendent aussi à prouver cette liaison. En effet, des modifications de la position de la contribution C-OH/C-O-C/C-N du pic C1s sont notées. Sur les échantillons  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -DHCA-PEG<sub>n</sub>, une augmentation de son énergie de liaison ( $\sim 0,4$  eV) vers les hautes énergies est observée. Cependant, aucune modification notable n'est notée pour les poudres  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -LDOPA-PEG<sub>n</sub>. Les groupements  $\text{NH}_2$  présents dans le cas des nanoparticules  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -LDOPA sont susceptibles de masquer cette nouvelle liaison C-N. Par ailleurs, la forte proximité de ce groupement avec le groupement COOH peut contribuer à ce phénomène.

La contribution COOH sur les deux types de nanoparticules subit elle aussi une modification. Un décalage vers les basses énergies de 0,2 eV est observé. Ce dernier est induit par un changement de l'environnement électronique du carbone au niveau de ce groupement. Il s'explique par la présence des groupements C-O-C (PEG) et surtout des groupements C-N résultant de la liaison covalente amide

primaire formée et par conséquent du nouvel environnement formé O=C-N-C. Ceci se confirme aussi sur la contribution NH/NH<sub>2</sub> de la région N1s. En effet, un shift vers les basses énergies (~0,2 eV) des échantillons Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-LDOPA-PEG est observé par rapport à l'échantillon de référence Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-LDOPA qui est induit par ce nouvel environnement. Les décalages ainsi observés des contributions C-OH/C-O-C/C-N et COOH sur les échantillons Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-DHCA-PEG<sub>n</sub> et de la contribution COOH sur les échantillons Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-LDOPA-PEG<sub>n</sub> sont principalement dus à la liaison covalente amide primaire.

Echantillon	C1s				O1s			N1s	
	C-H/ C-C	C-OH/ C-N/C-O-C	O=C-OH	π-π*	O <sup>2-</sup>	O=C-OH/ OH	O-C	NH/NH <sub>2</sub>	NH <sub>3</sub> <sup>+</sup>
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -DHCA	284,5 (42%)	285,6 (34%)	288,4 (24%)	-	530,0 (54%)	531,5 (41%)	533,4 (5%)	-	-
PBS	Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -DHCA- PEG <sub>2000</sub>	284,5 (45%)	286,0 (38%)	288,2 (17%)	-	529,6 (40%)	530,9 (51%)	533,0 (9%)	400 (100%)
	Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -DHCA- PEG <sub>10000</sub>	284,5 (49%)	286,0 (29%)	288,2 (22%)	-	529,7 (50%)	531,0 (42%)	532,8 (8%)	399,8 (100%)
MES	Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -DHCA- PEG <sub>2000</sub>	284,6 (39%)	286,2 (50%)	288,3 (11%)	-	530,2 (45%)	531,7 (35%)	533,4 (14%)	400 (100%)
	Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -DHCA- PEG <sub>10000</sub>	284,5 (51%)	286,1 (31%)	288,3 (18%)	-	529,7 (48%)	531,0 (45%)	532,9 (7%)	399,7 (100%)
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -LDOPA	284,5 (45%)	285,7 (34%)	288,3 (17%)	290,8 (4%)	530,0 (44%)	531,2 (47%)	533,1 (9%)	400,1 (100%)	-
PBS	Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -LDOPA- PEG <sub>2000</sub>	284,5 (37%)	285,7 (44%)	288,1 (16%)	290,2 (3%)	529,9 (48%)	531,0 (39%)	533,2 (13%)	399,7 (100%)
	Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -LDOPA- PEG <sub>10000</sub>	284,5 (34%)	285,8 (52%)	288,2 (14%)	-	529,9 (38%)	530,9 (29%)	532,5 (33%)	399,8 (100%)
MES	Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -LDOPA- PEG <sub>2000</sub>	284,5 (59%)	285,7 (32%)	288,0 (9%)	-	529,8 (42%)	531,0 (23%)	532,1 (35%)	399,7 (100%)
	Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -LDOPA- PEG <sub>10000</sub>	284,5 (47%)	285,7 (43%)	288,0 (9%)	-	530,0 (42%)	531,1 (39%)	532,4 (19%)	399,9 (84%)

Tableau 11 : Positions et concentrations des composantes C1s, O1s et N1s des échantillons Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-DHCA-PEG<sub>n</sub> et Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-LDOPA-PEG<sub>n</sub> synthétisés dans les tampons d'activation PBS ou MES (n = 2 000 et 10 000 Da)

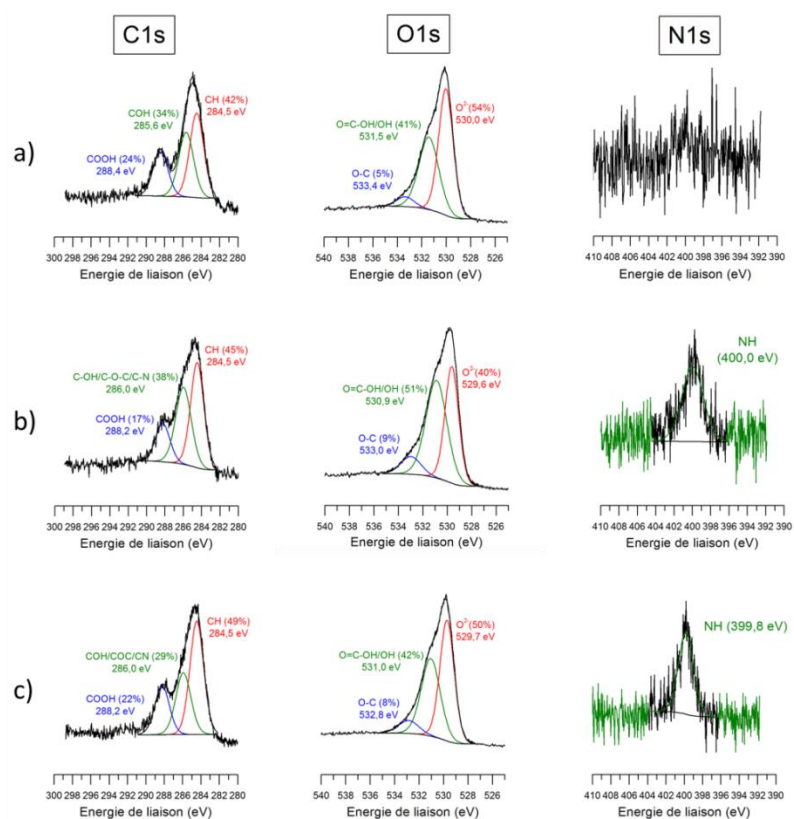


Figure 69 : Niveau C1s, O1s et N1s des poudres a) Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-DHCA, b) Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-DHCA-PEG<sub>2000</sub> (activation en PBS) et c) Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-DHCA-PEG<sub>10000</sub> (activation en PBS)

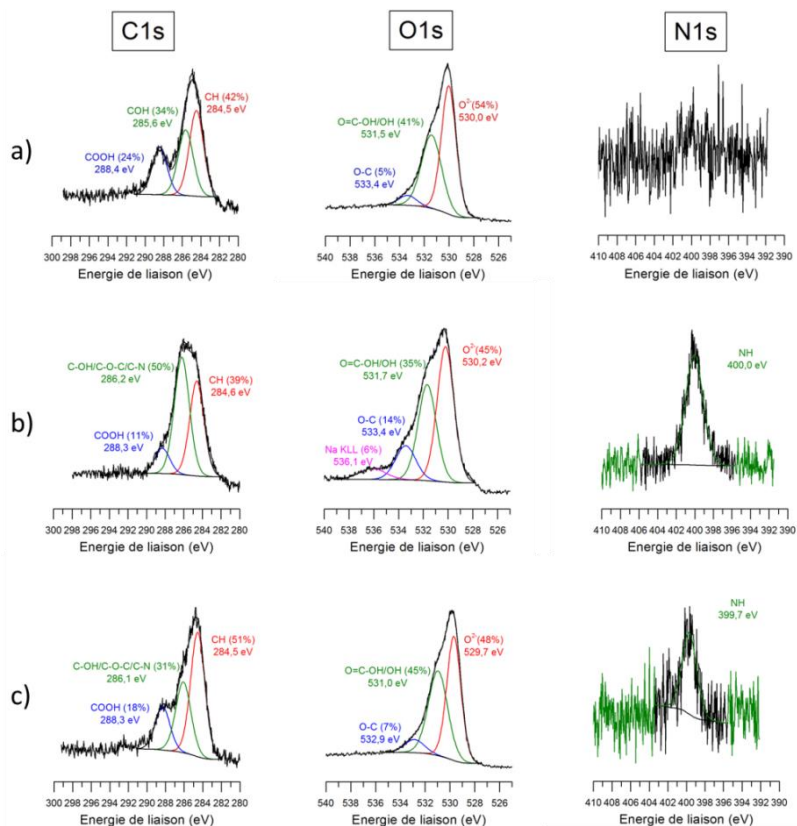


Figure 70 : Niveau C1s, O1s et N1s des poudres a) Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-DHCA, b) Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-DHCA-PEG<sub>2000</sub> (activation en MES) et c) Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-DHCA-PEG<sub>10000</sub> (activation en MES)

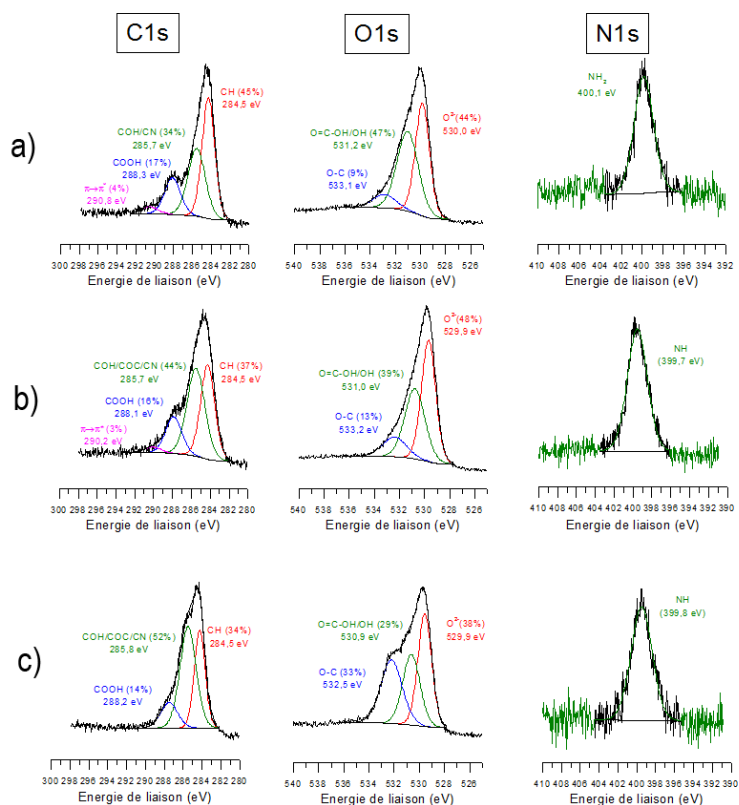


Figure 71 : Niveau C1s, O1s et N1s des poudres a) Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-LDOPA, b) Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-LDOPA-PEG<sub>2000</sub> (activation en PBS) et c) Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-LDOPA-PEG<sub>10000</sub> (activation PBS)

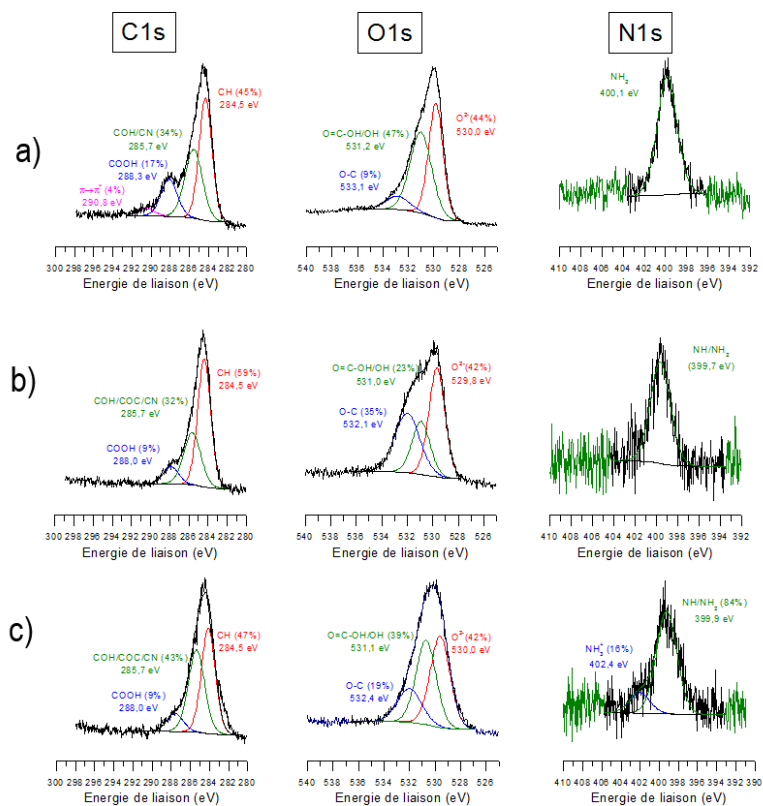


Figure 72 : Niveau C1s, O1s et N1s des poudres a) Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-LDOPA, b) Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-LDOPA-PEG<sub>2000</sub> (activation en MES) et c) Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-LDOPA-PEG<sub>10000</sub> (activation en MES)



### 3.1.3.2 Présence des molécules de PEG<sub>n</sub> à la surface des nanoparticules d'oxydes de fer

Par infrarouge, les vibrations caractéristiques des PEG sont visibles (Figure 68). Les vibrations à 2980 et 2890 cm<sup>-1</sup> des nanoparticules Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-DHCA-PEG<sub>n</sub> (n = 2 000, 10 000 Da) sont respectivement représentatives des étirements asymétriques des groupements -CH<sub>3</sub> et des étirements symétriques des groupes -CH<sub>2</sub>.<sup>14, 288</sup> Ces mêmes vibrations sont retrouvées sur les nanoparticules Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-LDOPA-PEG<sub>n</sub> (n = 2 000, 10 000 Da) avec une vibration supplémentaire à 2915 cm<sup>-1</sup> associée aux étirements asymétriques des groupements -CH<sub>2</sub>.<sup>288</sup> Par ailleurs les vibrations asymétriques des groupements C-O-C fortement présents dans les molécules de PEG sont retrouvées à 1100 et 1050 cm<sup>-1</sup>.<sup>14, 288, 297</sup>

Les analyses XPS appuient ces premières observations (Tableau 11 et Tableau 12). A propos des concentrations atomiques, un nouvel élément (azote) sur les nanoparticules Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-DHCA-PEG<sub>n</sub> (n = 2 000 et 10 000 Da) et une légère augmentation de la concentration atomique en azote passant de 5% (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-LDOPA) à 6 % sur certains échantillons (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-LDOPA-PEG<sub>10000</sub> en tampon d'activation PBS ou MES) apparaissent. En parallèle, la concentration en carbone augmente et passe de 41% (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-LDOPA) à 53 % (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-LDOPA-PEG<sub>10000</sub> en MES) par exemple. De même, les concentrations relatives au fer et à l'oxygène diminuent respectivement de 14 (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-LDOPA) à 7% (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-LDOPA-PEG<sub>10000</sub> en MES) et de 39 (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-LDOPA) à 34% (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-LDOPA-PEG<sub>10000</sub> en MES). L'augmentation de la concentration en carbone provient du polymère PEG. La diminution en fer et en oxygène (oxygène de structure O<sup>2-</sup>) est quant à elle induite par un recouvrement de la surface des oxydes de fer par les molécules de PEG qui masquent le cœur inorganique de la nanoparticule. Ainsi, ces observations sont liées à la présence de PEG greffés sur les nanoparticules Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-DHCA-PEG<sub>n</sub> et Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-LDOPA-PEG<sub>n</sub>. Des pollutions résiduelles en sodium de l'ordre de 1% apparaissent suites aux synthèses.

Après avoir désommé les pics C1s et O1s (Figure 69, Figure 70, Figure 71, Figure 72 et Tableau 11), les pourcentages relatifs aux contributions C-O-C et O-C attribuées au PEG<sup>298-301</sup> augmentent respectivement. Par exemple, elles passent de 34% (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-DHCA) à 50% (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-DHCA-PEG<sub>2000</sub>) et de 5% (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-DHCA) à 14% (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-DHCA-PEG<sub>2000</sub>). Par ailleurs, la proportion relative à la contribution O=C-O (C1s) chute lorsque les molécules de PEG sont greffées. En effet, elle passe de 24% (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-DHCA) à 11% (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-DHCA-PEG<sub>2000</sub> en tampon d'activation MES) et de 17% (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-LDOPA) à 9% (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-LDOPA-PEG<sub>2000</sub> en tampon d'activation MES). Ceci montre que ces groupements sont masqués par les PEG greffés. Enfin, pour les échantillons Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-LDOPA-PEG<sub>n</sub> dont l'activation s'est déroulée en tampon MES ou PBS, la contribution π-π\* disparaît. Toutes ces modifications mises en évidence en XPS sont donc liées à la présence des chaînes carbonées du PEG greffé sur les groupements carboxylates des molécules DHCA et LDOPA.



Tampon	Echantillon	C (%)	N (%)	O (%)	Fe (%)	Na (%)
Ref	Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -DHCA	28	-	50	22	-
PBS	Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -DHCA-PEG <sub>2000</sub>	30	2	48	20	-
	Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -DHCA-PEG <sub>10000</sub>	29	2	48	21	-
MES	Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -DHCA-PEG <sub>2000</sub>	33	3	47	12	5
	Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -DHCA-PEG <sub>10000</sub>	28	1	50	21	-
Ref	Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -LDOPA	41	5	39	14	1
PBS	Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -LDOPA-PEG <sub>2000</sub>	39	5	41	15	-
	Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -LDOPA-PEG <sub>10000</sub>	50	6	36	7	1
MES	Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -LDOPA-PEG <sub>2000</sub>	57	4	31	7	1
	Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -LDOPA-PEG <sub>10000</sub>	53	6	34	7	-

Tableau 12 : Concentrations atomiques en C, O, N, Fe et Na des échantillons Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-DHCA-PEG<sub>n</sub> et Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-LDOPA-PEG<sub>n</sub> (n = 2000, 10000 Da) synthétisés en tampon PBS et MES

Par ailleurs, les analyses ATG (Figure 73) et zétamétriques (Figure 74) des échantillons Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-DHCA-PEG<sub>n</sub> et Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-LDOPA-PEG<sub>n</sub> (n = 2000 et 10000 Da) en tampon d'activation MES ou PBS soulignent respectivement une perte de masse plus importante au-delà de 100°C et un écrantage du potentiel ζ (vers les potentiels nuls). Cet écrantage est généré par la présence de PEG à la surface des nanoparticules, l'absence de charge de ce polymère et la création de la liaison covalente entre les groupements COOH des molécules catéchols et les NH<sub>2</sub> des chaînes de PEG élimine les charges liées à ces derniers.

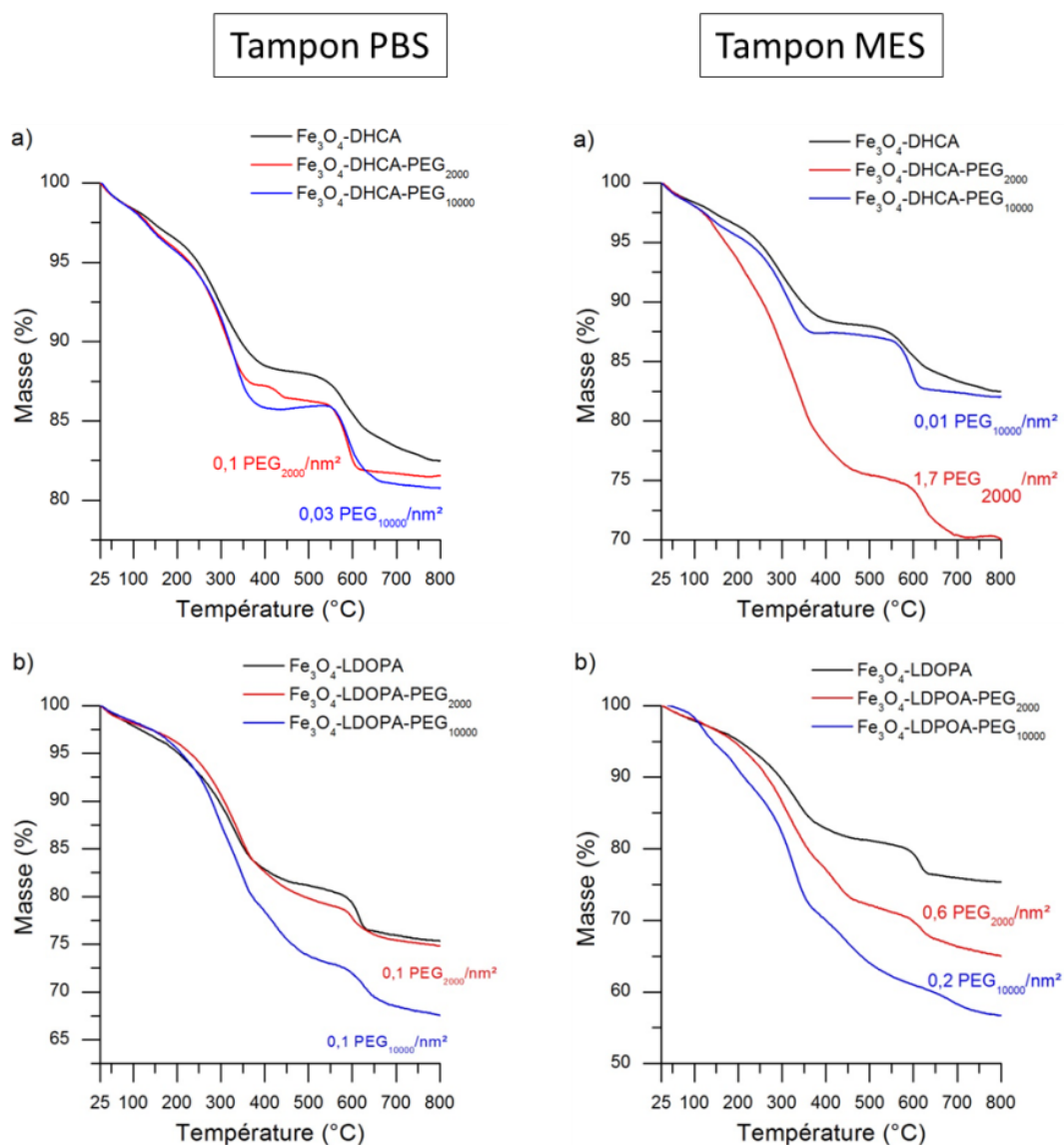


Figure 73 : Courbes ATG des poudres a) Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-DHCA-PEG<sub>n</sub> et b) Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-LDOPA-PEG<sub>n</sub> (n = 2000, 10000 Da) (sous flux de N<sub>2</sub> = 25 mL.min<sup>-1</sup> à 5°C/min) activées en tampon PBS ou MES et les quantités relatives de chaînes PEG à la surface des nanoparticules

### 3.1.4 Influence du tampon d'activation

La nature du tampon (PBS ou MES) lors de l'activation du groupement carboxylique des molécules DHCA et LDOPA influence l'efficacité du greffage de PEG.

En effet, par analyse ATG, la proportion de molécules de PEG présentes à la surface des nanoparticules augmente quand le tampon d'activation est le MES. La quantité de PEG estimée est exprimée en considérant un agglomérat de 100 nm (taille hydrodynamique observée en DLS). La quantité de PEG<sub>2000</sub> passe de 0,1 PEG<sub>2000</sub>.nm<sup>-2</sup> (3 100 PEG<sub>2000</sub>/agglomérat) sous activation PBS à 1,7 PEG<sub>2000</sub>.nm<sup>-2</sup> (53 000 PEG<sub>2000</sub>/agglomérat) sous activation MES pour l'échantillon Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-DHCA-PEG<sub>2000</sub>. Concernant l'échantillon Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-LDOPA-PEG<sub>2000</sub>, la quantité de PEG<sub>2000</sub> passe de 0,1 PEG<sub>2000</sub>.nm<sup>-2</sup> (3 100 PEG<sub>2000</sub>/agglomérat) sous activation PBS à 0,6 PEG<sub>2000</sub>.nm<sup>-2</sup> (18 800 PEG<sub>2000</sub>/agglomérat) sous activation MES. Quant aux molécules de PEG<sub>10000</sub> aucune évolution notable entre les deux tampons d'activation n'en ressort (Tableau 13).

Tampon	Echantillon	Nombre de PEG/nm <sup>2</sup>	Nombre de PEG/agglomérat
PBS	Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -DHCA-PEG <sub>2000</sub>	0,1	3 100
	Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -DHCA-PEG <sub>10000</sub>	0,03	900
MES	Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -DHCA-PEG <sub>2000</sub>	1,7	53 000
	Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -DHCA-PEG <sub>10000</sub>	0,01	300
PBS	Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -LDOPA-PEG <sub>2000</sub>	0,1	3 100
	Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -LDOPA-PEG <sub>10000</sub>	0,1	3 100
MES	Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -LDOPA-PEG <sub>2000</sub>	0,6	18 800
	Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -LDOPA-PEG <sub>10000</sub>	0,2	6 200

Tableau 13 : Nombre de PEG/nm<sup>2</sup> et PEG/agglomérat de 100 nm (taille hydrodynamique observée en DLS) des échantillons Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-DHCA-PEG<sub>n</sub> et Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-LDOPA-PEG<sub>n</sub> (n = 2 000, 10 000 Da) synthétisées en tampon PBS et MES

Les analyses zétamétriques montrent que l'écrantage du potentiel  $\zeta$  est plus conséquent lorsque les activations sont réalisées en tampon MES sur les échantillons Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-DHCA-PEG<sub>2000</sub> ce qui concorde avec les mesures faites par ATG. En effet, le potentiel  $\zeta$  passe de -30 mV lorsque le tampon d'activation PBS est utilisé (Figure 74-a) à -19 mV lorsque le tampon d'activation MES est employé (Figure 74-b). Pour les échantillons Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-LDOPA-PEG<sub>2000</sub> même si la quantité de PEG greffée augmente légèrement en employant le tampon MES, le potentiel  $\zeta$  n'est pas modifié (-17 mV) (Figure 74-c et Figure 74-d). Pour les nanoparticules modifiées par des chaînes de PEG<sub>10000</sub>, le potentiel  $\zeta$  reste identique car la quantité de PEG préalablement déterminée à l'aide de la technique ATG reste inchangée entre les deux tampons d'activation.

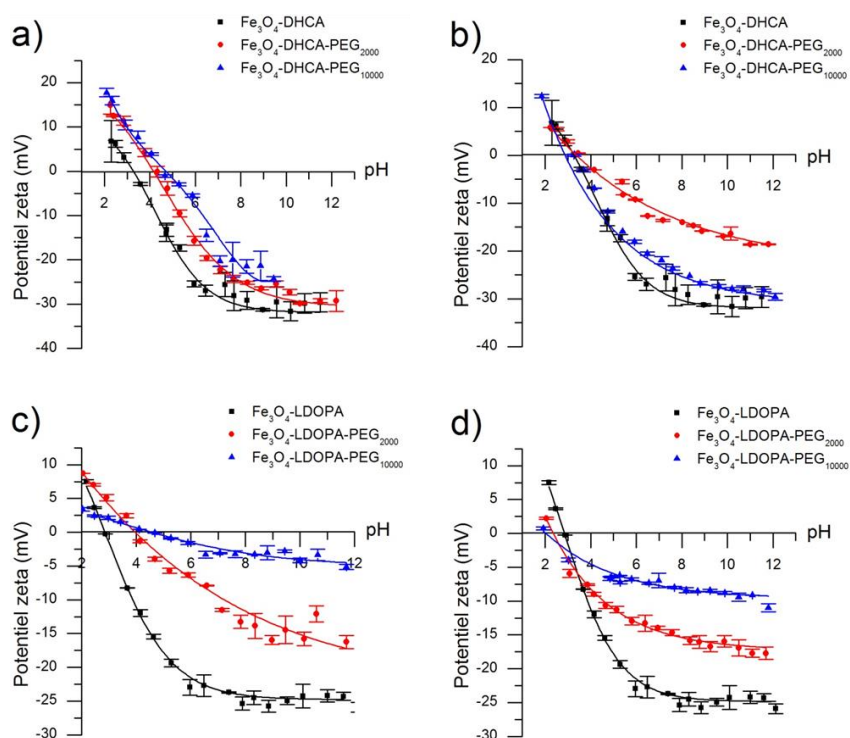


Figure 74 : Courbes zétamétriques des échantillons a) Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-DHCA-PEG<sub>n</sub> activés en milieu PBS et b) Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-DHCA-PEG<sub>n</sub> activés en milieu MES, c) Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-LDOPA-PEG<sub>n</sub> activés en milieu PBS et d) Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-LDOPA-PEG<sub>n</sub> activés en milieu MES (n = 2 000, 10 000 Da)

Ces résultats montrent que le tampon d'activation MES améliore le greffage des PEG à la surface des nanoparticules. Il est possible de greffer jusqu'à 17 fois plus de PEG<sub>2000</sub> sur les nanoparticules Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-DHCA. Un écrantage plus marqué du potentiel  $\zeta$  résulte de ce greffage.

### 3.1.5 Influence de la longueur de la chaîne carbonée sur le greffage

A partir des résultats ATG (Tableau 13 et Figure 73) et de potentiel  $\zeta$ , il apparaît que le greffage du PEG<sub>10000</sub> est nettement moins efficace que dans le cas du PEG<sub>2000</sub> (Figure 74). Les molécules de PEG<sub>10000</sub> se greffent difficilement quel que soit le tampon d'activation utilisé (MES ou PBS). La quantité de molécules PEG par nm<sup>2</sup> déterminée à partir des résultats ATG est de 0,2 et 0,1 PEG<sub>10000</sub>/nm<sup>2</sup> pour les nanoparticules Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-LDOPA-PEG<sub>10000</sub> dont l'activation s'est déroulée respectivement en tampon MES et PBS. Pour les nanoparticules Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-DHCA-PEG<sub>10000</sub>, la quantité calculée est de 0,01 et 0,03 PEG<sub>10000</sub>/nm<sup>2</sup> dont l'activation s'est déroulée respectivement en tampon MES et PBS. Ces valeurs sont inférieures à celles obtenues avec les molécules PEG<sub>2000</sub>. Il est possible que cette longue chaîne carbonée s'enroule sur elle-même en formant des « pelotes » rendant inaccessible le groupement NH<sub>2</sub> pour former la liaison covalente avec le groupement carboxylique des molécules de DHCA ou de LDOPA. Cependant, malgré la faible proportion de PEG<sub>10000</sub> greffée à la surface des nanoparticules d'oxydes de fer en comparaison aux chaînes PEG<sub>2000</sub>, des variations apparaissent. Une variation importante en zétamétrie est observée malgré la faible proportion présente sur les particules Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-LDOPA-PEG<sub>10000</sub>. Pour rappel, le potentiel  $\zeta$  passe de -30 mV (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-LDOPA) à -17 mV (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-LDOPA-PEG<sub>2000</sub>) et -9 mV (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-LDOPA-PEG<sub>10000</sub>) (Figure 74-d) en tampon MES. Ces observations sont identiques en milieu tampon PBS.

Enfin, il est plus facile de greffer des molécules PEG<sub>10000</sub> sur la LDOPA. En effet, la quantité obtenue à l'aide de l'ATG souligne par exemple qu'il est possible de greffer 20 fois plus de PEG<sub>10000</sub> sur cette dernière que sur le DHCA en tampon MES (Figure 73).

### 3.1.6 Influence sur la taille hydrodynamique des nanoparticules modifiées par des chaînes carbonées de PEG<sub>n</sub>

Dans les parties précédentes, il a été montré que la fonctionnalisation par les chaînes PEG est un succès et que le tampon d'activation influence la quantité de greffage. Il est intéressant de voir maintenant le comportement des nanoparticules en suspension (Figure 75). Que ce soit sur les nanoparticules Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-DHCA-PEG<sub>n</sub> et Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-LDOPA-PEG<sub>n</sub> (n = 2000, 10 000 Da), le diamètre hydrodynamique mesuré par DLS augmente en milieu NaCl (10<sup>-2</sup> M). En effet, il passe par exemple de 124 ± 2 nm (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-DHCA) à 148 ± 2 nm (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-DHCA-PEG<sub>2000</sub>) et 167 ± 5 nm (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-DHCA-PEG<sub>10000</sub>) lorsque l'activation est réalisée en milieu PBS. Pour les particules Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-LDOPA, le diamètre hydrodynamique passe de 106 ± 2 nm à 125 ± 1 nm (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-LDOPA-PEG<sub>2000</sub>) et à 172 ± 18 nm (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-LDOPA-PEG<sub>10000</sub>) (Figure 75-a) et Figure 75-c)). Cependant aucune évolution de taille n'est observée sur les particules Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-LDOPA-PEG<sub>n</sub> lorsque l'activation a été réalisée en tampon MES

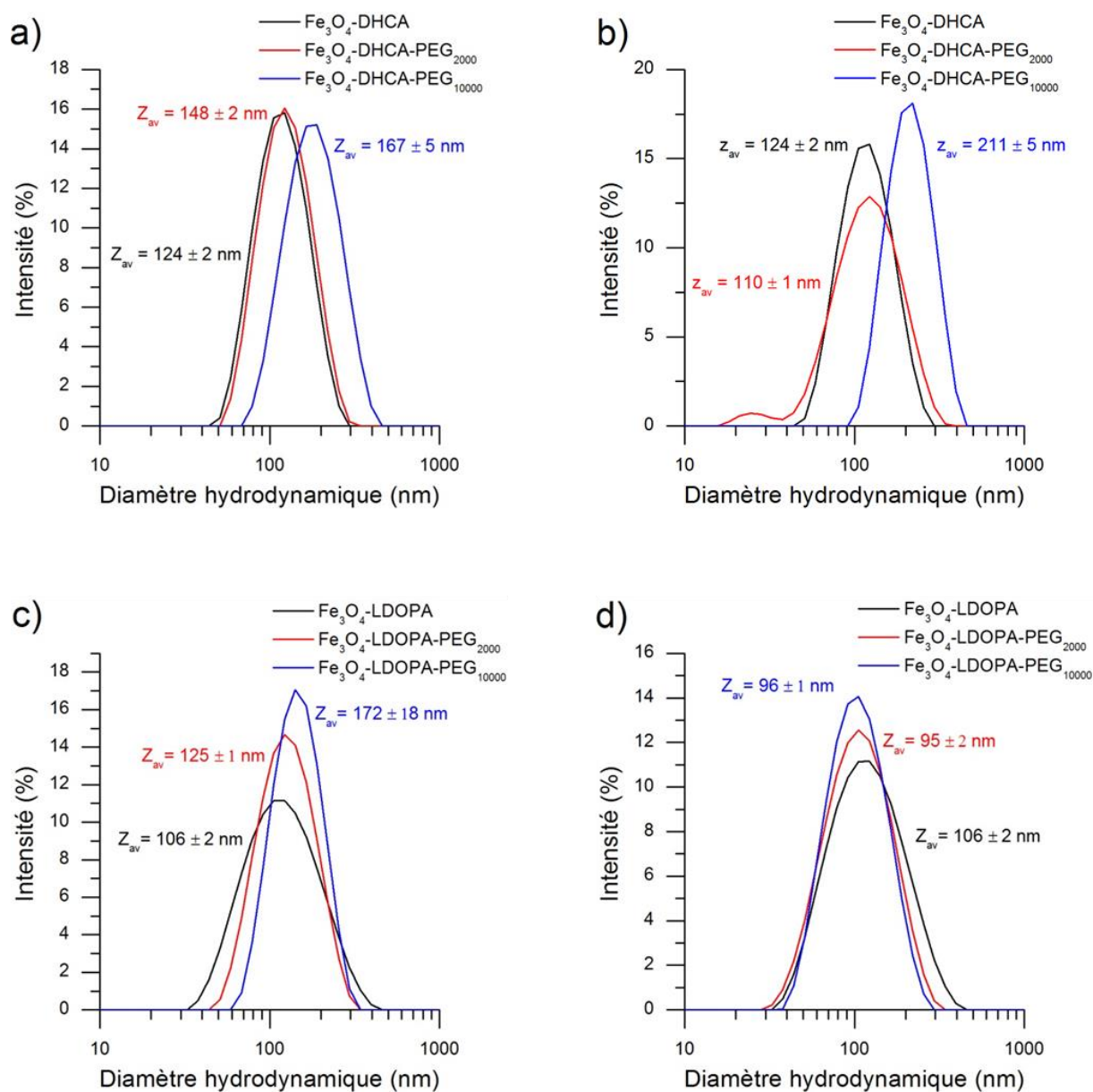


Figure 75 : Courbes DLS à pH physiologique et  $10^{-2}$ M en NaCl des échantillons préalablement lyophilisés a)  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -DHCA-PEG<sub>n</sub> activés en PBS et b)  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -DHCA-PEG<sub>n</sub> activés en MES, c)  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -LDOPA-PEG<sub>n</sub> activés en PBS et d)  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -LDOPA-PEG<sub>n</sub> activés en MES (n = 2000, 10000 Da)

Les longues chaînes carbonées (PEG<sub>10000</sub>) induisent une augmentation significative de la taille hydrodynamique moyenne des nanoparticules malgré la faible proportion greffée sur les particules  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -LDOPA-PEG<sub>10000</sub> et  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -DHCA-PEG<sub>10000</sub>.

Les clichés MET des particules ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -DHCA,  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -DHCA-PEG<sub>2000</sub>,  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -DHCA-PEG<sub>10000</sub>,  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -LDOPA,  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -LDOPA-PEG<sub>2000</sub> et  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -LDOPA-PEG<sub>10000</sub>) (Figure 76) confirment une gêne par effet stérique des PEG. Les agrégats sont plus espacés entre eux comme en témoignent les Figure 76-(b-c) et (e-f)).

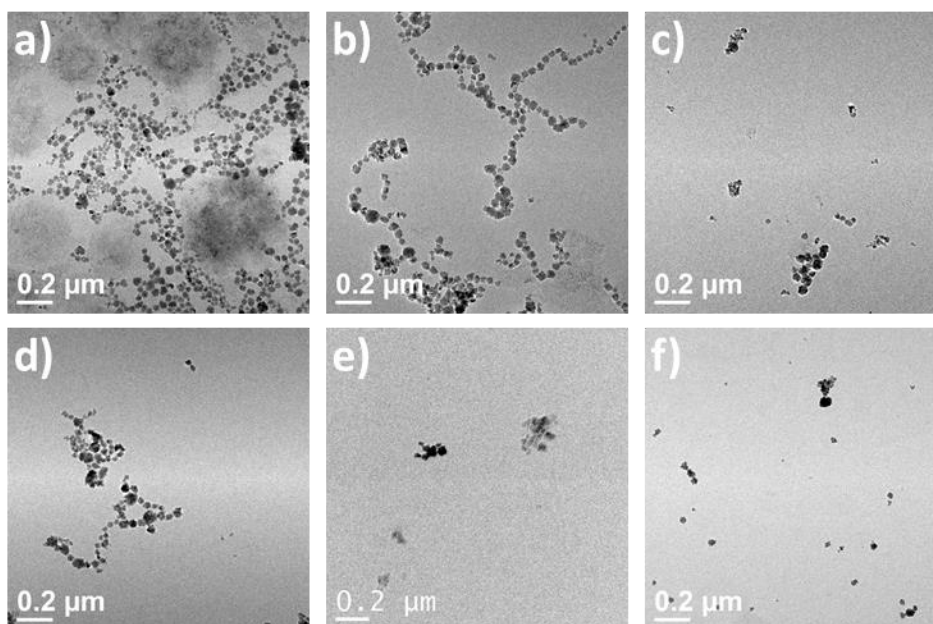


Figure 76 : Images MET des nanoparticules a)  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -DHCA, b)  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -DHCA-PEG<sub>2000</sub>, c)  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -DHCA-PEG<sub>10000</sub>, d)  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -LDOPA, e)  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -LDOPA-PEG<sub>2000</sub> et f)  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -LDOPA-PEG<sub>10000</sub>. Les suspensions ont préalablement subi un cycle d'ultrason de 10 à 30 secondes.

Le comportement des nanoparticules de type  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -LDOPA-PEG<sub>2000</sub> et  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -LDOPA-PEG<sub>10000</sub> en milieu MEM et PBS a été étudié (Figure 77).

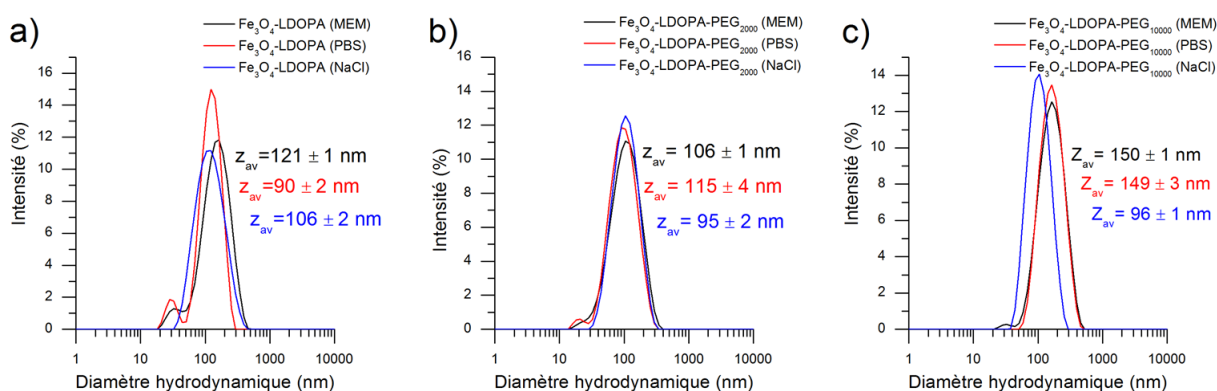


Figure 77 : a) Courbes DLS et diamètres hydrodynamiques des nanoparticules  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -LDOPA, b)  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -LDOPA-PEG<sub>2000</sub> et c)  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -LDOPA-PEG<sub>10000</sub> dans du NaCl ( $10^{-2}\text{M}$ ), PBS 1x et du MEM après ultrasons

Les nanoparticules  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -LDOPA montrent un comportement différent entre les deux milieux MEM et PBS, soit une légère instabilité ( $Z_{av} = 121 \pm 1$  nm) en milieu MEM contre  $90 \pm 2$  nm en milieu PBS (1x). Une augmentation de la largeur de la courbe DLS [21 nm-459 nm] en milieu MEM contre [24 nm-295 nm] en milieu PBS (1x) est aussi observée (Figure 77 et Tableau 14). Les particules  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -LDOPA en milieu MEM ont tendance à former des agrégats.

Une fois modifiées par le PEG<sub>2000</sub>, le diamètre hydrodynamique des particules  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -LDOPA-PEG<sub>2000</sub> varie très peu entre les deux milieux ( $115 \pm 4$  nm en PBS et  $106 \pm 1$  nm MEM). La distribution en largeur des diamètres hydrodynamiques des agrégats en DLS ([21 nm-459 nm]) diminue en milieu MEM ([14 nm-342 nm]) (Tableau 14 et Figure 77-a). En milieu NaCl, le diamètre



hydrodynamique et la largeur en distribution diminue aussi lorsque le PEG est greffé à la surface des nanoparticules. Par exemple, le diamètre DLS passe de  $106 \pm 2$  (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-LDOPA) à  $95 \pm 2$  nm (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-LDOPA-PEG<sub>2000</sub>). De même, la largeur diminue et passe de [38-342 nm] (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-LDOPA) à [33 nm-295 nm] (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-LDOPA-PEG<sub>2000</sub>).

Les particules Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-LDOPA-PEG<sub>10000</sub> montrent cependant une augmentation importante du diamètre hydrodynamique dans les deux milieux MEM et PBS ( $150 \pm 1$  nm et  $149 \pm 3$  nm respectivement). Dans le milieu NaCl, la taille hydrodynamique diminue légèrement ( $96 \pm 1$  nm). Le greffage du PEG<sub>10000</sub> sur les nanoparticules n'apporte pas de réels bénéfices comparé au greffage des PEG<sub>2000</sub>.

Milieu	Echantillon	$\varnothing_{DLS}$ (nm)	Diamètres extrêmes	
			$\varnothing_{Min}$ (nm)	$\varnothing_{Max}$ (nm)
MEM	Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -LDOPA	$121 \pm 1$	21	459
	Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -LDOPA-PEG <sub>2000</sub>	$106 \pm 1$	14	342
	Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -LDOPA-PEG <sub>10000</sub>	$150 \pm 1$	24	459
PBS	Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -LDOPA	$90 \pm 2$	24	295
	Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -LDOPA-PEG <sub>2000</sub>	$115 \pm 4$	16	295
	Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -LDOPA-PEG <sub>10000</sub>	$149 \pm 3$	59	459
NaCl	Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -LDOPA	$106 \pm 2$	38	342
	Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -LDOPA-PEG <sub>2000</sub>	$95 \pm 2$	33	295
	Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -LDOPA-PEG <sub>10000</sub>	$96 \pm 1$	38	255

Tableau 14 : Diamètre hydrodynamique moyen  $\varnothing_{DLS}$  (nm) des nanoparticules Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-LDOPA et Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-LDOPA-PEG<sub>2000</sub> (MES) en milieu MEM, PBS et NaCl (pH = 7,4 et 10<sup>-2</sup>M NaCl) et diamètres extrêmes (distribution en taille)

Compte tenu des résultats obtenus, les particules d'oxydes de fer modifiées par des PEG<sub>2000</sub> dont l'activation est réalisée en tampon MES constituent le meilleur compromis en termes de taille hydrodynamique (<150 nm), de stabilité colloïdale en milieu biologique (MEM) et de taux de recouvrement élevé.

En terme de recouvrement, le greffage des PEG<sub>2000</sub> sur les nanoparticules Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-LDOPA est satisfaisant pour ne pas modifier le diamètre hydrodynamique tout en générant favorablement un effet stérique. De plus, ces nanoparticules possèdent un groupement NH<sub>2</sub> libre utile pour greffer d'autres molécules d'intérêt comme les macrocycles pour l'imagerie nucléaire. C'est pour cela que la suite des travaux portera uniquement sur ce type de nanoparticules.

### 3.1.7 Mesures $r_1$ et $r_2$

Les relaxivités  $r_1$  et  $r_2$  de l'échantillon retenu, Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-LDOPA-PEG<sub>2000</sub>, sont déterminées, sur un appareil clinique IRM (3T), à partir des mesures  $T_1$  et  $T_2$  de tubes contenant un gel d'acrylamide dans lequel les oxydes de fer sont dispersés. Différentes concentrations en fer ont été établies : 1, 3, 5, 7, 10 et 20  $\mu\text{g}_{\text{Fe}}/\text{mL}$  (Annexe 13). Chacune des images est obtenue pour 32 temps d'échos allant de  $T_E = 7,9$  ms à 252,8 ms avec un pas de 7,9 ms. Pour les mesures  $T_1$ , des temps d'inversion de 50, 200, 400, 700, 1000, 1200, 1500, 2500, 4000 et 5500 ms sont utilisés.

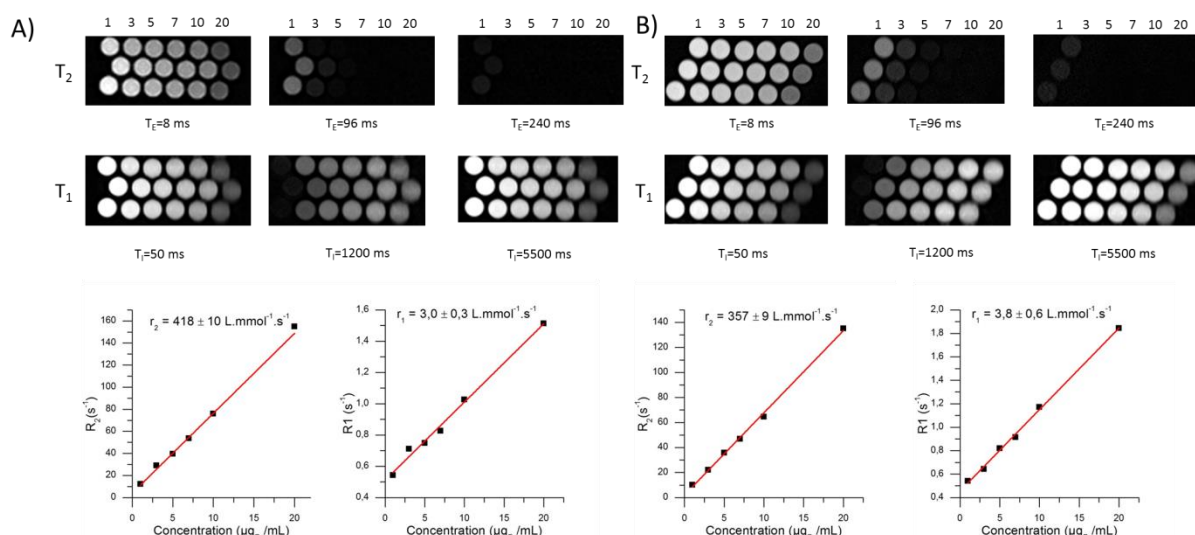


Figure 78 : Images pondérées en T<sub>1</sub> et T<sub>2</sub> des nanoparticules et courbes R<sub>2</sub>(s<sup>-1</sup>) en fonction de la concentration en fer (µg<sub>Fe</sub>/mL) A) Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-LDOPA et B) Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-LDOPA-PEG<sub>2000</sub> déterminées à partir d'un appareil IRM clinique (3T)

Les images pondérées en T<sub>2</sub> montrent que ces nanoparticules sont efficaces comme agent de contraste T<sub>2</sub> (Figure 78). En effet, lorsque la concentration en oxydes de fer augmente, un contraste négatif (assombrissement de la région d'intérêt) apparaît avec une disparition totale pour un temps d'écho de 240 ms.

Comparées aux nanoparticules de départ (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-LDOPA) présentant une valeur de r<sub>2</sub> égale à 418 ± 10 L.mmol<sub>Fe</sub><sup>-1</sup>.s<sup>-1</sup>, les nanoparticules Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-LDOPA-PEG<sub>2000</sub> présentent une relaxivité r<sub>2</sub> légèrement plus faible (r<sub>2</sub> = 357 ± 9 L.mmol<sub>Fe</sub><sup>-1</sup>.s<sup>-1</sup>) (Figure 78). Cependant, elle reste bien supérieure à la plupart des agents de contraste à base d'oxydes de fer développés, comme l'agent commercial Clivast™ (r<sub>2</sub> = 194 ± 15 L.mmol<sub>Fe</sub><sup>-1</sup>.s<sup>-1</sup>).<sup>302</sup> Il est possible que la diminution de la relaxivité r<sub>2</sub> soit due à la nouvelle couche de PEG<sub>2000</sub> qui limite en partie l'accès des molécules d'eau à l'oxyde de fer mais aussi par l'effet stérique des PEG qui diminuent les interactions magnétiques dipolaires. Concernant la relaxivité r<sub>1</sub> (3,8 ± 0,6 L.mmol<sub>Fe</sub><sup>-1</sup>.s<sup>-1</sup>) des nanoparticules modifiées par le PEG<sub>2000</sub>, elle reste comparable à celle obtenue avec les nanoparticules Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-LDOPA (r<sub>1</sub> = 3,0 ± 0,3 L.mmol<sub>Fe</sub><sup>-1</sup>.s<sup>-1</sup>). Toutefois, cette valeur est très proche de certains agents T<sub>1</sub> (§ 1.4.1.2.1) comme le Dotarem® (4,2 L.mmol<sub>Fe</sub><sup>-1</sup>.s<sup>-1</sup>) ou des oxydes de fer bimodaux T<sub>1</sub> et T<sub>2</sub> (nanoparticules de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> modifiées en surface par de l'acide polyacrylique avec r<sub>1</sub> = 6,15 L.mmol<sup>-1</sup>.s<sup>-1</sup> et r<sub>2</sub> = 28,62 L.mmol<sup>-1</sup>.s<sup>-1</sup> mesurés sur un scanner IRM 7T) avec un r<sub>2</sub>/r<sub>1</sub>=4,65.<sup>303</sup> Cette valeur r<sub>2</sub>/r<sub>1</sub> est inférieure aux nanoparticules Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-LDOPA-PEG<sub>2000</sub> (r<sub>2</sub>/r<sub>1</sub>=94).

Les nanoparticules Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-LDOPA et Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-LDOPA-PEG<sub>2000</sub> se montrent particulièrement efficaces et prometteuses pour des applications comme agent de contraste T<sub>2</sub>.

### 3.1.8 Conclusion

Cette étude montre que le greffage des PEG sur les groupements COOH des molécules DHCA et LDOPA présentes à la surface des oxydes de fer synthétisés en hydrothermal continu est possible. Les nanoparticules Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-DHCA et Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-LDOPA ont été fonctionnalisées par des PEG<sub>2000</sub> et PEG<sub>10000</sub>.



Augmenter la longueur de la chaîne carbonée des PEG a conduit à accroître le diamètre hydrodynamique et à écranter le potentiel  $\zeta$  même si la fonctionnalisation des nanoparticules par le PEG<sub>10000</sub> est plus modérée (ATG et XPS). Le tampon d'activation MES sera préféré au tampon PBS car la fonctionnalisation est supérieure en terme de quantité de PEG greffée et la stabilité des nanoparticules en milieu biologique est meilleure. Les nanoparticules Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-LDOPA représentent le meilleur choix car elles ont un groupement NH<sub>2</sub> utile pour réaliser d'autres greffages. Seules les nanoparticules fonctionnalisées par le PEG<sub>2000</sub> seront retenues pour la suite de ce travail car le taux de greffage obtenu est satisfaisant et le diamètre hydrodynamique reste inférieur à 150 nm quel que soit le milieu (NaCl, PBS, MEM). Ainsi, les nanoparticules Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-LDOPA-PEG<sub>2000</sub> sont bien adaptées pour envisager des applications biologiques.

### 3.2 Développement des agents bimodaux IRM/TEP et/ou IRM/TEMP

Les nanoparticules d'oxydes de fer de type magnétite Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> préalablement modifiées en surface par la LDOPA ont montré une bonne stabilité en milieu biologique MEM avec une taille moyenne d'agglomérats inférieurs à 150 nm. De plus, elles ont été modifiées par du PEG dans l'objectif d'améliorer la furtivité des nanoparticules. Ces deux types de nanoparticules (PEGylées ou non) seront utilisés pour greffer sur les groupements NH<sub>2</sub> les chélatants nécessaires à la complexation des radioéléments utilisés en imagerie TEP/TEMP (Tomographie par Emission de Positons/Tomographie d'Emission MonoPhotonique). Cette partie se consacre à l'étude du greffage des trois chélatants que sont le DOTA, le NODAGA et le MANOTA à la surface des nanoparticules. Ces trois macrocycles sont sélectionnés car ils présentent des stabilités *in vivo* avec le cuivre 64 différentes. Des expériences de radiomarquage sont réalisées sur les nanoparticules modifiées. Différents solvants de fonctionnalisation (PBS et DMSO) sont utilisés afin d'étudier leur influence sur l'efficacité de greffage.

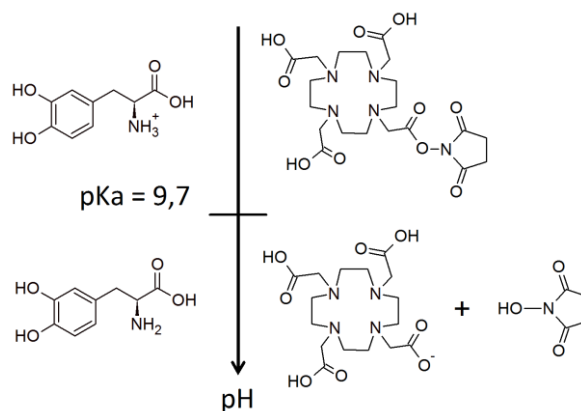
#### 3.2.1 Premiers tests de greffage d'un macrocycle sur les nanoparticules Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-LDOPA : le DOTA

Afin de vérifier la réponse des nanoparticules Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-LDOPA au greffage d'agents chélatants, des premiers tests ont été réalisés avec l'agent le plus couramment utilisé et accessible en plus grandes quantités : le DOTA (même si ce dernier n'est pas le plus adapté pour des applications *in vivo* en terme de complexation du cuivre). Il permettra de tester la réactivité des groupements chimiques NH<sub>2</sub> de la LDOPA et aussi de le comparer au NODAGA.

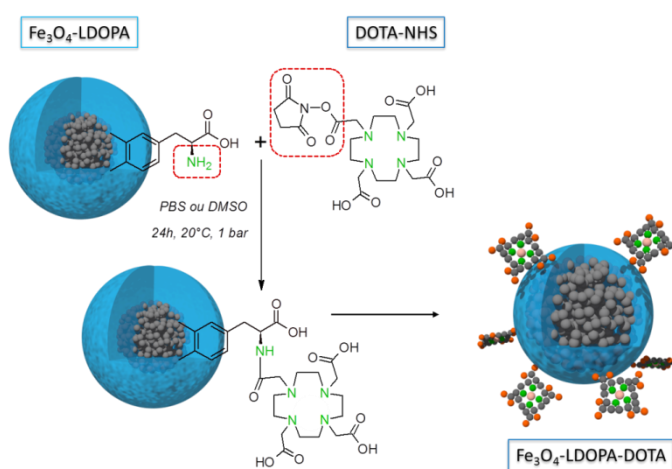
##### 3.2.1.1 Matériels et protocole

Deux protocoles ont été mis en place pour réaliser le greffage du DOTA : l'un en milieu PBS et le second en milieu solvant organique polaire et aprotique DMSO (DiMéthyl SulfOxyde). La question sur le choix du milieu s'est posée par rapport au pK<sub>a</sub> du groupement NH<sub>2</sub> de la LDOPA (9,7). Aux alentours de ce pH, les NH<sub>3</sub><sup>+</sup> se déprotonent. Une fois transformés en NH<sub>2</sub>, la réaction avec le groupement NHS du DOTA peut avoir lieu. Ainsi, le milieu PBS (pH = 7,4) est susceptible d'être un obstacle dans la synthèse car les groupements NH<sub>3</sub><sup>+</sup> sont majoritaires à ce pH (Figure 79). Une synthèse dans un tampon à pH plus

important n'est pas adaptée car les groupements NHS s'hydrolysent rapidement au-delà d'un pH égal à 8 (le temps de demi-vie des NHS est égal à 10 min à pH = 8,6). Pour s'affranchir de cela, une synthèse en DMSO a été réalisée.



Pour réaliser les greffages, des nanoparticules  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -LDOPA synthétisées à partir du dispositif hydrothermal selon le run 1 (150°C, 25MPa, 80 mL/min), du DOTA-NHS fourni par CheMatech et l'ICMUB, du PBS (Phosphate buffered saline) 1X Solution (Fisher Bioreagents) et du DMSO (Sigma BioReagent,  $\geq 99.9\%$ ) sont utilisés.



Le greffage des macrocycles DOTA-NHS (comprenant un TFA et un  $\text{HPF}_6$ ,  $6,6 \cdot 10^{-5}$  mol) sur les particules  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -LDOPA ( $1,8 \cdot 10^{-4}$  mol de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  et  $2,2 \cdot 10^{-5}$  mol de LDOPA) *via* les groupements  $\text{NH}_2$  de la molécule LDOPA est réalisé en milieu PBS (1M,  $V = 30\text{mL}$ ) à pH = 7,4 durant 24 heures à 20°C (Figure 80). La suspension est ensuite ultrafiltrée sous flux d'azote (Amicon® UltraCel 30 KDa) et lyophilisée afin d'obtenir des poudres. Pour le greffage en milieu DMSO,  $4,9 \cdot 10^{-5}$  mol de DOTA-NHS (avec un TFA et un  $\text{HPF}_6$ ) sont engagées (Figure 80). La quantité molaire de DOTA engagée est en excès par rapport à celle de la LDOPA (facteur  $\sim 2$ ) afin de maximiser le greffage (hydrolyse du DOTA). Le volume est fixé à

$V_{\text{DMSO}} = 10\text{mL}$ . Chacune des poudres est caractérisée en ATG, XPS, IR et des tests de radiomarquage au  $^{64}\text{Cu}$  sont mis en place afin d'évaluer la complexation.

### 3.2.1.2 Validation du greffage

Pour vérifier la présence des macrocycles DOTA sur les nanoparticules d'oxydes de fer modifiées par la LDOPA, ces poudres ont été caractérisées en XPS, ATG et IR. Chacune de ces techniques met en évidence la présence des agents chélatants à la surface des particules d'oxyde de fer.

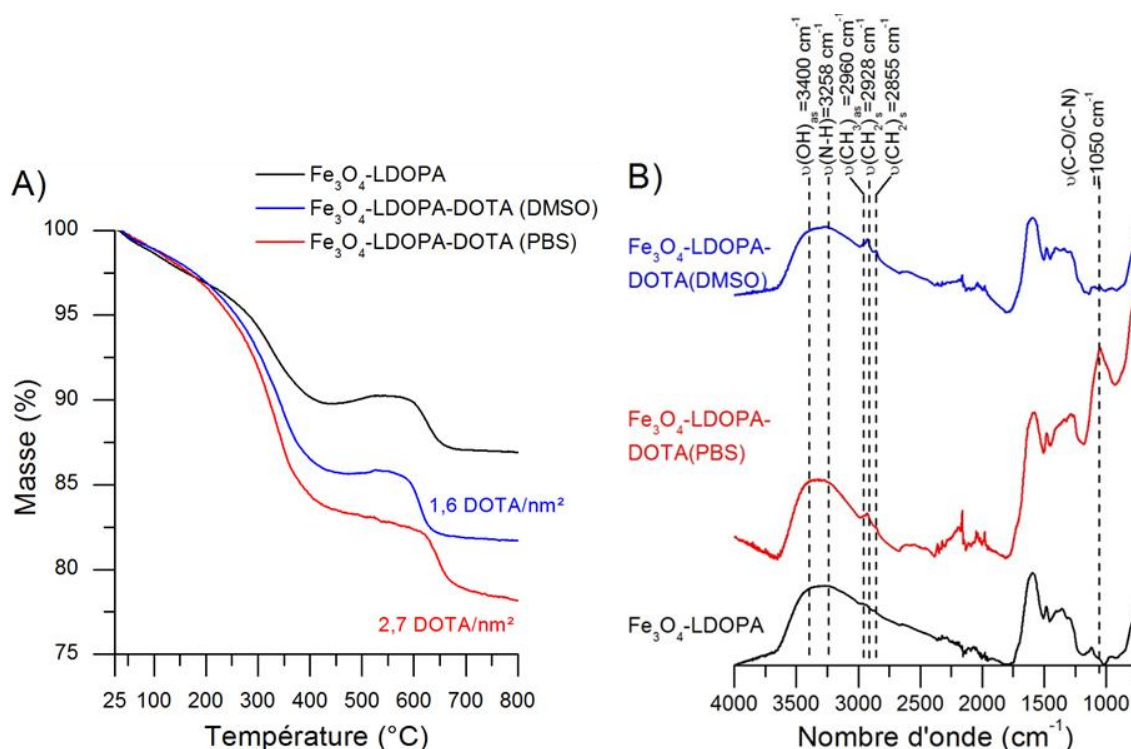


Figure 81 : A) Courbes ATG et B) IR en mode ATR des échantillons Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-LDOPA, Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-LDOPA-DOTA (PBS) et Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-LDOPA-DOTA (DMSO)

Les mesures ATG (Figure 81-A) mettent en évidence une perte de masse plus importante pour Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-LDOPA-DOTA (PBS). Cette perte de masse significative traduit la présence des macrocycles DOTA pour les deux protocoles de greffage. La perte de masse finale des échantillons est respectivement de 13,1%, 18,2% et 21,8% pour les échantillons Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-LDOPA, Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-LDOPA-DOTA (PBS) et Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-LDOPA-DOTA (DMSO).

	Nombre de DOTA/nm <sup>2</sup>	Nombre de DOTA/agglomérat	Nombre de fer par agglomérat	Rapport DOTA/Fer
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -LDOPA-DOTA (PBS)	2,7	85 000	21,3 million	0,017
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -LDOPA-DOTA (DMSO)	1,6	50 000	21,3 million	0,010

Tableau 15 : Nombre de DOTA/nm<sup>2</sup> déterminé à partir de la surface spécifique de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-LDOPA (50 ± 2 m<sup>2</sup>/g), nombre de DOTA/agglomérat (agglomérat de 100 nm) et le rapport DOTA/Fer des échantillons Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-LDOPA-DOTA (PBS) et Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-LDOPA-DOTA (DMSO)

A partir de la masse molaire du DOTA et de la surface spécifique ( $50 \pm 2 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ ), 2,7 molécules de DOTA/nm<sup>2</sup> et 1,6 molécules DOTA/nm<sup>2</sup> sont présentes à la surface des échantillons Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-LDOPA-DOTA (PBS) et Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-LDOPA-DOTA (DMSO) respectivement. Sur un agglomérat de 100 nm (valeur approximative prise afin de comparer ces taux de greffages avec les résultats des greffages de PEG<sub>n</sub>) de diamètre, une grande quantité de molécules de DOTA est fixée. Ce nombre s'élève à 85 000 et 50 000 pour les échantillons Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-LDOPA-DOTA (PBS) et Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-LDOPA-DOTA (DMSO) respectivement.

La masse de DOTA est plus importante lorsque le greffage a lieu en milieu PBS. Cette évolution est aussi mise en évidence par IR et XPS. En effet, par IR (Figure 81-B), les vibrations à 2960, 2928 et 2855 cm<sup>-1</sup> sont représentatives respectivement des étirements asymétriques des groupements -CH<sub>3</sub>, asymétriques des groupements -CH<sub>2</sub> et des étirements symétriques des groupes -CH<sub>2</sub> de la molécule DOTA.<sup>304, 305</sup> Une nouvelle contribution apparaît à 1050 cm<sup>-1</sup>. Elle est attribuée aux vibrations C-N (amine tertiaire)<sup>154</sup>/C-O<sup>306</sup> qui se superposent dans cette région spectrale.

	C (%)	N (%)	O (%)	Fe (%)	F (%)
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -LDOPA	27	4	49	20	-
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -LDOPA-DOTA (PBS)	25	3	50	22	-
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -LDOPA-DOTA (DMSO)	32	3	45	19	1

Tableau 16 : Concentrations atomiques en % déterminées par XPS des échantillons Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-LDOPA, Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-LDOPA-DOTA (PBS) et Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-LDOPA-DOTA (DMSO)

La spectroscopie XPS nous informe également que le DOTA est présent à la surface des nanoparticules (Figure 82 et Tableau 16). Des évolutions apparaissent sur le profil des poudres modifiées en milieu DMSO. La concentration atomique en carbone augmente et la présence nouvelle du fluor (résidu de synthèse de la molécule DOTA possédant un HPF6 et un TFA pour un DOTA) est observée. Cette observation indique la présence du DOTA à la surface des nanoparticules dont le greffage s'est déroulé en milieu DMSO. Cependant aucune évolution notable ne ressort pour la poudre Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-LDOPA-DOTA (PBS).

Les spectres des régions C1s, N1s et F1s des poudres étudiées soulignent aussi des changements. Sur la région C1s, la contribution CH/C-C des échantillons Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-LDOPA-DOTA (PBS) et Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-LDOPA-DOTA (DMSO) augmente. Elle passe respectivement de 44% à 49% et 54% pour Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-LDOPA, Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-LDOPA-DOTA (PBS) et Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-LDOPA-DOTA (DMSO). La contribution attribuée aux groupements COH/CN diminue légèrement mais un shift de +0,2 eV (286,0 eV) et de +0,3 eV (286,1 eV) par rapport à la poudre de référence Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-LDOPA sont notés. Ce décalage provient de la présence des groupements C-N du macrocycle mais aussi de la conjugaison entre le groupement NHS du DOTA et le groupement NH<sub>2</sub> de la LDOPA. L'environnement électronique de ces nouvelles nanoparticules est différent des poudres Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-LDOPA en raison de la présence nouvelle des atomes d'azote du macrocycle et de la nouvelle liaison N-C=O due à la fonctionnalisation. Aucune modification concernant les groupements carboxyliques (évolution de l'énergie de liaison et de la concentration relatives à cette contribution COOH) n'est notée malgré la présence importante de ces derniers sur la molécule DOTA.

La contribution  $\text{NH}_3^+$  (16%) des nanoparticules  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -LDOPA disparaît quand le DOTA est greffé à la fois en milieu PBS et DMSO. Cette absence confirme que le greffage s'est bien déroulé. Le milieu PBS (pH = 7,4) et la réaction de greffage ont favorisé cette transformation.

Enfin, la contribution F1s augmente pour l'échantillon  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -LDOPA-DOTA (DMSO).

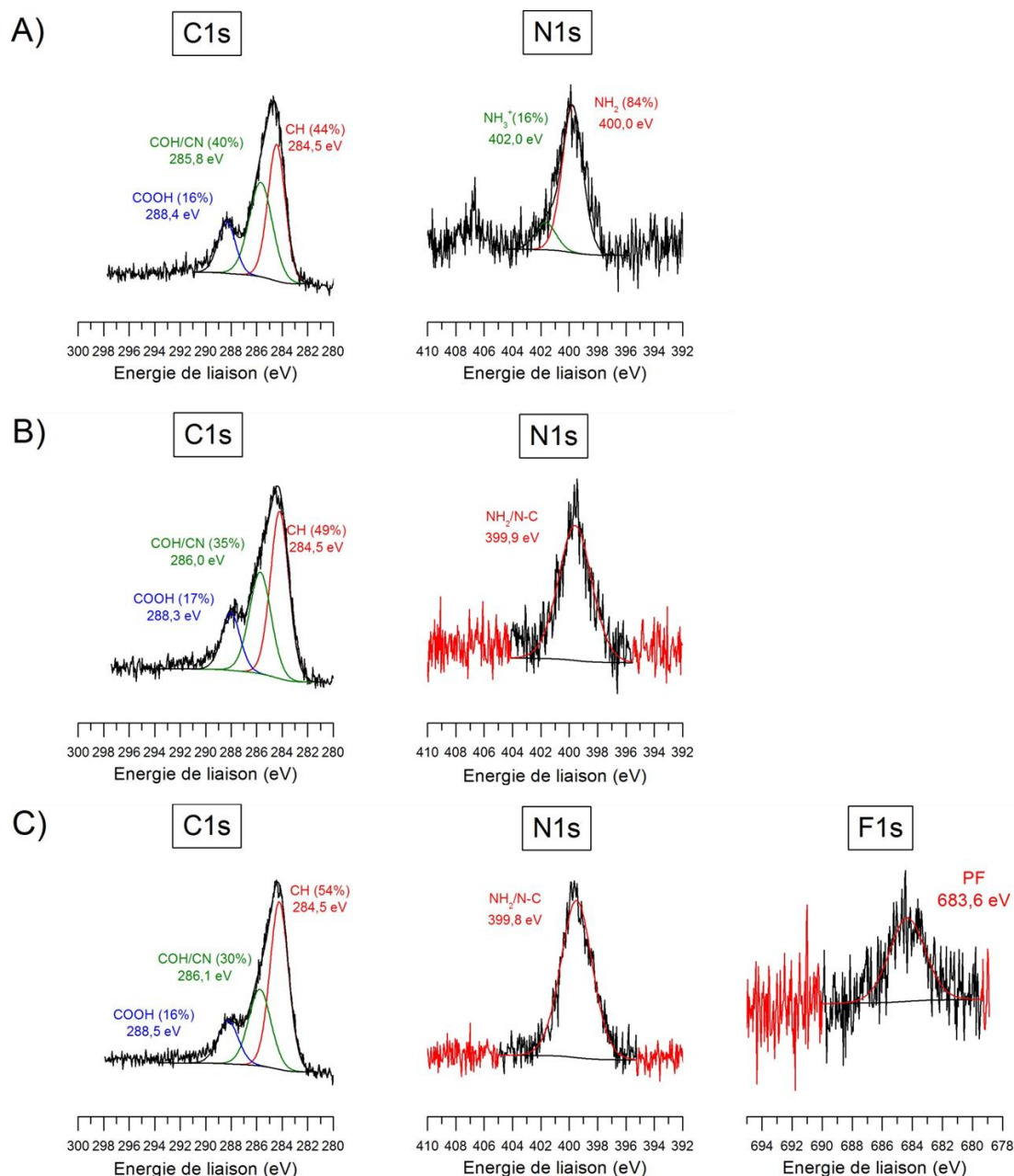


Figure 82 : Spectres XPS des poudres A)  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -LDOPA, B)  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -LDOPA-DOTA (PBS) et C)  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -LDOPA-DOTA (DMSO) sur les régions C1s, N1s et F1s

### 3.2.1.3 Stabilité des nanoparticules en suspension

Les mesures zétamétriques montrent une évolution uniquement sur l'échantillon dont le greffage a été réalisé en milieu PBS (Figure 83). Le potentiel  $\zeta$  mesuré passe de -25 mV ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -LDOPA) à -16 mV ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -LDOPA-DOTA (PBS)) à pH physiologique. Cet effet d'écrantage pourrait s'expliquer par la

présence en plus grand nombre des molécules DOTA à la surface des nanoparticules greffées en milieu PBS (2,7 molécules DOTA/nm<sup>2</sup>) par rapport au milieu DMSO (1,6 DOTA/nm<sup>2</sup>). Les amines tertiaires du cycle DOTA contribueraient à masquer la charge des nanoparticules.

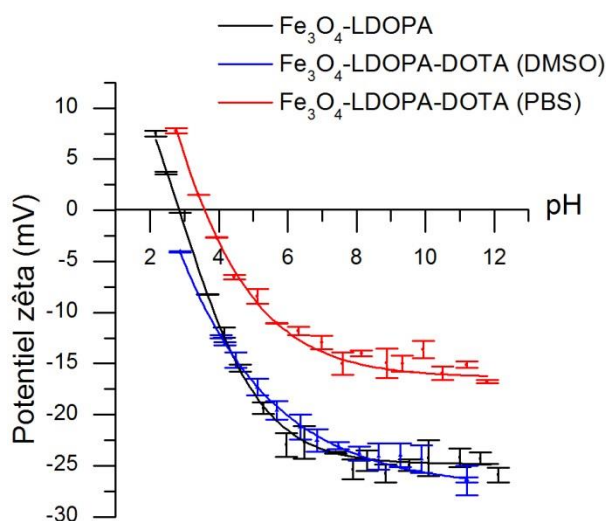


Figure 83 : Courbes zétamétriques des particules Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-LDOPA, Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-LDOPA-DOTA (DMSO) et Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-LDOPA-DOTA (PBS) en présence de NaCl (10<sup>-2</sup>M)

Les mesures de tailles hydrodynamiques traduisent aussi une évolution en fonction des milieux de greffage (PBS ou DMSO) (Figure 84). Une fois que les macrocycles DOTA sont greffés à la surface des nanoparticules, une augmentation de la taille hydrodynamiques est observée quels que soient le milieu de greffage et le milieu de mesure. En effet, lorsque les suspensions sont en milieu NaCl, la taille des particules passe de 106 ± 2 nm (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-LDOPA) à 178 ± 1 nm (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-LDOPA-DOTA (PBS)). Elle passe de 136 ± 21 nm (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-LDOPA) à 212 ± 3 nm (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-LDOPA-DOTA (PBS)) en milieu PBS (1x). L'augmentation de la sphère hydrodynamique est liée à la présence importante de molécules DOTA à la surface des nanoparticules. Cependant, lorsque les suspensions sont en milieu PBS (1x), la taille hydrodynamique mesurée est plus importante que celle observée en milieu salin. Les particules sont susceptibles de former plus facilement des agglomérats à cause de la présence de nombreuses espèces ioniques en milieu PBS.

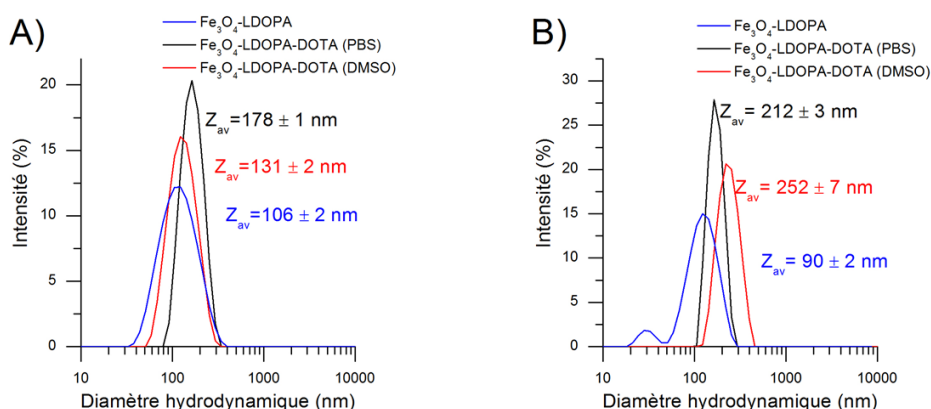


Figure 84 : Courbes DLS des particules Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-LDOPA, Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-LDOPA-DOTA (DMSO) et Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-LDOPA-DOTA (PBS) obtenues a) en milieu salin (10<sup>-2</sup>M NaCl) et b) en milieu PBS 1x



Le potentiel  $\zeta$  à pH physiologique ayant diminué, il n'assure plus une répulsion électrostatique suffisante pour assurer la conservation de la taille hydrodynamique des nanoparticules avant greffage.

Dans ce paragraphe, il a été montré que les macrocycles sont présents à la surface des nanoparticules. Il est important de vérifier que les macrocycles greffés possèdent toujours leur affinité pour le radioélément. Pour cela, des tests de radiomarquages avec du  $^{64}\text{Cu}$  sont réalisés sur chacun des échantillons.

### 3.2.1.4 Premiers tests de complexations avec le cuivre 64 ( $^{64}\text{Cu}$ )

Des tests de radiomarquages avec le cuivre 64 ont été réalisés sur les deux échantillons de nanoparticules afin de tester l'aptitude du macrocycle greffé à complexer le cuivre radioactif. Les conditions de radiomarquage se déroulent en tampon acétate d'ammonium à pH = 5,6 avec du  $^{64}\text{CuCl}_2$  à 37°C à l'aide d'un thermomixeur. Après l'incubation, des calculs de rendement de marquage sont effectués sous chromatographie instantanée sur couche mince (iTLC : instant Thin Layer Chromatography). La solution est déposée et éluée avec un tampon de citrate de sodium  $\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7$  à 0,1M à pH = 5 (pour la phase mobile en chromatographie) et l'activité spécifique engagée est de  $5 \text{ MBq} \cdot \mu\text{mol}^{-1}_{\text{Fe}}$ . Aucun quench à l'EDTA (Éthylène Diamine Tétra-Acétique)\* n'est réalisé.

Les résultats iTLC avant purification sont exposés en Figure 85. Cette technique est couramment employée dans la détermination de la pureté et de la stabilité radiochimique des nanoparticules radiomarquées.<sup>307</sup>

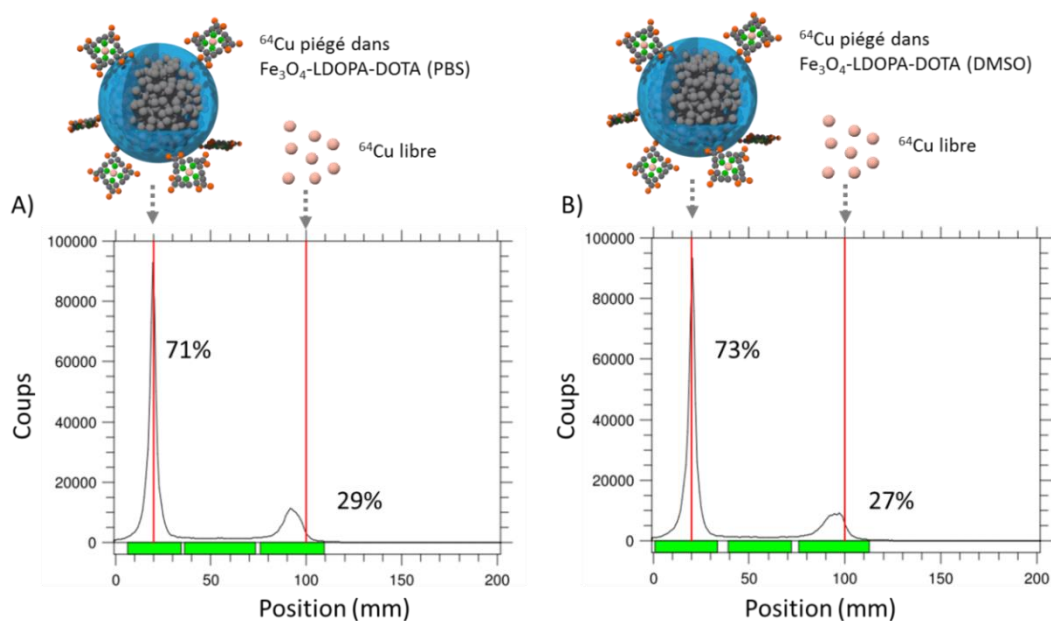


Figure 85 : iTLC des suspensions de A)  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -LDOPA-DOTA (PBS) et B)  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -LDOPA-DOTA (DMSO) radiomarquées au  $^{64}\text{Cu}$

Les deux échantillons marqués montrent que la majeure partie de la radioactivité est restée sur le point de dépôt alors qu'une partie a migré vers le front de solvant. La première région (zone de dépôt)

\* Quench : stopper la réaction d'incorporation du cuivre

représente la proportion de cuivre engagée qui est restée piégée à l'intérieur des macrocycles alors que la deuxième région (vers 100 mm) représente le cuivre libre. La zone entre le point de dépôt et le front de solvant est un peu plus bruitée en raison du fait que le quenching à l'EDTA n'a pas été réalisée. Ainsi, 71% et 73% du cuivre sont complexés par le DOTA sur les échantillons  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-LDOPA-DOTA}$  (PBS) et  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-LDOPA-DOTA}$  (DMSO). Ces valeurs sont très satisfaisantes pour des applications en TEP et du même ordre de grandeur que d'autres études.<sup>245</sup>

### 3.2.1.5 Mesures $r_1$ et $r_2$ en IRM

Les relaxivités  $r_1$  et  $r_2$  des nanoparticules  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-LDOPA-DOTA}$  (DMSO) sont mesurées à partir de fantômes de gel d'acrylamide contenant les nanoparticules (Figure 86).

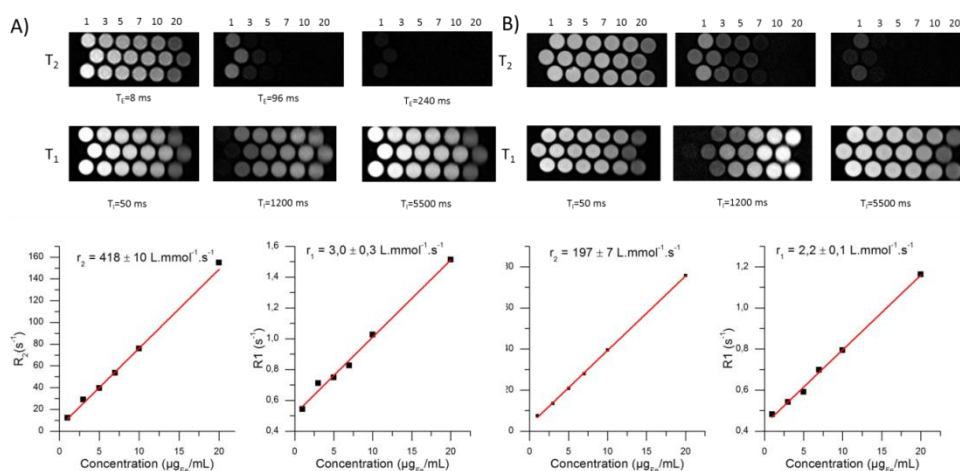


Figure 86 : Images pondérées en T<sub>1</sub> et T<sub>2</sub> des nanoparticules et courbes R<sub>2</sub>(s<sup>-1</sup>) en fonction de la concentration en fer (µg<sub>Fe</sub>/mL) A)  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-LDOPA}$  et B)  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-LDOPA-DOTA}$  déterminées à partir d'un appareil clinique IRM (3T)

Une fois les macrocycles présents sur la surface des nanoparticules, une diminution importante de la relaxivité  $r_2$  est observée. Elle passe en effet de  $418 \pm 10$  ( $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-LDOPA}$ ) à  $163 \pm 10 \text{ L}\cdot\text{mmol}_{\text{Fe}}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$  ( $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-LDOPA-DOTA}$  (DMSO)), chutant ainsi d'un facteur 2,5. Cependant, cette valeur de  $r_2$  pour les nanoparticules  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-LDOPA-DOTA}$  (DMSO) est du même ordre de grandeur que d'autres nanoparticules d'oxydes de fer développées comme agent de contraste IRM.<sup>302</sup>

Il en est de même pour la relaxivité  $r_1$ . Elle se retrouve diminuée d'un facteur 2,3. Elle passe ainsi de  $3,0 \pm 0,3$  ( $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-LDOPA}$ ) à  $1,3 \pm 0,3 \text{ L}\cdot\text{mmol}_{\text{Fe}}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$  ( $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-LDOPA-DOTA}$  (DMSO)). La nouvelle couche organique augmente la distance interparticulaire conduisant à une diminution des interactions magnétiques dipolaires.

A temps d'écho équivalent, les images pondérées en T<sub>2</sub> indiquent un contraste négatif moins prononcé dans ce dernier cas. L'accès des molécules d'eau à la nanoparticule est plus restreint que dans le cas des nanoparticules modifiées par le PEG<sub>2000</sub> ce qui est assez surprenant vu les fonctions acides carboxyliques du DOTA (§ 3.1.7). Cependant, vu les valeurs de  $r_2$  mesurées et les taux de radiomarquage, ce nouvel agent est donc adapté pour une utilisation en IRM et en TEP.



### 3.2.1.6 Conclusion

Les vibrations caractéristiques du macrocycle DOTA en IR, les pertes de masses importantes en ATG et les évolutions des différentes contributions relatives à la molécule DOTA en XPS montrent que les greffages dans les deux milieux (PBS et DMSO) de cette dernière sur les nanoparticules Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-LDOPA ont eu lieu. Le protocole de greffage faisant intervenir le tampon PBS semble plus approprié (quantité de DOTA à la surface des nanoparticules plus importante en ATG) même si *a priori* au départ, les conditions de pH ne sont pas favorables vis à vis du pKa de l'amine de la LDOPA. Ces premiers résultats très prometteurs et encourageant permettent la transposition des protocoles établis pour le greffage des macrocycles DOTA vers le greffage des macrocycles NODAGA.

## 3.2.2 Conception d'une nanosonde bimodale pour l'imagerie IRM/TEP de type Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-LDOPA-NODAGA-<sup>64</sup>Cu

Pour cette étude, le macrocycle choisi est le NODAGA-NHS. Pour rappel, selon la littérature, le NODAGA est un macrocycle montrant une très bonne stabilité *in vivo* à complexer le cuivre 64 (<sup>64</sup>Cu) (§ 1.4.3.5.3).

### 3.2.2.1 Matériels et protocoles

#### 3.2.2.1.1 Matériels

Contrairement au greffage des macrocycles DOTA sur les nanoparticules d'oxydes de fer, une suspension de nanoparticules de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-LDOPA (n'ayant subie aucune étape de lyophilisation) est utilisée pour éviter la formation d'agglomérats lors de l'étape de lyophilisation. Cela permet d'avoir des nanoparticules mieux dispersées. Pour réaliser les greffages, une suspension de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-LDOPA synthétisée à partir du dispositif hydrothermal (150°C, 25MPa, 80 mL/min) obtenue selon le run 1 ou une suspension de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-LDOPA-PEG<sub>2000</sub> avec du NODAGA-NHS fourni par l'ICMUB et CheMatech sont utilisés. Du PBS 1M (Phosphate Buffered Saline de Fisher Bioreagents) et du DMSO (Sigma BioReagent, ≥99.9%) sont employés comme solvants.

#### 3.2.2.1.2 Protocoles

- Protocole des nanoparticules Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-LDOPA-NODAGA :

Deux types de greffage Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-LDOPA-NODAGA ont été réalisés. L'un est réalisé en milieu PBS (1x) et l'autre dans un milieu DMSO afin de comparer ces milieux de la même manière que pour les synthèses effectuées avec le DOTA-NHS (Figure 87-A).

La première fonctionnalisation a lieu en milieu PBS (1M) à pH = 7,4. 2,0.10<sup>-4</sup> mol de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> (4,3.10<sup>-5</sup> mol de LDOPA) sont mélangés à 5,0.10<sup>-5</sup> mol de NODAGA-NHS (un TFA et un HPF<sub>6</sub> compris) durant 4h.\* Le tout est placé sous agitation magnétique. Un ajout de base NaOH est nécessaire pour stabiliser le pH à 7,4. La suspension est ultrafiltrée (Amicon® UltraCel 30 KDa) puis une partie est lyophilisée pour caractériser l'échantillon (sauf caractérisations DLS et radiomarquage).

---

\* Compte tenu des résultats obtenus avec le DOTA (greffage suffisant et hydrolyse possible du groupement NHS du DOTA au cours de la synthèse) un ratio molaire LDOPA:NODAGA à l'équivalence est sélectionné.

La deuxième fonctionnalisation se déroule quant à elle en milieu DMSO.  $1,0 \cdot 10^{-4}$  mol de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  ( $2,2 \cdot 10^{-5}$  mol de LDOPA) sont ajoutées au solvant ainsi que  $2,6 \cdot 10^{-5}$  mol de NODAGA-NHS (avec un TFA et un  $\text{HPF}_6$  compris). Pour comparaison, le ratio molaire LDOPA:NODAGA-NHS est identique à celui défini précédemment. Afin d'effectuer le greffage en milieu DMSO ( $V = 10$  mL), le passage par l'état de poudre  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -LDOPA a été nécessaire pour éliminer l'eau. La suspension est agitée durant 4 heures puis ultrafiltrée (Amicon® UltraCel 30 KDa) puis une partie est lyophilisée (sauf caractérisations DLS et radiomarquage).

- Protocole des nanoparticules  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -LDOPA-PEG<sub>2000</sub>-NODAGA :

Le greffage du NODAGA-NHS sur des particules  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -LDOPA-PEG<sub>2000</sub> se déroule selon le protocole suivant :  $1,6 \cdot 10^{-4}$  mol de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  (recouvertes de  $3,7 \cdot 10^{-5}$  mol de LDOPA et  $4,2 \cdot 10^{-7}$  mol de PEG<sub>2000</sub>) sont introduites dans du PBS (1M) avec du NODAGA-NHS ( $5,0 \cdot 10^{-5}$  mol) durant 4 heures sous agitation magnétique (Figure 87-B). Le ratio molaire LDOPA:NODAGA-NHS choisi est plus important à cause de la présence de PEG susceptible de diminuer l'accès du NODAGA-NHS aux groupements amines de la LDOPA. La suspension est ultrafiltrée (Amicon® UltraCel 30 KDa) puis lyophilisée (sauf caractérisations DLS et radiomarquage).

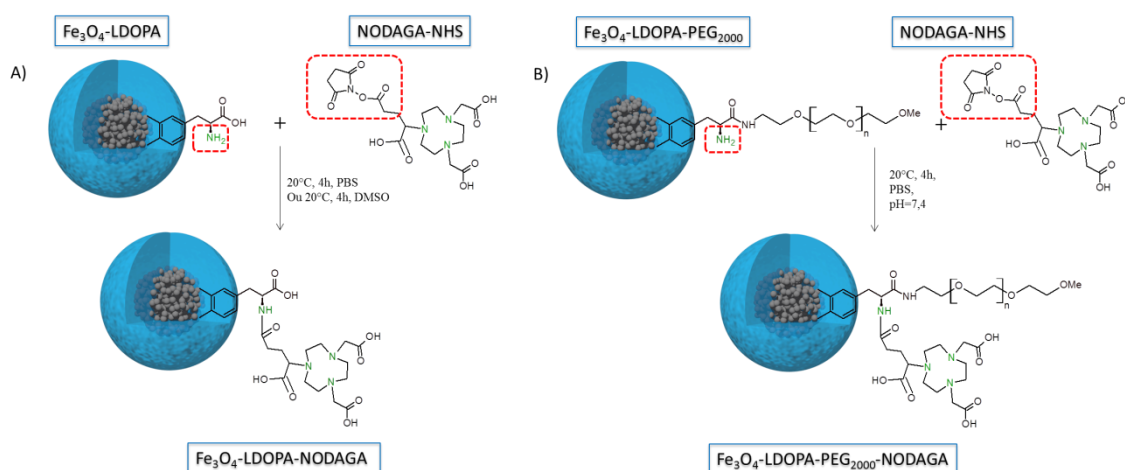


Figure 87 : Protocoles de préparation des nanoparticules a)  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -LDOPA-NODAGA et b)  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -LDOPA-PEG<sub>2000</sub>-NODAGA

### 3.2.2.2 Validation du greffage

Les échantillons purifiés sont analysés par spectroscopie IR et XPS ainsi que par DLS, zétamétrie, XPS et ATG dans l'objectif de vérifier si les macrocycles sont présents à la surface des nanoparticules.

Par spectroscopie infrarouge (Figure 88), les vibrations associées aux groupements  $-\text{CH}_2$  (étirements symétriques et asymétriques) sont présentes à 2960, 2920 et 2860  $\text{cm}^{-1}$ .<sup>297</sup> A 1580  $\text{cm}^{-1}$ , les vibrations des carboxylates  $\text{COO}^-$  apparaissent.<sup>297</sup> Les amines tertiaires et les groupements C-O très présents dans les macrocycles NODAGA apparaissent dans la région comprise entre 1360 et 1050  $\text{cm}^{-1}$ .<sup>154, 306</sup> Les vibrations OH et NH sont respectivement visibles à 3400 et 3240  $\text{cm}^{-1}$ .<sup>288</sup> La spectroscopie infrarouge montre bien la présence de NODAGA dans les échantillons.

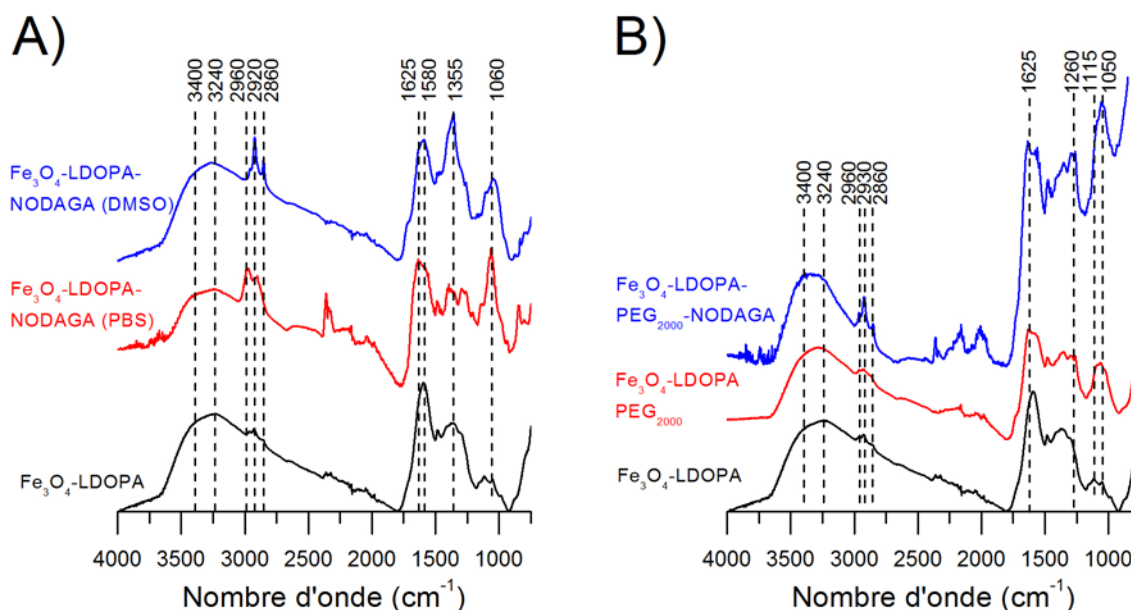


Figure 88 : Spectres IR en mode ATR des poudres A)  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -LDOPA,  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -LDOPA-NODAGA (PBS) et  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -LDOPA-NODAGA (DMSO) et B)  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -LDOPA,  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -LDOPA-PEG<sub>2000</sub> et  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -LDOPA-PEG<sub>2000</sub>-NODAGA (PBS)

L'ATG tend aussi à prouver la présence de ces nouvelles molécules organiques à la surface des nanoparticules  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -LDOPA (Figure 89). En effet, une perte de masse plus importante est observée de l'ordre de 6% pour les échantillons  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -LDOPA-NODAGA (PBS) et de 29% pour les échantillons  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -LDOPA-NODAGA (DMSO) par rapport à l'échantillon  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -LDOPA et de 3% pour les poudres  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -LDOPA-PEG<sub>2000</sub>-NODAGA par rapport à  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -LDOPA-PEG<sub>2000</sub>.

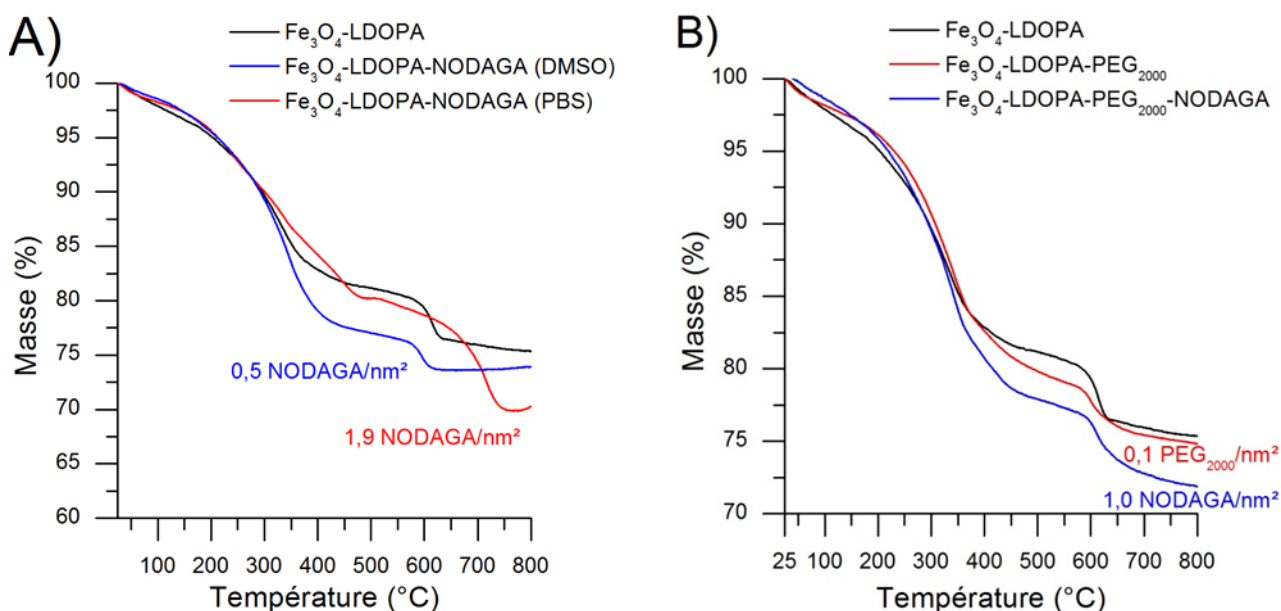


Figure 89 : ATG des courbes A)  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -LDOPA,  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -LDOPA-NODAGA (PBS) et  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -LDOPA-NODAGA (DMSO) et B)  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -LDOPA,  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -LDOPA-PEG<sub>2000</sub> et  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -LDOPA-PEG<sub>2000</sub>-NODAGA

L'analyse XPS tend aussi à corroborer les précédentes observations (Tableau 17). Une fois les molécules de NODAGA greffées sur les nanoparticules  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -LDOPA, une augmentation de la concentration atomique en carbone et une diminution de la concentration atomique en fer sont observées.

La concentration atomique en fer (Fe2p) passe ainsi de 14% ( $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-LDOPA}$ ) à 13% ( $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-LDOPA-NODAGA}$  (PBS)) et 10% ( $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-LDOPA-NODAGA}$  (DMSO)). De même, cette concentration passe de 15% ( $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-LDOPA-PEG}_{2000}$ ) à 14% ( $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-LDOPA-PEG}_{2000}\text{-NODAGA}$ ). Concernant la concentration atomique en carbone (C1s), dans le cas où la fonctionnalisation s'est déroulée en milieu PBS, une diminution par rapport à l'échantillon de référence est notée (41 % pour les nanoparticules  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-LDOPA}$  et 27% pour les nanoparticules  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-LDOPA-NODAGA}$  (PBS)). Aucune explication sur cette observation ne peut être fournie. Remarquons cependant que dans ce cas, l'ion sodium apparaît en plus grande proportion. Cet ion est connu pour former des complexes stables avec les macrocycles comme le DOTA.<sup>308</sup> Ainsi, il est possible qu'une complexation de l'ion sodium issu de la base NaOH a eu lieu avec le NODAGA au cours de l'étape de greffage modifiant ainsi les rapports de concentrations atomiques déterminées par XPS. En milieu DMSO (sans la présence de sodium), la concentration atomique en C1s augmente considérablement passant ainsi à 53%. Aucune évolution de cette concentration en carbone n'est observée pour les échantillons  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-LDOPA-PEG}_{2000}\text{-NODAGA}$  et  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-LDOPA-PEG}_{2000}$ . Du phosphore est retrouvé sur les nanoparticules  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-LDOPA-NODAGA}$  (PBS) et  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-LDOPA-PEG}_{2000}\text{-NODAGA}$  ainsi que du fluor sur les nanoparticules  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-LDOPA-PEG}_{2000}\text{-NODAGA}$ . Ces éléments résultent de la présence initiale du TFA et du  $\text{HPF}_6$  dans le NODAGA-NHS : ce sont des résidus de la synthèse initiale du macrocycle. Aucune évolution de la concentration atomique en azote n'est notée. Ainsi, les évolutions des concentrations atomiques en carbone, fer, phosphore et fluor confirment la présence des macrocycles une fois le greffage réalisé.

Echantillon	Concentrations atomiques (%)							Ratio C1s/Fe2p
	C1s	O1s	N1s	Fe2p	Na1s	F1s	P2p	
$\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-LDOPA}$	41	39	5	14	1	-	-	2,9
$\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-LDOPA-NODAGA}$ (PBS)	27	40	3	13	11	2	2	2,0
$\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-LDOPA-NODAGA}$ (DMSO)	53	31	6	10	-	-	-	5,3
$\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-LDOPA-PEG}_{2000}$ (PBS)	39	41	5	15	-	-	-	2,6
$\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-LDOPA-PEG}_{2000}\text{-NODAGA}$	38	41	5	14	1	-	1	2,7

Tableau 17 : Concentrations atomiques des poudres  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-LDOPA}$ ,  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-LDOPA-NODAGA}$  (PBS),  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-LDOPA-NODAGA}$  (DMSO),  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-LDOPA-PEG}_{2000}$  et  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-LDOPA-PEG}_{2000}\text{-NODAGA}$

Des évolutions des contributions N1s et C1s sont aussi observées lorsque les nanoparticules sont fonctionnalisées par le macrocycle NODAGA. En effet, l'énergie de liaison de la contribution COH/CN de la région C1s est décalée vers les hautes énergies. Elle passe respectivement de 285,7 eV à 286,0 eV pour les échantillons  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-LDOPA}$  et  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-LDOPA-NODAGA}$  (PBS) (Figure 90). Par ailleurs, la proportion relative à cette contribution augmente passant ainsi de 40% à 49% et 55% pour les échantillons  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-LDOPA}$ ,  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-LDOPA-NODAGA}$  (PBS) et  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-LDOPA-NODAGA}$  (DMSO) respectivement (Figure 90). La modification de l'énergie de liaison s'explique par la présence de nombreuses amines tertiaires sur les macrocycles NODAGA. L'environnement électronique est différent de celui des  $\text{NH}_2$  (amine primaire) encore libres ou NH (amine secondaire) de la LDOPA fonctionnalisée. Concernant les échantillons PEGylés fonctionnalisés par le NODAGA en milieu PBS et les nanoparticules  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-LDOPA-NODAGA}$ -(DMSO), aucune évolution de l'énergie de liaison de la contribution COH/CN n'apparaît. La faible quantité greffée dans le cas de ces deux échantillons peut expliquer l'observation précédente (Figure 89) (0,5, 1,0 et 1,9 molécules de NODAGA/nm<sup>2</sup> sont présentes respectivement sur les échantillons

$\text{Fe}_3\text{O}_4$ -LDOPA-NODAGA-(DMSO),  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -LDOPA-PEG<sub>2000</sub>-NODAGA et  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -LDOPA-NODAGA-(PBS)). De même, la concentration relative à la contribution COH/CN diminue passant de 44 à 41% pour les nanoparticules  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -LDOPA-PEG<sub>2000</sub> et  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -LDOPA-PEG<sub>2000</sub>-NODAGA. Dans le cas des échantillons PEGylés la couche de PEG<sub>2000</sub> peut masquer le macrocycle.

Sur l'ensemble des échantillons analysés, aucune évolution de la contribution COOH n'est notée.

Concernant la région N1s, des modifications apparaissent également. Lorsque la molécule organique NODAGA est greffée, une nouvelle contribution à 398,2 eV liée au groupement C-N du macrocycle apparaît sur les nanoparticules  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -LDOPA-NODAGA-(PBS). Aucune évolution de cette dernière sur les nanoparticules  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -LDOPA-PEG<sub>2000</sub>-NODAGA n'est notée.

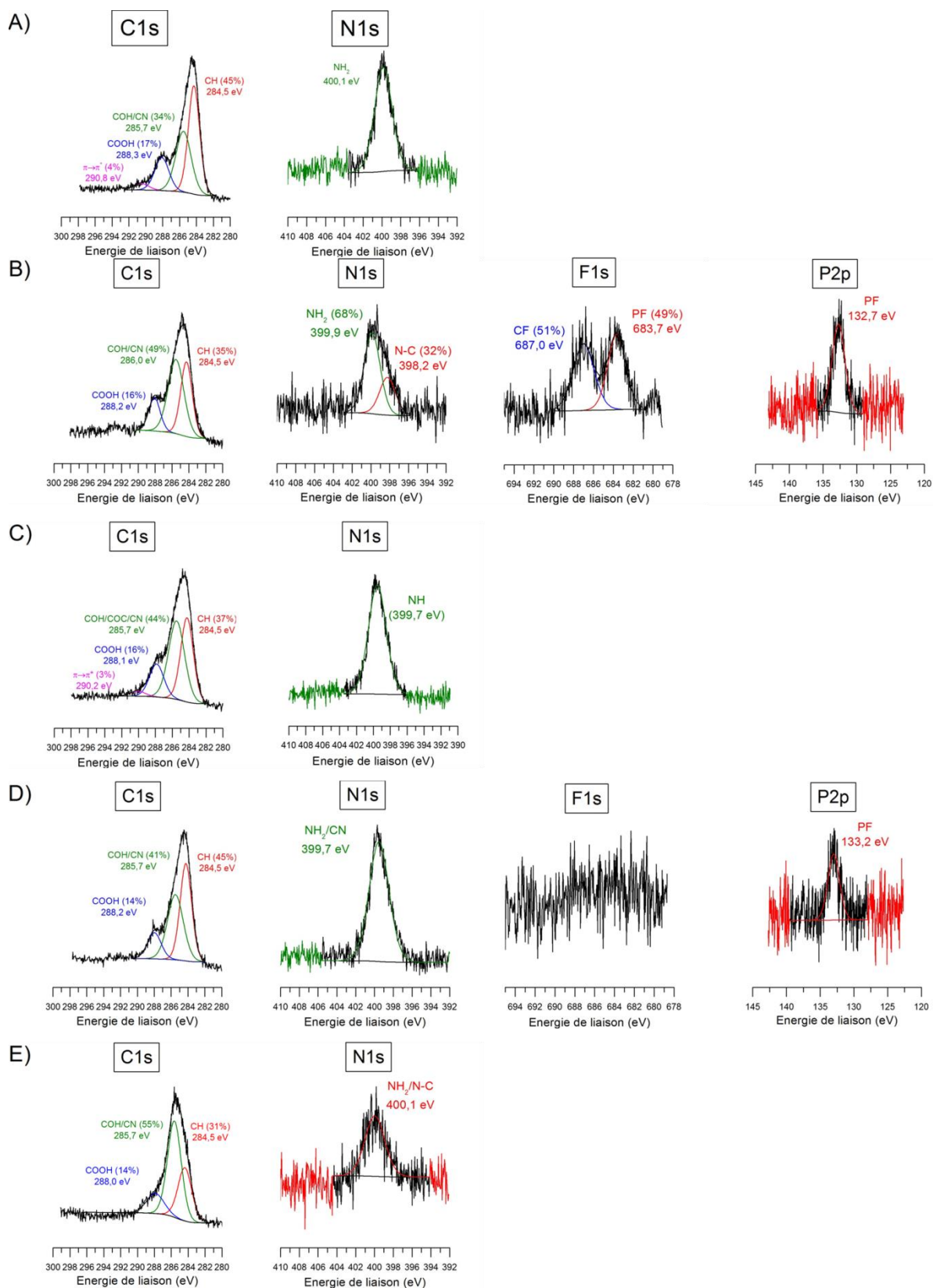


Figure 90 : Contributions C1s, N1s, F1s, P2p des poudres A) Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-LDOPA, B) Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-LDOPA-NODAGA (PBS) C) Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-LDOPA-PEG<sub>2000</sub>, D) Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-LDOPA-PEG<sub>2000</sub>-NODAGA et E) Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-LDOPA-NODAGA (DMSO)



Ainsi, les nouvelles vibrations en infrarouge, les pertes des masses plus importantes en ATG et les évolutions des régions C1s et N1s en XPS confirment la présence des macrocycles NODAGA à la surface des nanoparticules.

### 3.2.2.3 Quantité de macrocycle greffée

A l'aide de l'XPS et de l'ATG, la quantité de macrocycle greffée à la surface des nanoparticules est évaluée. En XPS (Tableau 17), le rapport des concentrations atomiques C1s/Fe2p augmente lorsque le greffage a eu lieu. En effet, ce rapport passe de 2,9 à 5,3 pour les nanoparticules Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-LDOPA et Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-LDOPA-NODAGA (DMSO). Il en est de même pour les poudres Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-LDOPA-PEG<sub>2000</sub>-NODAGA (2,7) par rapport aux poudres Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-LDOPA-PEG<sub>2000</sub> (2,6). Ces résultats sont corroborés par ATG. En effet, 1,9, 1,0 et 0,5 NODAGA/nm<sup>2</sup> sont retrouvées respectivement sur la surface des nanoparticules Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-LDOPA-NODAGA-(PBS), Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-LDOPA-PEG<sub>2000</sub>-NODAGA et Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-LDOPA-NODAGA-(DMSO).

### 3.2.2.4 Stabilité des nanoparticules

Afin d'évaluer la stabilité des nanoparticules dans différents milieux, des mesures zétamétriques et DLS ont été réalisées (Figure 91 et Figure 92).

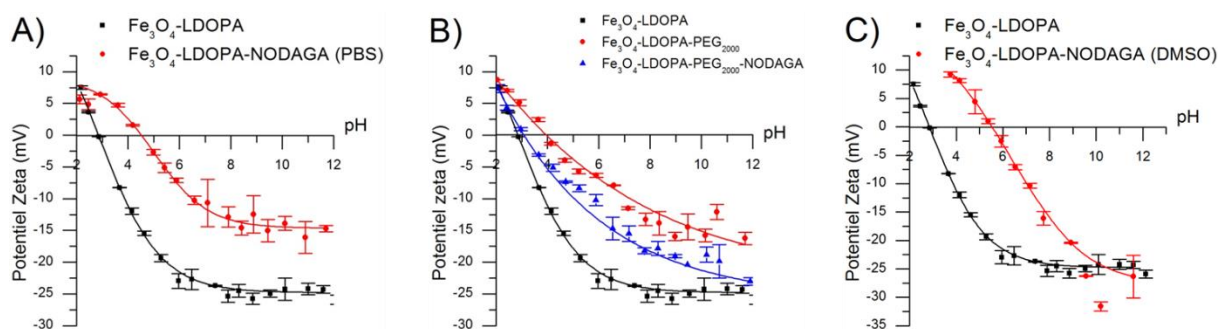


Figure 91 : Courbes zétamétriques des échantillons A) Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-LDOPA et Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-LDOPA-NODAGA (PBS), B) Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-LDOPA, Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-LDOPA-PEG<sub>2000</sub> et Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-LDOPA-PEG<sub>2000</sub>-NODAGA et C) Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-LDOPA et Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-LDOPA-NODAGA (DMSO) dans NaCl (10<sup>-2</sup>M)

Lorsque les nanoparticules Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-LDOPA sont modifiées par les macrocycles, le potentiel  $\zeta$  à pH physiologique diminue en valeur absolue par rapport aux nanoparticules Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-LDOPA. Le potentiel  $\zeta$  passe en effet de -25 mV à -13 mV. Une fois greffé sur les nanoparticules PEGylées, la présence du NODAGA tend quant à lui à augmenter en valeur absolue le potentiel  $\zeta$  passant ainsi de -11 mV à -17 mV pour les échantillons Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-LDOPA-PEG<sub>2000</sub> et Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-LDOPA-PEG<sub>2000</sub>-NODAGA respectivement. Ce potentiel se situe entre celui des nanoparticules Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-LDOPA et Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-LDOPA-PEG<sub>2000</sub>. Les groupements carboxylates diminuent l'efficacité du PEG<sub>2000</sub> d'où la hausse du potentiel  $\zeta$  par rapport aux particules PEGylées. Les groupements C-N du macrocycle peuvent participer à la diminution du potentiel  $\zeta$  expliquant ainsi le fait que le potentiel  $\zeta$  se situe en les deux échantillons de référence.

Le potentiel  $\zeta$  plus faible pour les nanoparticules Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-LDOPA-NODAGA (PBS) que celui des nanoparticules Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-LDOPA peut potentiellement induire une répulsion électrostatique moins importante que dans le cas des nanoparticules non fonctionnalisées par le NODAGA. C'est pour cette raison qu'il est intéressant de vérifier leur stabilité en milieux PBS (1M) et NaCl (10<sup>-2</sup>M) (Figure 92).

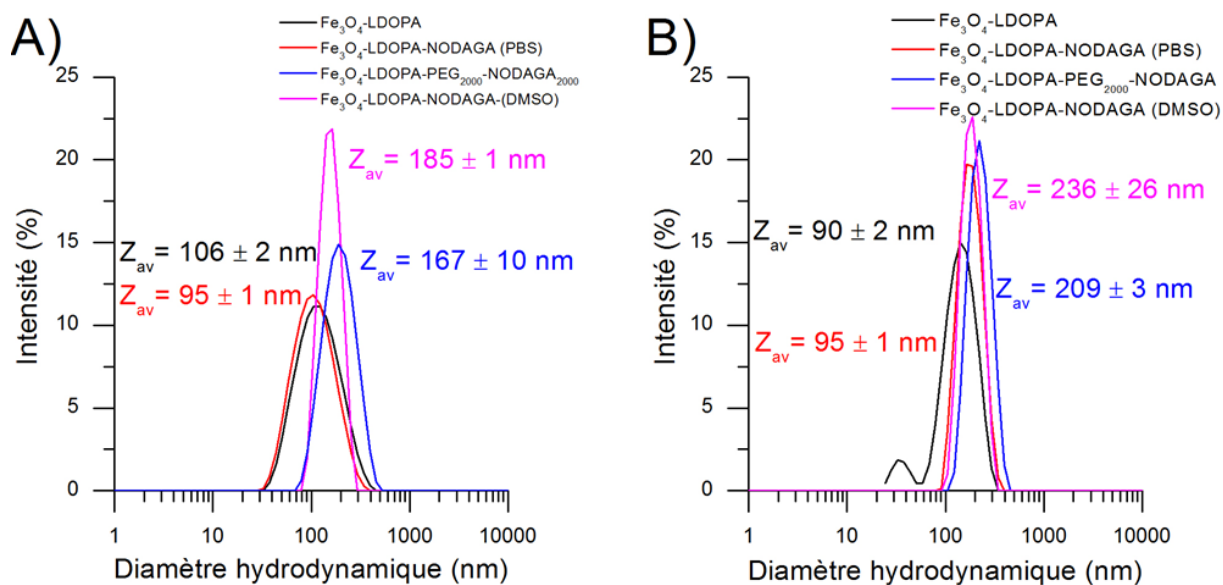


Figure 92 : Courbes DLS des échantillons  $Fe_3O_4$ -LDOPA,  $Fe_3O_4$ -LDOPA-NODAGA (PBS),  $Fe_3O_4$ -LDOPA-PEG<sub>2000</sub>-NODAGA et  $Fe_3O_4$ -LDOPA-NODAGA (DMSO) A) en milieu NaCl ( $10^{-2}M$ ) et B) en milieu PBS 1M

Une fois le NODAGA greffé à la surface des nanoparticules  $Fe_3O_4$ -LDOPA-NODAGA-(DMSO) et  $Fe_3O_4$ -LDOPA-PEG<sub>2000</sub>-NODAGA (PBS), le diamètre hydrodynamique en milieu PBS (1M) ( $185 \pm 1$  nm et  $167 \pm 10$  nm respectivement) et NaCl ( $10^{-2}M$ ) ( $236 \pm 26$  nm et  $209 \pm 3$  nm) augmente drastiquement. Tout comme avec les macrocycles DOTA (§ 3.2.1.3), la diminution du potentiel  $\zeta$  contribue à augmenter la taille hydrodynamique des nanoparticules car la répulsion électrostatique n'est plus satisfaisante pour éviter l'agglomération des nanoparticules entre elles. Cet état s'observe sur les nanoparticules dont le greffage s'est déroulé en solvant DMSO. L'ajout combiné des molécules de PEG<sub>2000</sub> (longs) et des macrocycles contribue à accroître cette taille mais cette dernière reste voisine de 200 nm. L'échantillon  $Fe_3O_4$ -LDOPA-NODAGA synthétisé en milieu PBS est le plus adapté pour une application biologique en raison de sa faible taille hydrodynamique ( $95 \pm 1$  nm). Les images MET (Figure 93) montrent une dispersion des agglomérats avec des tailles d'agglomérats en accord avec les résultats DLS.



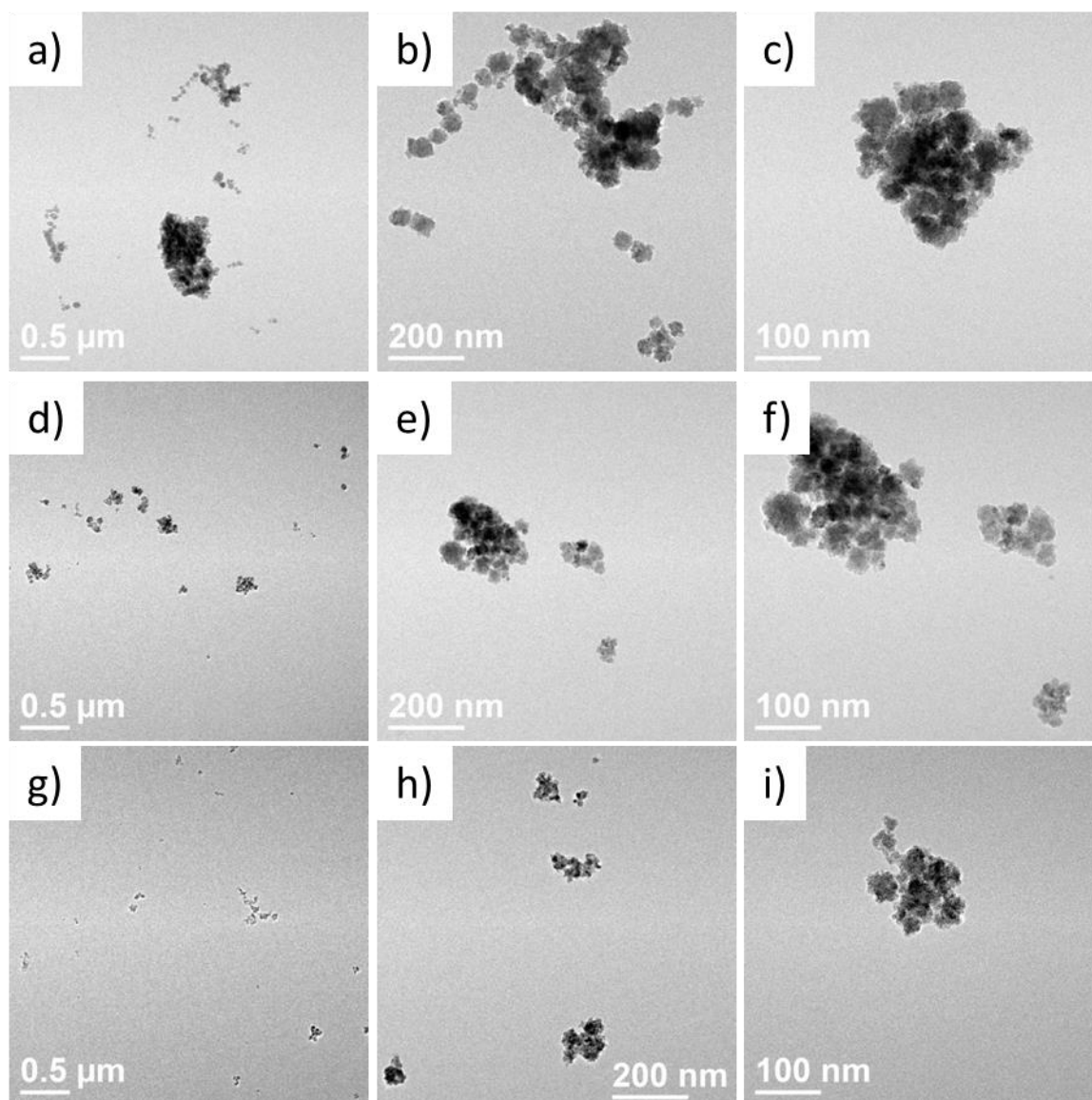


Figure 93 : Images MET des nanoparticules (a-c)  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -LDOPA-NODAGA (PBS), (d-f)  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -LDOPA-PEG<sub>2000</sub>-NODAGA et (g-i)  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -LDOPA-NODAGA (DMSO)

Après avoir prouvé la présence des agents organiques à la surface des nanoparticules, des tests de radiomarquages avec du  $^{64}\text{Cu}$  sont réalisés sur chacun des échantillons.

### 3.2.2.5 Radiomarquages au $^{64}\text{Cu}$ des nanoparticules $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -LDOPA-NODAGA (DMSO et PBS) et $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -LDOPA-PEG<sub>2000</sub>-NODAGA

Les tests de complexation des nanoparticules au  $^{64}\text{Cu}$  sont menés sur chacun des échantillons dans le but de vérifier si les nanoparticules sont en mesure d'incorporer la quantité de cuivre radioactif engagée. Les complexations sont effectuées en tampon acétate d'ammonium à pH = 5,6 en présence de chlorure de cuivre radioactif ( $^{64}\text{CuCl}_2$ ) avec une activité spécifique engagée de 5MBq. L'incubation s'effectue durant 45 min à 37°C (chauffage assuré par un thermomixeur). Un quench à l'EDTA\* 50 mM est

\*Quench : stopper la réaction d'incorporation du cuivre

effectué. L'éluant utilisé pour les mesures ITLC est un tampon de citrate de sodium à pH = 5 (0,1M). Les résultats sont présentés (Figure 94).

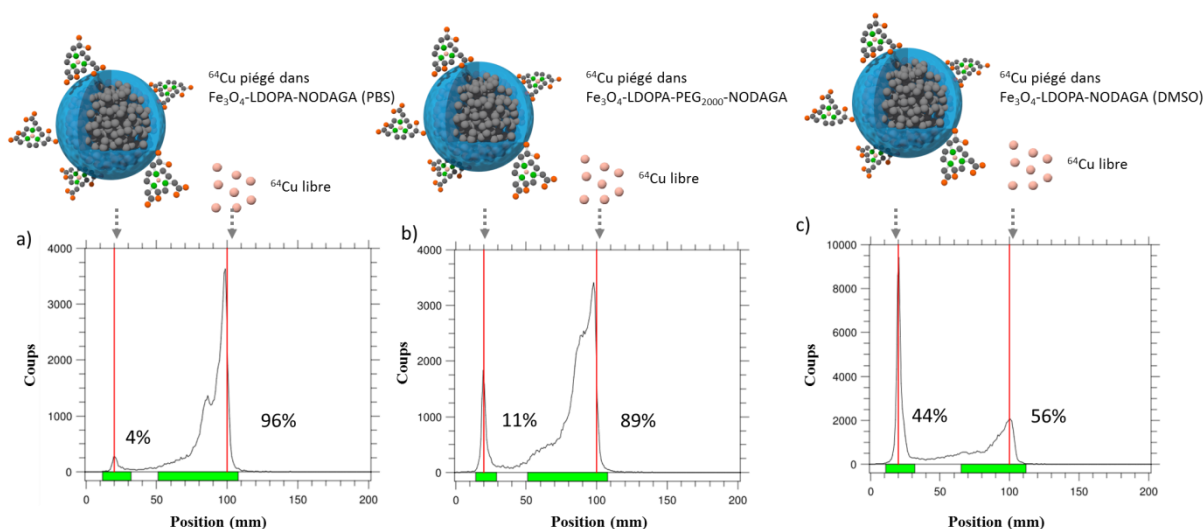


Figure 94 : ITLC des solutions de a)  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -LDOPA-NODAGA (PBS), b)  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -LDOPA-PEG<sub>2000</sub>-NODAGA et c)  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -LDOPA-NODAGA (DMSO) radiomarquées au  $^{64}\text{Cu}$

Les rendements de marquages sont très faibles sur les échantillons  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -LDOPA-NODAGA (PBS) et  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -LDOPA-PEG<sub>2000</sub>-NODAGA. En effet, seulement 4% et 11% de  $^{64}\text{Cu}$  sont incorporés par les macrocycles. Cependant les nanoparticules  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -LDOPA-NODAGA (DMSO) ont un taux d'incorporation bien supérieur aux deux échantillons (44%). Cette différence de quantité peut s'expliquer par le fait que les échantillons  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -LDOPA-NODAGA (PBS) et  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -LDOPA-PEG<sub>2000</sub>-NODAGA sont conservés depuis la synthèse hydrothermale en solution alors que l'échantillon réalisé en milieu DMSO a été stocké sous forme de poudre entre l'étape de synthèse hydrothermale et le greffage du macrocycle. Il est possible que certains catéchols contribuent à relâcher en solution des ions fer (Chapitre 2). Or ces ions sont susceptibles d'être captés par le macrocycle occupant ainsi le centre de coordination et rendant impossible la complexation du cuivre radioactif déjà présent en très faible quantité (de l'ordre du pM). Cette étape de libération d'ions fer a été bloquée en partie quand les échantillons synthétisés en milieu DMSO ont été placés et conservés à l'état de poudre comme dans le cas des synthèses réalisées avec le DOTA où le radiomarquage a bien fonctionné. Ces conditions améliorent l'efficacité de radiomarquage.

### 3.2.2.6 Conclusion

La fonctionnalisation des nanoparticules par le NODAGA en milieux PBS et DMSO est possible. Cependant, lorsque le greffage s'effectue en milieu PBS, l'efficacité du radiomarquage est plus faible que dans le cas où le greffage s'est déroulé en milieu DMSO. Contrairement au cas du DOTA, le stockage des nanoparticules s'est effectué en solution et non pas en poudre pour les synthèses PBS. Ce stockage a pu favoriser la libération d'ion fer qui s'est coordonné avec les macrocycles. Pour éviter ce phénomène une conservation des échantillons en forme de poudre issue des synthèses hydrothermale est préférable et une élimination des ions  $\text{Fe}^{2+}$  préalablement avant greffage est donc préférable. Les prochaines synthèses prendront en considération ces deux étapes pour tenter d'améliorer le radiomarquage.

### 3.2.3 Vers une nanosonde bimodale optimisée pour le radiomarquage du cuivre

Au vu des résultats précédemment obtenus (§ 3.2.2.5), les échantillons  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -LDOPA sont purifiés et lyophilisés pour réaliser ensuite les greffages des macrocycles en milieu DMSO. En plus du NODAGA, le MANOTA-NCS est testé.

#### 3.2.3.1 Matériels et protocoles de synthèse

Des nanoparticules de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -LDOPA à l'état de poudre sont utilisées pour greffer en milieu DMSO (Sigma BioReagent,  $\geq 99.9\%$ ), les NODAGA-NHS et MANOTA-NCS provenant de CheMatech et de l'ICMUB.

Pour préparer les nanoparticules  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -LDOPA-NODAGA,  $4,6 \cdot 10^{-5}$  mol de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  (recouvertes de  $1,0 \cdot 10^{-5}$  mol de LDOPA) et  $4,8 \cdot 10^{-5}$  mol de NODAGA-NHS (un  $\text{HPF}_6$  et un TFA compris) sont introduites dans 8 mL de DMSO\*. Le tout est placé sous agitation de type orbitale durant 4h<sup>†</sup>. Puis la suspension est purifiée par ultrafiltration (Amicon® UltraCel 30 KDa).

Pour les nanoparticules  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -LDOPA-MANOTA,  $1,9 \cdot 10^{-5}$  mol de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  (recouvertes de  $4,3 \cdot 10^{-6}$  mol de LDOPA) sont utilisées. Le volume en DMSO est de 3 mL.  $3,4 \cdot 10^{-6}$  mol de MANOTA-NCS sont introduites<sup>‡</sup>. Le protocole de purification et de synthèse restent identiques. Puis la suspension est lyophilisée.

#### 3.2.3.2 Validation du greffage

En spectroscopie infrarouge, la liaison bidentate à  $1485 \text{ cm}^{-1}$  de la LDOPA avec l'oxyde de fer est toujours présente ainsi que les carboxylates  $\text{COO}^-$  vers  $1600 \text{ cm}^{-1}$  de la LDOPA. Cette vibration coïncide avec les carboxylates des macrocycles NODAGA et MANOTA (Figure 95). De plus, de nouvelles contributions apparaissent. Les vibrations caractéristiques (étirements asymétriques et symétriques) des groupements  $\text{CH}_2$  très présents dans les macrocycles sont obtenues à 2980, 2930 et  $2850 \text{ cm}^{-1}$ .<sup>297</sup> Par ailleurs, à  $1355$  et  $1060 \text{ cm}^{-1}$ , les amines tertiaires et les groupements CO provenant du NODAGA et du MANOTA sont observés. Ces nouvelles vibrations en infrarouge confirment la présence de ces deux molécules à la surface des nanoparticules.

---

\* Compte tenu des résultats non satisfaisants obtenus précédemment avec le NODAGA, un large excès de NODAGA est engagé par rapport à la LDOPA ( $x \sim 5$ )

† Dans un souci continu d'amélioration du protocole, cette agitation a été choisie pour éviter au maximum la formation d'agglomérations susceptibles de se produire sous agitation magnétique préjudiciable pour le greffage des macrocycles

‡ La quantité engagée de MANOTA-NCS est plus faible car très peu de quantité a été fournie sur le moment (difficulté de production)

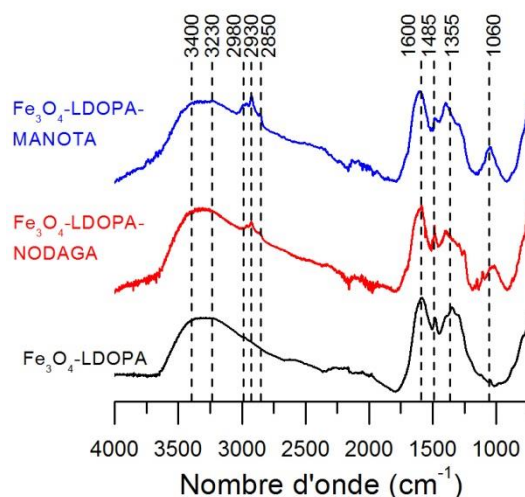


Figure 95 : Spectres IR des poudres  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -LDOPA,  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -LDOPA-NODAGA et  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -LDOPA-MANOTA

### 3.2.3.3 Taille hydrodynamique des nanoparticules synthétisées : vers une optimisation des conditions expérimentales

La taille hydrodynamique des nanoparticules est déterminée par DLS en milieu NaCl ( $10^{-2}\text{M}$ ) et PBS (1x) (Figure 96). Les nanoparticules sont placées aux ultrasons et filtrées pour éliminer les larges agglomérats issus de la synthèse. Les nanoparticules  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -LDOPA-NODAGA et  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -LDOPA-MANOTA, après traitement aux ultrasons (canne à US) et filtration, possèdent respectivement une taille hydrodynamique moyenne de  $85 \pm 1 \text{ nm}$  et  $140 \pm 2 \text{ nm}$  en milieu NaCl ( $10^{-2}\text{M}$ ) et de  $89 \pm 6 \text{ nm}$  et  $98 \pm 1 \text{ nm}$  en milieu PBS 1x. La taille reste du même ordre de grandeur que celles des nanoparticules de départ ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -LDOPA).

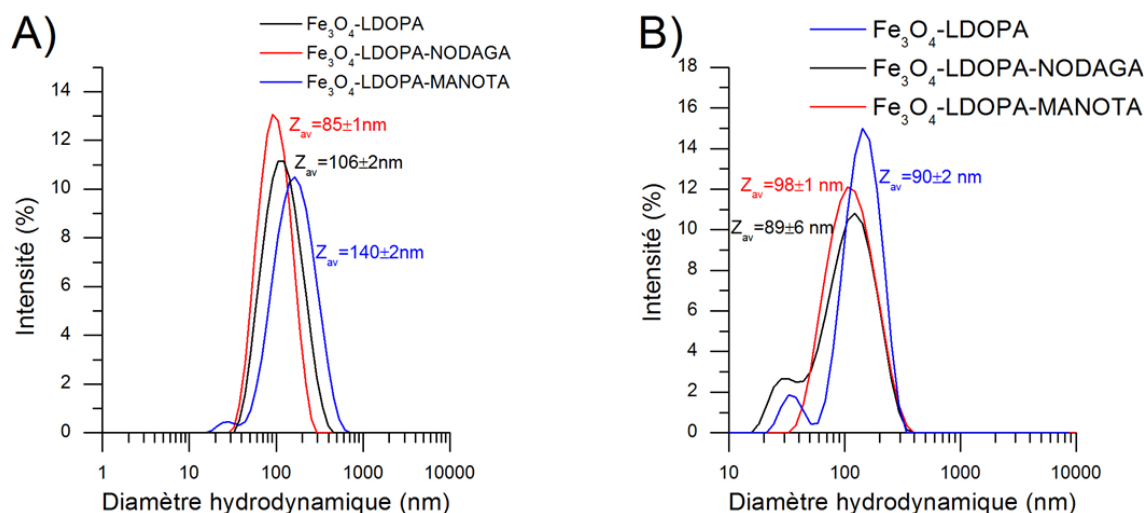


Figure 96 : Courbes DLS des suspensions  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -LDOPA,  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -LDOPA-NODAGA et  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -LDOPA-MANOTA en milieu A) NaCl ( $10^{-2}\text{M}$ ) et B) PBS 1x (échantillons soumis aux ultrasons)

En ayant appliqué des ultrasons et une filtration, il est possible d'avoir une taille hydrodynamique moyenne inférieure à 100 nm une fois les macrocycles présents sur la surface des nanoparticules.

### 3.2.3.4 Radiomarquages au $^{64}\text{Cu}$

Les tests d'incorporation du  $^{64}\text{Cu}$  sur les nanoparticules  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-LDOPA-NODAGA}$  et  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-LDOPA-MANOTA}$  ont été réalisés en tampon acétate d'ammonium à pH = 5,6 avec une activité spécifique en cuivre engagée de 5MBq. Le temps d'incubation est de 45 min à 37°C. Une solution d'EDTA à 50 mM est utilisée pour stopper la réaction. Des mesures ITLC sont réalisées en vue de connaître l'incorporation du radioélément. Après avoir mesuré le taux d'incorporation du radioélément, une étape de purification (purification Amicon® 30 kDa) a été effectuée à la suite des premières mesures très satisfaisantes.

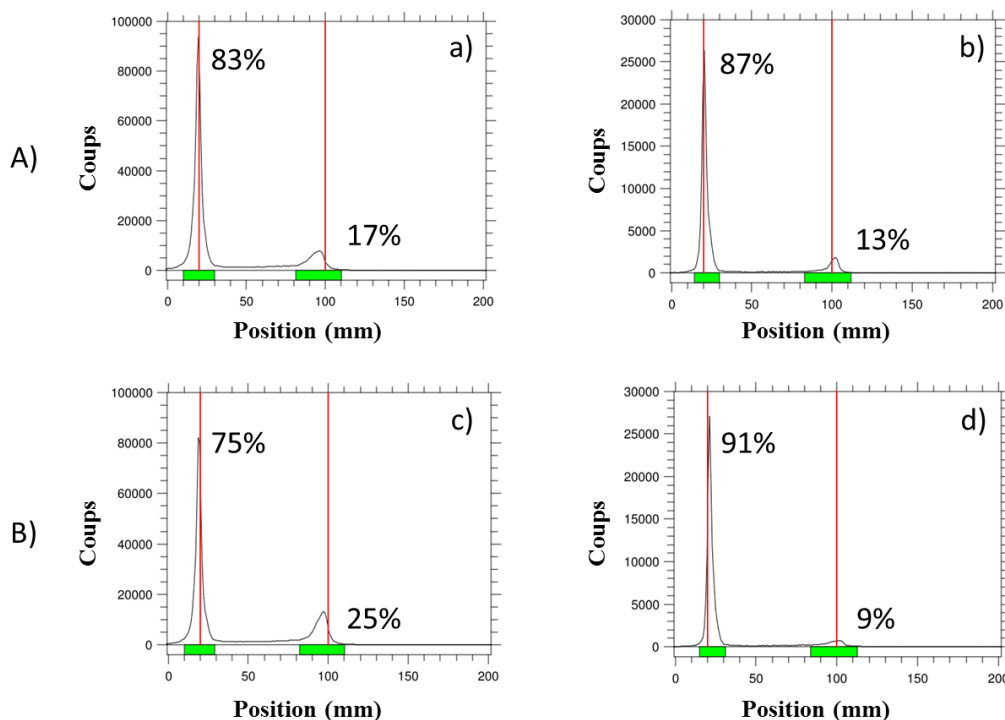


Figure 97 : ITLC des échantillons A)  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-LDOPA-NODAGA}$  a) avant purification et b) après purification et B)  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-LDOPA-MANOTA}$  a) avant purification et b) après purification

Avant l'étape de purification, 83% et 75% de radioéléments sont incorporés par les macrocycles greffés sur les nanoparticules  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-LDOPA-NODAGA}$  et  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-LDOPA-MANOTA}$  respectivement (Figure 97-a et -c). Ces taux d'incorporations sont du même ordre de grandeur que ceux obtenus avec les nanoparticules présentant du DOTA (§ 3.2.1.4) à leur surface et bien supérieurs aux échantillons précédemment analysés (4% pour  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-LDOPA-NODAGA}$  (PBS) et 44% pour  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-LDOPA-NODAGA}$  (DMSO)) (§ 3.2.2.5). Après purification, des taux très élevés de 87% et 91% sont obtenus pour les nanoparticules  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-LDOPA-NODAGA}$  et  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-LDOPA-MANOTA}$  respectivement. Les taux de radiomarquages sont proches de ceux obtenus dans la littérature : (92-98%)<sup>246</sup> sur des macrocycles greffés avec des peptides ou encore meilleurs qu'une autre étude où des anticorps ont été greffés sur les macrocycles (59-71%)<sup>245</sup>. Les deux échantillons présentent un très bon taux de radiomarquage au  $^{64}\text{Cu}$ .

Ainsi, les étapes de purification pour éliminer les ions fer potentiellement présents en suspension et l'étape de lyophilisation ont fortement amélioré l'efficacité de radiomarquage. Ces

nanoparticules  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -LDOPA-NODAGA et  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -LDOPA-MANOTA sont aptes pour une utilisation en imagerie bimodale.

### 3.2.3.5 Mesures $r_1$ et $r_2$

Les mesures de  $r_1$  et  $r_2$  de l'échantillon  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -LDOPA-NODAGA (DMSO) montrent une évolution par rapport à l'échantillon de référence ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -LDOPA) et l'échantillon  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -LDOPA-DOTA (DMSO). En effet, tout comme dans le cas des nanoparticules  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -LDOPA-DOTA (DMSO) ( $r_2 = 163 \pm 10 \text{ L.mmol}_{\text{Fe}}^{-1}.\text{s}^{-1}$  et  $r_1 = 1,3 \pm 0,3 163 \pm 10 \text{ L.mmol}_{\text{Fe}}^{-1}.\text{s}^{-1}$ ), une diminution des relaxivités  $r_1$  et  $r_2$  est observée par rapport aux nanoparticules  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -LDOPA :  $r_2$  est égal à  $197 \pm 7 \text{ L.mmol}_{\text{Fe}}^{-1}.\text{s}^{-1}$  et  $r_1$  est égal à  $2,2 \pm 0,1 \text{ L.mmol}_{\text{Fe}}^{-1}.\text{s}^{-1}$  (Figure 98 et Tableau 18). Le macrocycle réduit l'accès des molécules d'eau à la nanoparticule. De plus, les images pondérées en  $T_2$  confirment cette tendance. Aux mêmes temps d'écho et de concentrations, le contraste négatif des nanoparticules  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -LDOPA-NODAGA est moins important que celui des nanoparticules  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -LDOPA. Cependant, dans le cas des nanoparticules modifiées par le NODAGA, les valeurs de  $r_2$  et  $r_1$  sont supérieures à celles observées dans le cas des nanoparticules modifiées par le DOTA.

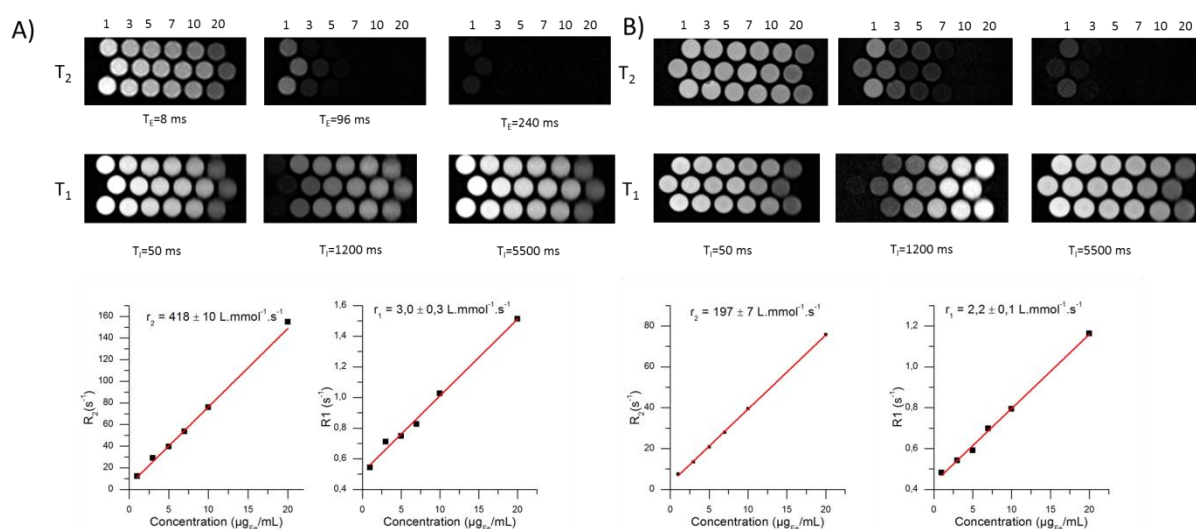


Figure 98 : Images pondérés en  $T_1$  et  $T_2$  des nanoparticules et courbes  $R_2(\text{s}^{-1})$  en fonction de la concentration en fer ( $\mu\text{g}_{\text{Fe}}/\text{mL}$ )

A)  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -LDOPA et B)  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -LDOPA-NODAGA

Echantillon	$r_2 (\text{L.mmol}_{\text{Fe}}^{-1}.\text{s}^{-1})$	$r_1 (\text{L.mmol}_{\text{Fe}}^{-1}.\text{s}^{-1})$	$r_2/r_1$
$\text{Fe}_3\text{O}_4$ -LDOPA	$418 \pm 10$	$3,0 \pm 0,3$	139
$\text{Fe}_3\text{O}_4$ -LDOPA-PEG <sub>2000</sub>	$357 \pm 9$	$3,8 \pm 0,6$	94
$\text{Fe}_3\text{O}_4$ -LDOPA-DOTA	$163 \pm 10$	$1,3 \pm 0,3$	125
$\text{Fe}_3\text{O}_4$ -LDOPA-NODAGA	$197 \pm 7$	$2,2 \pm 0,1$	90
Cliavist™	$260 \pm 14$	n.d	n.d

Tableau 18 : Tableau bilan des relaxivités  $r_2$  et  $r_1$  ainsi que des rapports  $r_2/r_1$  des échantillons  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -LDOPA,  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -LDOPA-PEG<sub>2000</sub>,  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -LDOPA-DOTA et  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -LDOPA-NODAGA et du Cliavist™ (n.d : non déterminé) mesurées sur un appareil clinique IRM (3T)<sup>71</sup>

Les valeurs de relaxivité ( $r_2$ ) pour les nanoparticules  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -LDOPA-NODAGA sont supérieures à celles mesurées avec le DOTA et sont du même ordre de grandeur que celles mesurées sur des agents tels que le Cliavist™ (Tableau 18).



### 3.2.3.6 Conclusion

Ces deux nouveaux nanohybrides ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -LDOPA-NODAGA et  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -LDOPA-MANOTA) lyophilisés pour stockage ont montré un taux de complexation très élevé en purifiant préalablement les nanoparticules du fer potentiellement en solution. De plus, l'échantillon  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -LDOPA-NODAGA montre en parallèle une valeur de relaxivité  $r_2 = 197 \pm 7 \text{ L.mmol}_{\text{Fe}}^{-1}.\text{s}^{-1}$  en adéquation avec une utilisation comme agent de contraste  $T_2$ . Ils sont prometteurs pour une utilisation en imagerie bimodale IRM/TEP. Des tests sur animaux en imagerie bimodale IRM/TEP vont être réalisés en septembre ou octobre prochain sur des rats selon différents temps d'analyses ( $t = 3\text{h}, 6\text{h}, 12\text{h}$  et  $24\text{h}$ ).

## 3.3 Vers l'imagerie IRM/IO

Une autre stratégie de développement d'oxydes de fer comme agent bimodal a été envisagée. Elle se base cette fois-ci sur le couplage de l'IRM avec l'imagerie optique (IO) à partir d'oxydes de fer nus issus du dispositif hydrothermal (run 1). Cette étude a pour objectif de démontrer qu'il est possible d'utiliser ces nanoparticules nues pour une application biologique en les fonctionnalisant tout en améliorant leur stabilité en suspension. Pour cela, l'APTES (3-Aminopropyl)triéthoxysilane) est employé comme premier ligand de fonctionnalisation en post-synthèse hydrothermale. Ce ligand ne peut pas être greffé en milieu hydrothermal à cause de son hydrolyse rapide en milieux aqueux.

### 3.3.1 Première étape : modification de surface par l'APTES

En solution saline à pH physiologique, les nanoparticules d'oxydes de fer non modifiées en surface et synthétisées par voie hydrothermale en continu (run 1) ne sont pas stables ( $\text{Ø}_{\text{DLS}} = 434 \pm 26 \text{ nm}$ ). C'est pourquoi une stabilisation « post-synthèse » *via* des agents électrostatiques et/ou stériques est requise. La première solution consiste à réaliser une silanisation de la surface des particules par l'APTES ((3-Aminopropyl)triéthoxysilane) (Figure 99). Les agents silanisant de type alkoxysilanes sont considérés comme des candidats très prometteurs pour modifier la surface des nanoparticules d'oxydes de fer en vue d'améliorer leur biocompatibilité, leur stabilité et la densité de surface des groupements terminaux fonctionnels.<sup>208, 309-312</sup> Par la suite, il est possible de réaliser des greffages avec d'autres molécules telles que des polymères pour augmenter la furtivité des nanoparticules en solution aqueuse, des fluorophores, des biomolécules ou encore de greffer d'autres particules métalliques dans l'objectif de tirer parti des avantages de chacun des composants.<sup>312-314</sup> Ainsi l'APTES est un très bon candidat pour fonctionnaliser la surface des nanoparticules d'oxydes de fer. Brièvement, les hydroxyles de surface des nanoparticules d'oxydes de fer vont réagir avec les groupements alkoxy de l'agent silane. Des liaisons Si-O se forment et des groupements  $\text{NH}_2$  fonctionnels sont alors introduits à la surface des nanoparticules.

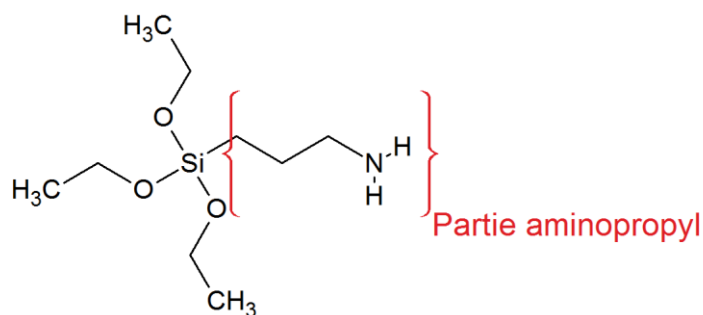
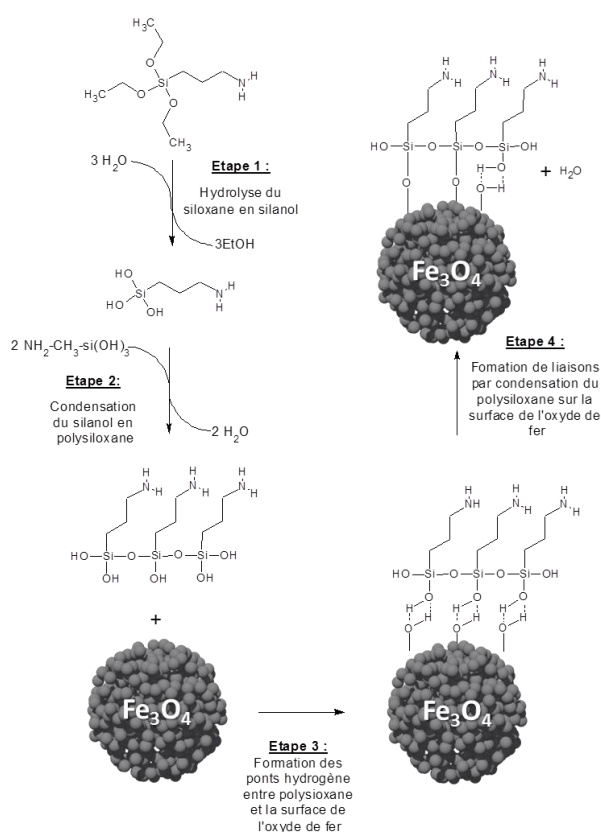


Figure 99 : Schéma de la molécule APTES

Il est important de contrôler les différentes étapes de silanisation afin d'optimiser la quantité de groupements  $\text{-NH}_2$  libres à la surface des nanoparticules d'oxyde de fer (Figure 100).

Figure 100 : Mécanisme de silanisation des nanoparticules par l'APTES (inspirée de Mornet)<sup>315</sup>

Dans un premier temps, en présence d'eau, le siloxane s'hydrolyse en silanol libérant de l'éthanol. Durant la deuxième étape, un processus de condensation du silanol en polysiloxanes (formation de Si-O-Si) se met en place. Des molécules d'eau sont alors libérées. Au cours de la troisième étape, des liaisons hydrogène s'établissent entre la surface de la nanoparticule d'oxydes de fer et les polysiloxanes précédemment formés. Enfin, par condensation du polysiloxane sur la surface de l'oxyde métallique, des liaisons covalentes Si-O se forment.

La température, la nature de l'aminosilane, la concentration du silane et la quantité d'eau sont autant de paramètres qui peuvent affecter la structure finale de la couche d'aminosilane à la surface du



matériau.<sup>316</sup> Dans la réaction, l'eau est un composé nécessaire car l'adsorption du silane ne peut pas avoir lieu en l'absence d'eau. Les groupements éthoxyles ( $\text{O-C}_2\text{H}_5$ ) ne sont pas assez réactifs pour se coupler spontanément avec les groupements  $\text{-OH}$  des surfaces inorganiques. La réaction requiert pour cela un environnement partiellement aqueux. Cependant, elle conduit à la déposition de produits polymérisés et une compétition entre les produits chimisorbés et polymérisés apparaît (Figure 101).<sup>316</sup> La sensibilité des groupements aminopropylalkoxysilanes à l'eau augmente car les groupements aminopropyl autocatalysent à la fois la formation de produits chimisorbés et polymérisés.<sup>316</sup> D'autres complications peuvent survenir telles que la compétitivité des amines avec les groupements alkoxy sur la surface. Ces groupements amines peuvent aussi former des liaisons hydrogène avec la surface du matériau. Un schéma des différentes configurations est proposé (Figure 101).

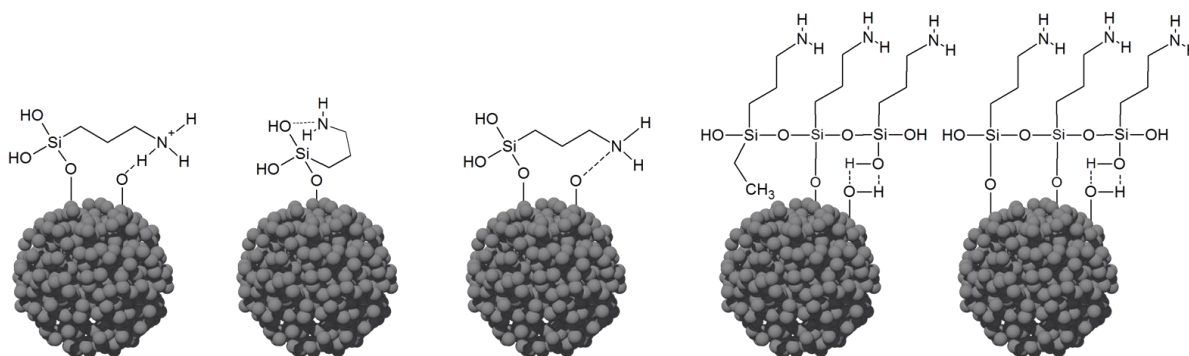


Figure 101 : Différentes configurations possibles de l'aminosilane sur la surface de l'oxyde de fer (inspirée de White *et al.*)<sup>316</sup>

Enfin, la température de synthèse est un paramètre clef dans la cinétique de réaction. Une augmentation de la température favorise la condensation du polysiloxane sur la surface de l'oxyde de fer ainsi que la vitesse de réaction.<sup>317</sup> En effet, il faut seulement 1 heure de réaction à  $70^\circ\text{C}$  (2% (v/v) APTES) pour atteindre les 90% de densité de greffage à la surface de la nanoparticule en milieu 100% eau alors qu'à  $30^\circ\text{C}$  (0,2% (v/v) APTES), seulement les deux tiers de la densité de greffage maximale sont atteints.<sup>317</sup> Avec une température élevée, la silanisation est rapide. A l'inverse une faible concentration en silane et une faible température conduisent à un temps de saturation supérieur à 24 heures avec en parallèle un faible taux de recouvrement en APTES sur la surface de la nanoparticule. L'effet du solvant peut être attribué à des effets compétitifs, des différences de polarités et de diffusivité des molécules de solvants.<sup>317</sup>

### 3.3.1.1 Procédure de fonctionnalisation des nanoparticules d'oxydes de fer synthétisées en voie hydrothermale par l'APTES ( $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-NH}_2$ )

Deux protocoles sont ici étudiés. La température, les concentrations et l'ajout de glycérol sont les paramètres étudiés. Leurs effets sur la quantité de groupements amines greffée à la surface des nanoparticules et la stabilité des nanoparticules sont évalués.

#### 3.3.1.1.1 Protocoles : influence de la température et de la quantité d'APTES

Il est connu que les solvants protiques et hydrophiles tels que l'eau et l'éthanol et éventuellement leur mélange accélèrent les réactions d'hydrolyse et d'oligomérisation dans le mécanisme de silanisation proposé en Figure 100. Les conditions de réaction doivent favoriser l'hydrolyse tandis que

l'oligomérisation des silanes doit être lente. Un faible ratio d'hydrolyse se produit aux alentours du pH = 7 pour les alkoxy-silanes et le ratio minimum en oligomérisation se situe aux alentours du pH = 4.<sup>305</sup> C'est pour cette raison qu'un pH compris entre 4,5 et 5,5 constitue un bon compromis entre les deux étapes de réaction. Un pH égal à 4 sera tout de même préféré afin de maximiser l'état de dispersion des nanoparticules. En effet, lorsque les nanoparticules ne sont pas modifiées en surface, leur dispersion est plus favorable vers les pH acides (potentiel  $\zeta$  plus important (§ 2.3.2)). Quand un mélange eau-éthanol est utilisé comme solvant, l'oligomérisation est mieux contrôlée en comparaison à l'eau seule comme solvant.<sup>305</sup> Ainsi, un ratio eau/éthanol 1:1 (v/v) est choisi.

### 3.3.1.1.2 Description du protocole n°1

4.10<sup>-4</sup> mol de nanoparticules d'oxydes de fer synthétisées en voie hydrothermale en continu sont mélangées dans 30 mL d'un mélange eau/éthanol (50/50 % en volume). Le pH est ajusté à une valeur de 4,2 afin d'éviter la formation d'agglomérats de nanoparticules et d'assurer leur dispersion. Par la suite, 5.10<sup>-3</sup> mol d'APTES sont ajoutées à la suspension. Un large excès d'APTES est engagé pour essayer de fonctionnaliser au maximum la surface des nanoparticules. La suspension est placée sous agitation magnétique (200 rotations/min) pendant 48 heures.

Une fois la synthèse terminée, 20 mL de glycérol sont versés dans le ballon pour favoriser la condensation des silanols<sup>315</sup> par chauffage (bain de l'évaporateur rotatif). La suspension est placée à l'évaporateur rotatif durant 2h30min pour éliminer l'eau et l'éthanol restant (T = 80°C, v = 100 rotations/min, P = 200 mbar). Une filtration sur membrane (30 kDa) par lavage à l'acétone (5 cycles de lavage) est réalisée afin de retirer le glycérol. La suspension ainsi récupérée est placée en lyophilisation (Figure 102).

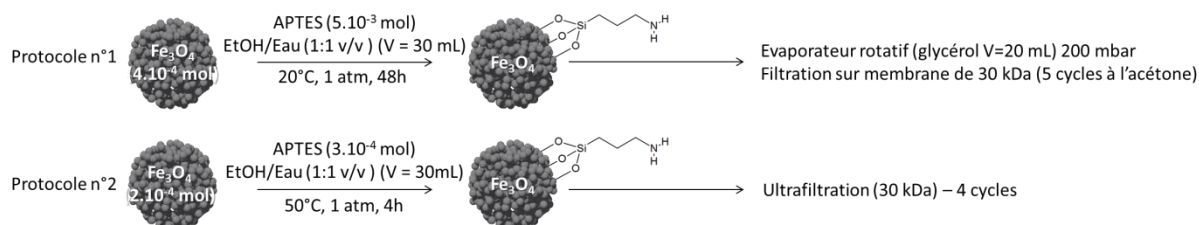


Figure 102 : Description des protocoles des synthèses des nanoparticules Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-NH<sub>2</sub>

### 3.3.1.1.3 Description du protocole n°2

Ce protocole a pour objectif d'étudier l'influence de la température mais aussi de la quantité d'APTES engagée (une monocouche). La proportion tenant compte d'une monocouche d'APTES sur la surface des nanoparticules de magnétite est estimée à partir de la formule suivante :<sup>305</sup>

$$X = \left( \frac{A}{W} \right) f \quad \text{Eq. 15}$$

- avec :
- $A$  : la surface spécifique des nanoparticules mesurée par B.E.T ( $104 \pm 1 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ ),
  - $W$  : la surface de mouillabilité de l'APTES en  $\text{m}^2/\text{g}$  ( $353 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ ),
  - $f$  : la quantité de fer à silaniser (50 mg),
  - $X$  : la quantité d'APTES requise pour greffer une monocouche sur la surface des nanoparticules.

Ainsi,  $2.10^{-4}$  mol de nanoparticules d'oxydes de fer synthétisées en voie hydrothermale en continu (pour réduire l'agglomération des nanoparticules nues entre elles) sont introduites en mêmes proportions et volumes que dans le protocole n°1. Le pH est ajusté à 4,5. La température, la quantité d'APTES, le temps de réaction et les étapes de lavages sont modifiés.

$3.10^{-4}$  mol d'APTES (facteur 4 par rapport à la quantité recommandée X (Eq. 15) déterminée ci-dessus) sont versées dans la suspension. Ce facteur est choisi pour accélérer et pour favoriser un taux de greffage maximal et rapide dans la première heure de réaction. La température de réaction est ajustée à  $50^{\circ}\text{C}$  et la durée de synthèse pour ce protocole est fixée à 4 heures. Une ultrafiltration sur membrane (Amicon® UltraCel 30 KDa) (5 cycles de lavage) est réalisée pour éliminer les réactifs n'ayant pas réagi. La suspension ainsi récupérée est placée en lyophilisation (Figure 102). La poudre obtenue est alors caractérisée par IR, ATG, XPS, Zétamétrie.

### 3.3.1.2 Présence des molécules organiques sur les nanoparticules de magnétite et conformation de la molécule d'APTES à la surface des nanoparticules d'oxydes de fer

Par analyse ATG, la perte de masse des échantillons  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -APTES et désignés par la suite  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ - $\text{NH}_2$  est plus importante que celle observée sur l'échantillon  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  n'ayant subi aucune modification de surface (Figure 103). Cette perte de masse plus significative met en évidence la présence de molécules organiques à la surface de la nanoparticule. Cette perte de masse est associée à la partie aminopropyl ( $58 \text{ g.mol}^{-1}$ ) (Figure 99) de l'APTES.

A l'aide de la surface spécifique déterminée à partir de la méthode B.E.T de l'échantillon non modifié ( $S = 104 \pm 1 \text{ m}^2.\text{g}^{-1}$ ), il est possible de connaître le nombre de groupements  $-\text{NH}_2$  présents à la surface de la nanoparticule. Il est de  $4,1 \text{ molécules d'APTES/nm}^2$  (seul le groupement aminopropyl de l'APTES est pris en compte dans le calcul et sera désigné ensuite par  $\text{NH}_2$ ) dans le protocole n°1 et  $7,1 \text{ molécules de NH}_2$  dans le protocole n°2.

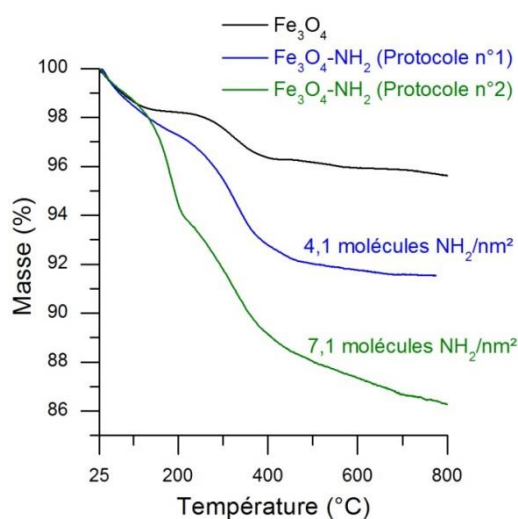


Figure 103 : Courbe ATG des poudres  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  (non modifiée en surface) et  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ - $\text{NH}_2$  (modifiée par APTES) selon le protocole 1 et 2

L'adsorption de l'APTES à la surface des nanoparticules d'oxydes de fer est confirmée aussi par spectroscopie infrarouge (Figure 104). Les bandes situées à 1150, 1095 et 1050  $\text{cm}^{-1}$  indiquent la présence des siloxanes Si-O-Si et SiO-H.<sup>208, 304, 314, 318, 319</sup> Dans l'hypothèse où des liaisons Fe-O-Si se sont formées, ces bandes peuvent aussi suggérer que le greffage de l'aminopropyl soit principalement dû à un film de polysiloxanes intraliés piégeant chacune des particules de magnétite.<sup>318</sup> La vibration à 980  $\text{cm}^{-1}$  est plus sujette à controverse. En effet, elle peut être associée aux vibrations de type Si-O<sup>314, 316, 319</sup> ou Fe-O-Si<sup>305, 313, 318, 320, 321</sup>. Il est par ailleurs impossible d'établir une possible formation de liaisons Fe-O-Si dans la région 600-500 $\text{cm}^{-1}$  à cause du recouvrement des vibrations Fe-O de la magnétite.<sup>208</sup> Enfin, la bande à 870  $\text{cm}^{-1}$  est attribuée aux vibrations Si-O-H.<sup>208, 319</sup>

Concernant la partie aminopropyl, il est possible d'extraire des informations. La bande caractéristique des amines libres à 1630  $\text{cm}^{-1}$  est visible sur les spectres.<sup>208, 319, 322</sup> Elle indique que certains groupements  $-\text{NH}_2$  n'ont pas formé d'interactions avec la surface des nanoparticules de magnétite ou de type H-NH<sub>2</sub> avec l'APTES. La présence de ces amines libres est importante pour réaliser d'autres greffages ultérieurs avec des molécules d'intérêts. Une partie des groupements amines initiale de l'APTES s'est liée en formant des liaisons de types H-NH<sub>2</sub><sup>305</sup>. La présence des vibrations de cisaillement des groupements  $-\text{NH}_3^+$  ( $\delta \text{NH}_3^+$ ) à 1530  $\text{cm}^{-1}$  indique que tous les groupements ne sont pas sous forme de NH<sub>2</sub>.<sup>305, 309</sup> Les bandes comprises dans la région suivante : 1415-1300  $\text{cm}^{-1}$  représentent les liaisons de type C-N.<sup>314, 319, 323</sup> Enfin, la vibration Si-C ou C-N à 1220  $\text{cm}^{-1}$  est présente.<sup>305, 309</sup>

Les vibrations à 2970, 2925 et 2870  $\text{cm}^{-1}$  sont représentatives des étirements asymétriques des groupements  $-\text{CH}_3$ , asymétriques des groupements  $-\text{CH}_2$  et symétriques des groupes  $-\text{CH}_2$  respectivement.<sup>304, 305</sup> La vibration aux alentours de 1460  $\text{cm}^{-1}$  est attribuée quant à elle au cisaillement des groupements  $-\text{CH}_2$  ( $\delta \text{CH}_2$ ).<sup>309, 318</sup>

Les vibrations OH à 3360  $\text{cm}^{-1}$  sont présentes sur le spectre. Un épaulement assez large à 3200  $\text{cm}^{-1}$  pouvant représenter les vibrations asymétriques ( $\nu_{\text{as}}$ ) et symétriques ( $\nu_{\text{s}}$ ) des groupements N-H (liaison H des amines) apparaît sur le spectre.<sup>316, 318, 319</sup> Cette bande peut indiquer une potentielle interaction des groupements amines  $-\text{NH}_2$  avec la surface des oxydes de fer.<sup>319</sup>

Ainsi, toutes ces bandes confirment le greffage de la molécule organique à la surface des nanoparticules avec la présence d'amines libres.

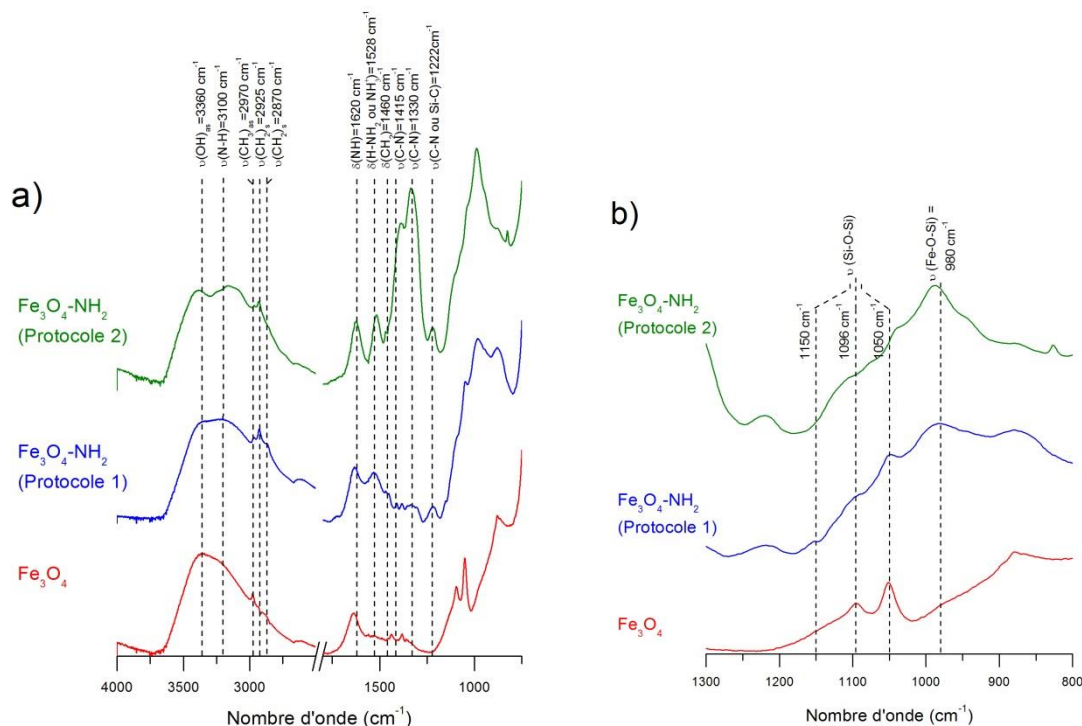


Figure 104 : Spectres IR (en ATR) des poudres Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-NH<sub>2</sub> (Protocole 1) et Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-NH<sub>2</sub> (Protocole 2) a) de 4000 à 750 cm<sup>-1</sup> et b) de 1300 à 800 cm<sup>-1</sup> (δ : cisaillement; ν<sub>as</sub> : étirement antisymétrique; ν<sub>s</sub> : étirement symétrique)

Le greffage est également confirmé par spectroscopie XPS (Figure 105 et Tableau 19). La présence d'azote, de silicium et l'augmentation faible de la concentration en carbone provenant des chaînes carbonées constituant le groupement aminopropyl sur les nanoparticules modifiées par l'APTES traduisent la présence de groupements amines à la surface de l'oxyde de fer Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>. Ces résultats coïncident ainsi avec ceux obtenus à partir des autres techniques de caractérisations déjà présentées. En étudiant les régions C1s, N1s, O1s et Si2s, il est possible d'obtenir davantage d'informations concernant les différents types de liaisons potentielles entre la molécule greffée et la nanoparticule.

Deux nouvelles contributions apparaissent sur la région O1s des deux poudres modifiées. La première se situant à 528,9 eV n'a pu être attribuée. Les nanoparticules fonctionnalisées par l'APTES montrent une deuxième contribution se situant à 532,4 eV. Lorsque cette dernière se situe à environ +2 eV (ici 2,5 eV) par rapport au pic Fe-O (O<sup>2-</sup>),<sup>309, 324, 325</sup> il s'agit de liaison de type Si-O. Les liaisons Fe-O-Si se situant vers 531,5 eV sont confondues avec les -OH de surface<sup>309</sup> et sont par conséquent difficiles à désommer du pic O1s. Cependant, un shift de 0,3 eV concernant cette contribution (531,2 eV, 530,9 eV et 530,8 eV pour les poudres Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-NH<sub>2</sub> (Protocole 1) et Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-NH<sub>2</sub> (Protocole 2) respectivement) indiquent une modification de l'environnement électronique de l'oxygène pouvant être induit par la présence du silane à proximité de la surface des nanoparticules.

Concernant la région Si2p, aucune information ne peut être tirée à cause de l'influence du pic Fe3s aux alentours de 91 eV. Par conséquent, seule la région Si2s est considérée. Selon la littérature, un shift vers les basses énergies de 154,4 eV à 153,3 eV de ce pic indique la présence de liaisons Si-O-Fe dans

des systèmes Si-Ferrihydrite<sup>22, 326</sup>. Ainsi, le pic observé encore plus bas en énergie (152,4 eV) dans notre étude suggère une liaison de type Si-O-Fe.

Par ailleurs, au niveau de la région C1s (Figure 105), la contribution C-N augmente passant ainsi de 19% à 31% pour l'échantillon Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-NH<sub>2</sub> (protocole 1) et de 19% à 37% pour l'échantillon Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-NH<sub>2</sub> (protocole 2) et confirment ainsi la présence des groupements aminopropyl à la surface des nanoparticules de magnétite<sup>309</sup>.

Enfin, à propos de la région N1s, deux nouvelles contributions, caractérisant les groupements -NH<sub>2</sub> (399,3 eV) et -NH<sub>3</sub><sup>+</sup> (401,2 eV), apparaissent.<sup>327</sup>

Concentration (%)	C	N	O	Fe	Si
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	9	-	56	35	-
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -NH <sub>2</sub> (Protocole 1)	13	3	50	30	4
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -NH <sub>2</sub> (Protocole 2)	12	4	50	29	5

Tableau 19 : Concentration atomique en % des poudres Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-NH<sub>2</sub> (Protocole 1) et Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-NH<sub>2</sub> (Protocole 2)

En résumé, le greffage de l'APTES sur la surface des nanoparticules d'oxydes de fer s'est bien déroulé en suivant les deux protocoles. Les caractérisations IR et XPS tendent à montrer la présence de liaisons de type Si-O et Si-O-Si synonymes de la formation des ponts silanes entre les molécules d'APTES. Par ailleurs, des liaisons Fe-O-Si tendent à prouver une complexation entre les silanes et les hydroxyles de la surface de la nanoparticule. Enfin, une partie des groupements NH<sub>2</sub> a pu réagir avec la surface des particules d'oxydes de fer. Aucune variation significative des contributions n'est notée entre les deux protocoles à l'exception de la bande non déterminée sur le pic O1s de la poudre Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-NH<sub>2</sub> (Protocole 1). Cependant, par XPS tout comme en ATG, le protocole 2 favorise un taux de greffage plus important que le protocole 1 car la contribution C-N en XPS (37% dans le cas du protocole 2) est plus importante (31% dans le cas du protocole 1). Cette variation va également se retrouver sur les mesures DLS et zétamétriques.

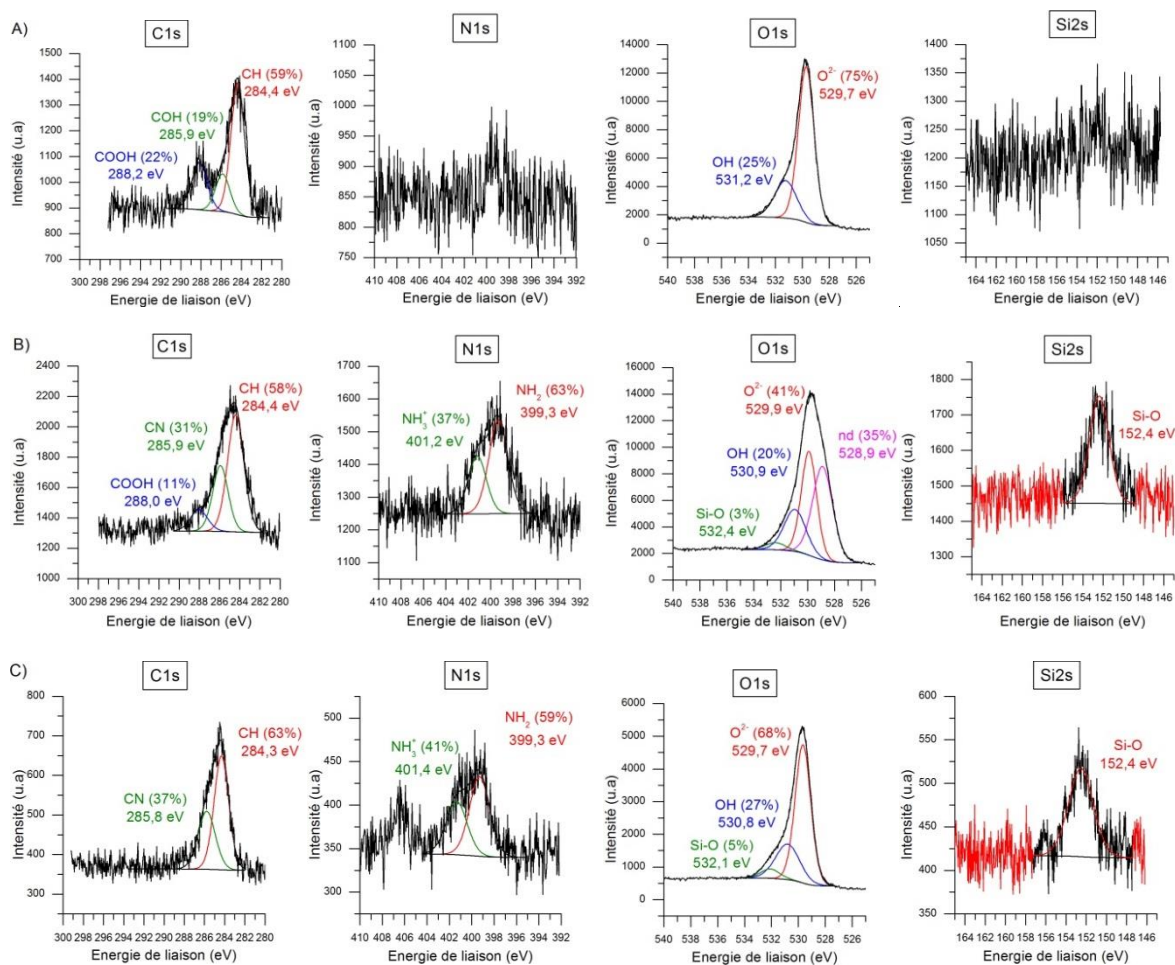


Figure 105 : Régions C1s, O1s, N1s et Si2s des poudres A)  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , B)  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-NH}_2$  (Protocole 1) et C)  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-NH}_2$  (Protocole 2). nd : non déterminé

### 3.3.1.3 Influence sur la stabilité et la taille hydrodynamique des nanoparticules de type $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-NH}_2$

Les courbes zétamétriques (Figure 106) des nanoparticules  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ,  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-NH}_2$  (protocole 1) et  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-NH}_2$  (protocole 2) mettent en évidence un changement du point isoélectrique (PIE) et des plateaux de stabilité sur une gamme de pH allant de 2 à 8. Aucun changement n'est observé pour les nanoparticules  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-NH}_2$  (Protocole 1).



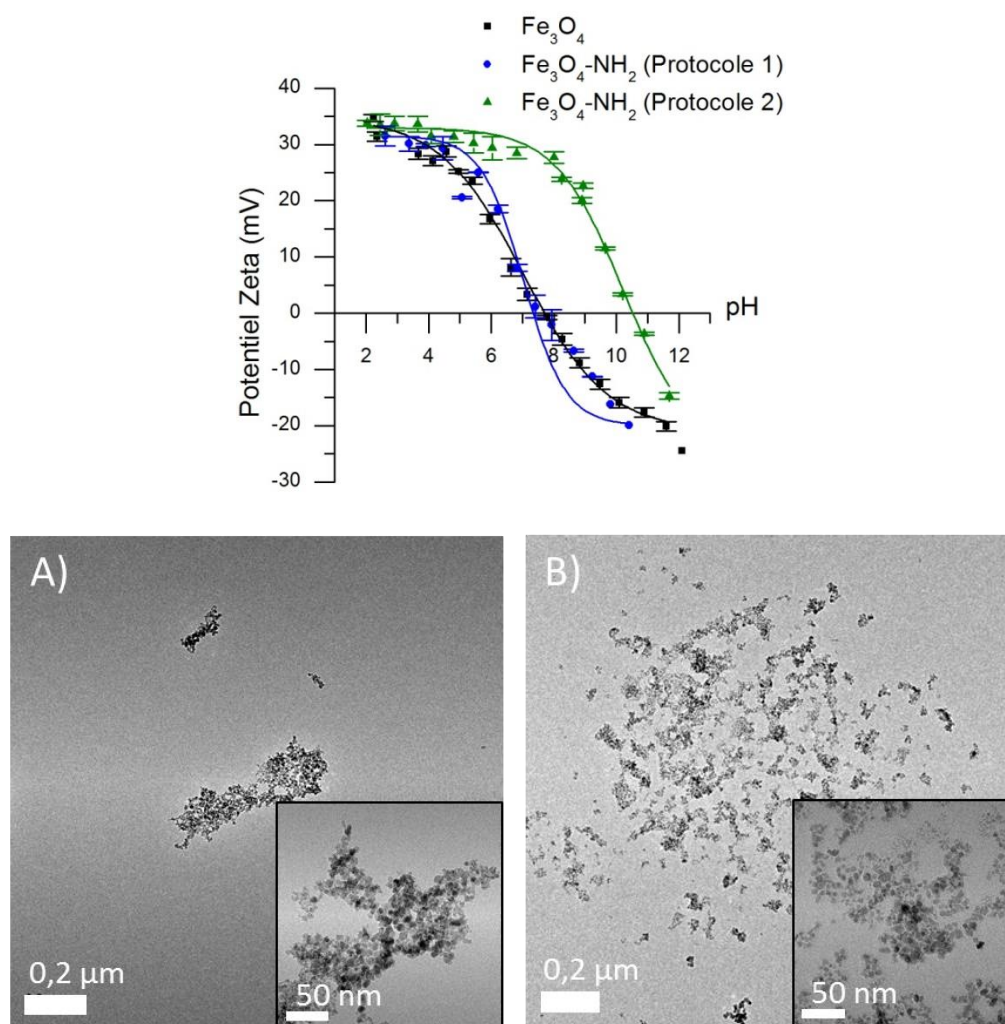


Figure 106 : Courbes zétamétriques des particules Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-NH<sub>2</sub> (Protocole 1) et Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-NH<sub>2</sub> (Protocole 2) et clichés MET des particules A) Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> et B) Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-NH<sub>2</sub> (Protocole 2)

Le PIE des suspensions Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> se trouve à 7,6. Il reste inchangé lorsque les nanoparticules sont modifiées selon le protocole 1. A l'inverse, le PIE des nanoparticules Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-NH<sub>2</sub> (protocole 2) se situe à 10,5 (Figure 106). Ce changement est attribué aux groupements amines de la molécule greffée (APTES). Les nanoparticules synthétisées selon le protocole 1 ne subissent aucune modification du PIE. Il est possible que des multicouches entre les NH<sub>2</sub> et les groupements Si-O ou encore des interactions NH<sub>2</sub>-oxydes de fer se soient formées. Ce cas défavorable rend alors les groupements NH<sub>2</sub> non réactifs et donc insensibles aux variations de pH. Par ailleurs, les particules modifiées selon le protocole 2 indiquent quant à elles la formation d'un plateau de stabilité sur une large gamme de pH allant des pH acide au pH physiologique. Ceci est susceptible d'induire une meilleure stabilité des nanoparticules en suspension par répulsion électrostatique (Figure 107). Afin de confirmer cela, des mesures DLS sont réalisées à pH physiologique (7,4). Ces résultats montrent une diminution drastique de la taille des agrégats par rapport aux nanoparticules nues ( $434 \pm 26$  nm). Cependant, les diamètres hydrodynamiques entre les deux protocoles (1 et 2) restent proches ( $117 \pm 4$  nm et  $128 \pm 2$  nm respectivement selon les protocoles 1 et 2).



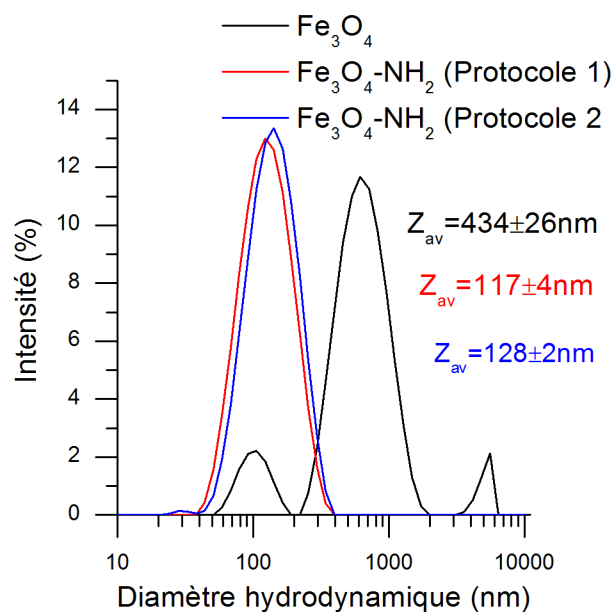


Figure 107 : Diamètres hydrodynamiques déterminés par DLS des nanoparticules d'oxydes de fer non modifiées, modifiées par de l'APTES selon le protocole 1 le protocole 2 à pH physiologique après ultrasons (canne à US durant 30 sec à 100%)

L'augmentation de la température de réaction et la diminution de la concentration en APTES et nanoparticules ont permis d'améliorer le taux de greffage, la stabilité colloïdale mais également la cinétique de réaction. Le protocole 2 sera sélectionné par la suite pour effectuer des greffages ultérieurs.

### 3.3.1.4 Conclusion

Toutes les techniques de caractérisations mise en œuvre (ATG, XPS, IR) mettent en évidence la présence de groupements  $NH_2$  sur les nanoparticules d'oxydes de fer préparées en deux étapes : synthèse hydrothermale en continu suivie d'une étape de fonctionnalisation par l'APTES. Cette étude montre qu'il est donc tout à fait possible de partir d'oxydes de fer nus issus du dispositif hydrothermal en continu et de les modifier par d'autres molécules organiques avec des rendements de greffages proches de ceux obtenus avec les molécules DHCA et LDOPA. De plus, ces résultats sont en accord avec ceux de la littérature.<sup>208, 305, 317, 322</sup> Des conditions de synthèse optimisées (température, ratio et durée) ainsi qu'une étape de purification simplifiée suffisent à greffer et stabiliser efficacement les nanoparticules en suspension à pH physiologique tout en diminuant la taille hydrodynamique des nanoparticules ( $\varnothing_{DLS} = 128 \pm 2$  nm). Cet échantillon servira de référence pour greffer des molécules fluorescentes (utilisable en imagerie optique).

## 3.3.2 Greffage de l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC) sur des nanoparticules d'oxydes de fer préalablement modifiées en surface par l'APTES comme agent de contraste bimodal IRM/IO

### 3.3.2.1 Contexte de l'étude

Certaines barrières anatomiques situées au niveau de l'oreille interne (lieu difficile d'accès) empêchent le traitement et l'application de certains soins comme pour des cas de surdité. Pour contrer ces problèmes, l'emploi de nanoparticules est une solution pour véhiculer et amener des médicaments dans

ce lieu difficile d'accès en utilisant le pouvoir magnétique des oxydes de fer. En effet, soumis à un champ magnétique externe, elles ont la capacité de se mouvoir « facilement ».

Notre équipe a été sollicitée, dans le cadre d'une collaboration avec le Centre Georges François Leclerc (CGFL) et le Le2i (Laboratoire Electronique, Informatique et Image), pour produire des nanoparticules d'oxydes de fer détectables en imagerie optique. Des tests d'administrations des nanoparticules d'oxydes de fer, auditifs, d'histologie et d'imageries ont été réalisés dans l'objectif d'évaluer la possibilité d'injecter des nanoparticules d'oxydes de fer dans la cochlée\* (§ 3.4.2).<sup>328</sup> La première étape du projet consiste donc à développer des nanoparticules d'oxydes de fer modifiées en surface, de les guider à l'aide d'aimants à l'intérieur de la cochlée (Figure 108) et de les suivre par la présence de molécules fluorescentes telles que la FITC. A terme les imageries IRM/TEP seront utilisées employant ainsi nos nanoparticules bimodales. Mais pour initier ce travail, l'imagerie optique a été privilégiée par sa facilité d'accès par nos collègues praticiens hospitaliers.

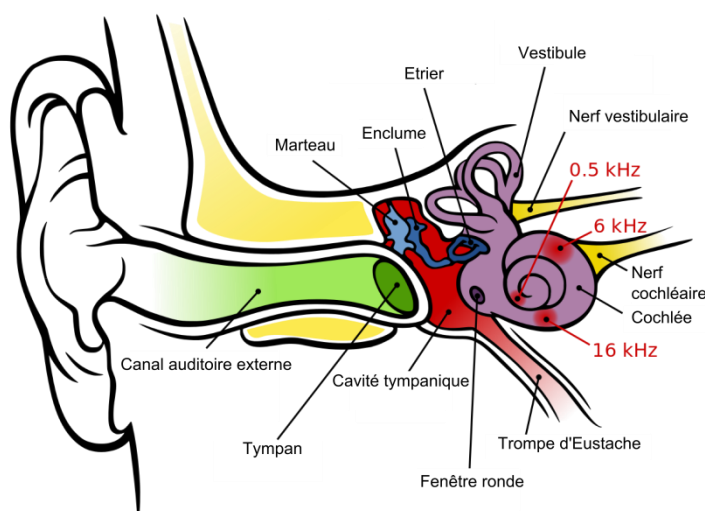


Figure 108 : Différentes parties anatomiques composant l'oreille<sup>329</sup>

Pour cela, des nanoparticules magnétiques préparées à l'aide le dispositif hydrothermal et modifiées en surface par de l'APTES (§ 3.3.1) et marquées par de la FITC ont été élaborées. La molécule fluorescente (FITC) est greffée à la surface des nanoparticules *via* la formation d'une liaison thiourée entre le groupement isothiocyanate (R-N=C=S) de la fluorescéine et les sites NH<sub>2</sub> de l'APTES. Le solvant DMSO (DiMéthylSulfOxyde), solvant organique polaire et aprotique, est employé pour la synthèse (la solubilité de la FITC est de 5 mg/mL dans le DMSO) car la solubilité de la FITC dans l'eau est inférieure à 0,1 mg/mL. Il est recommandé d'avoir une concentration de 1 mg/mL de FITC dans le DMSO.<sup>330</sup>

\* Cochlée : zone de l'oreille interne participant à l'audition

### 3.3.2.2 Greffage de la FITC sur les SPIONs

#### 3.3.2.2.1 Matériaux et méthodes

Les nanoparticules  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-NH}_2$  ont été préparées par greffage d'APTES à la surface des nanoparticules de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  (§ 3.3.1.1.3). Le DMSO extra dry 99,7% provient de ACROS Organics et la FITC (90%) provient de Fluka.

#### 3.3.2.2.2 Procédure de préparation des nanoparticules $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-NH}_2\text{-FITC}$

$7,5 \cdot 10^{-5}$  mol de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  et  $2,5 \cdot 10^{-5}$  mol de  $\text{NH}_2$  (partie aminopropyl)) sont introduites dans 20 mL de DMSO (Figure 109).  $2,7 \cdot 10^{-5}$  mol de FITC (selon un facteur molaire  $\sim 1$  par rapport aux sites  $\text{NH}_2$ ) sont mélangées avec la suspension précédemment préparée. La suspension est mise sous agitation magnétique durant 90 minutes. Une fois cette étape terminée, les nanoparticules sont purifiées afin de supprimer tous les résidus de synthèse (DMSO et les molécules de FITC qui n'ont pas réagi). Cette étape s'effectue par ultrafiltration sur une membrane de 30 kDa (Amicon® UltraCel 30 KDa). De nombreux cycles de lavages successifs sont nécessaires jusqu'à l'obtention d'un filtrat incolore. L'échantillon est lyophilisé pour être caractérisé par DLS, ATG, XPS, Zeta et IR.

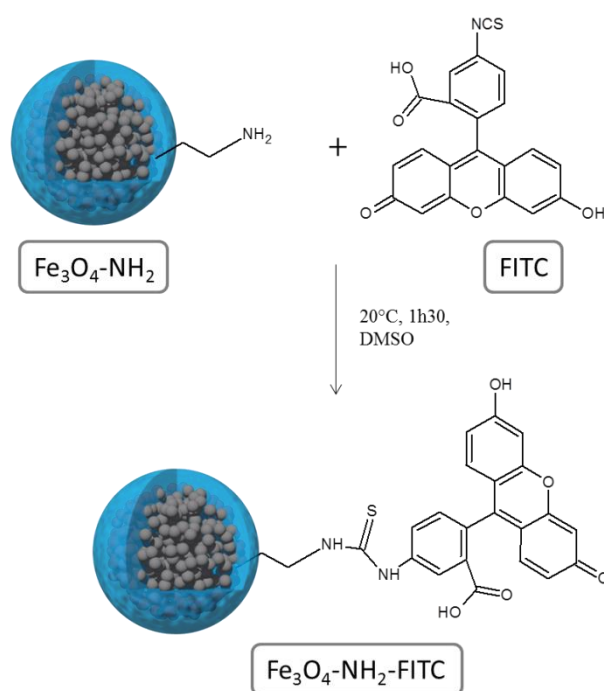


Figure 109 : Préparation des nanoparticules  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-NH}_2\text{-FITC}$

#### 3.3.2.3 Mise en évidence de la molécule FITC sur les nanoparticules

La présence de la molécule FITC a été mise en évidence au moyen de différentes techniques de caractérisations dont la spectrométrie UV-Visible (Figure 110). Les nanoparticules  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-NH}_2\text{-FITC}$  présentent les longueurs d'onde d'absorption caractéristiques de la FITC isolée à 460 et 480 nm.<sup>331-333</sup>

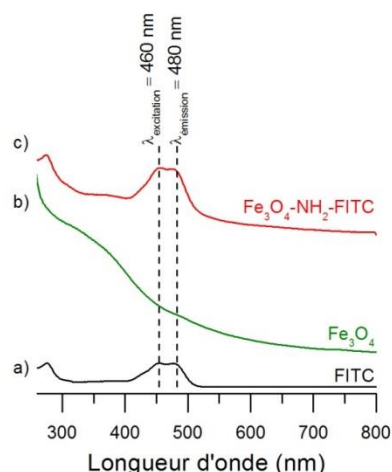


Figure 110 : Spectres UV-visible des suspensions de la molécule a) FITC en solution et des suspensions des nanoparticules b)  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  et c)  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-NH}_2\text{-FITC}$

Les analyses ATG et zétamétriques confirment également la modification de surface des nanoparticules par la FITC (Figure 111). En effet, une perte de masse plus importante apparaît sur la courbe ATG de l'échantillon  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-NH}_2\text{-FITC}$  entre 300 et 450°C. La perte de masse différentielle entre l'échantillon  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-NH}_2$  et  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-NH}_2\text{-FITC}$  est de 14%. A partir de cette valeur et de la surface spécifique de l'échantillon ( $104 \text{ m}^2\cdot\text{g}^{-1}$ ), il est possible de connaître le nombre de molécules FITC présentes à la surface des nanoparticules d'oxydes de fer, soit environ 2,1 molécules FITC par  $\text{nm}^2$  (rendement de 26%). En ce qui concerne la zétamétrie, un décalage du PIE vers les pH acides (4,1) est observé. Ce décalage confirme que le greffage est efficace par la liaison établie entre les amines et les thiocyanates car la propriété électropositive offerte par les groupes  $\text{NH}_3^+$  n'existe plus. En effet pour rappel, la molécule APTES induisait un PIE à 10,5 vers les pH basique.

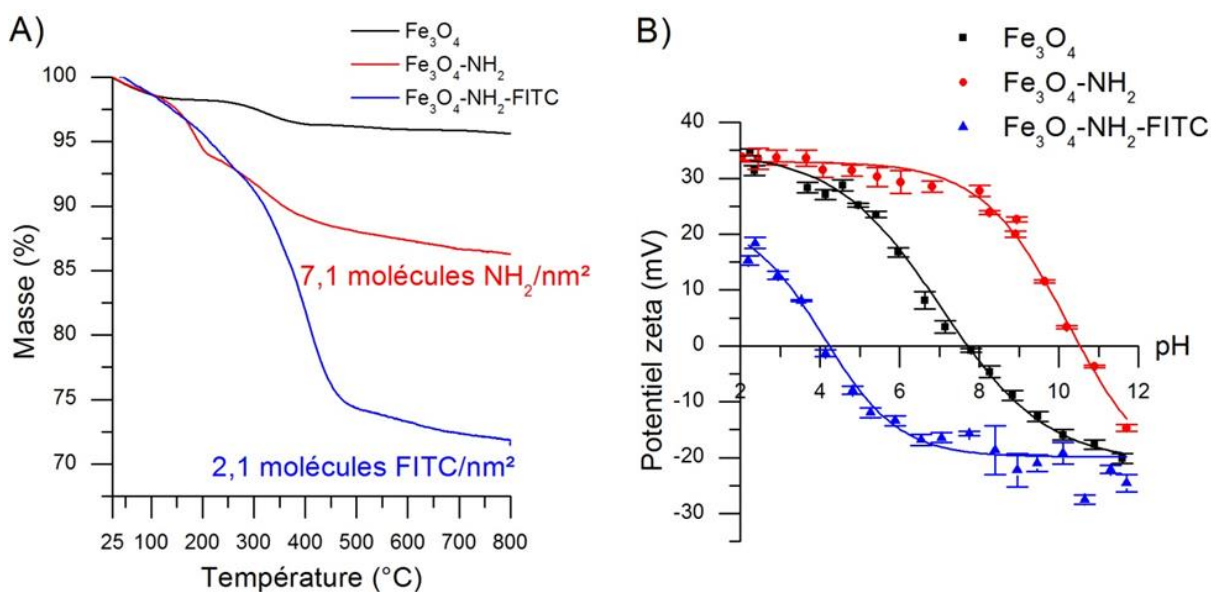


Figure 111 : A) Courbes ATG des poudres  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ,  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-NH}_2$  (Protocole 2) et  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-NH}_2\text{-FITC}$ . B) Courbes zétamétriques des échantillons  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ,  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-NH}_2$  (Protocole 2) et  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-NH}_2\text{-FITC}$

En IR, le spectre des poudres  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-NH}_2\text{-FITC}$  montre l'apparition de nouveaux pics caractéristiques de la molécule FITC (Figure 112). La présence des étirements symétriques attribués aux groupements  $\text{CH}_2$  à  $2925\text{ cm}^{-1}$  et  $2870\text{ cm}^{-1}$ , des vibrations liées aux cycles aromatiques ( $1737\text{ cm}^{-1}$ ,  $915\text{ cm}^{-1}$  et  $850\text{ cm}^{-1}$ ) et de la double liaison  $\text{C}=\text{S}$  à  $1570\text{ cm}^{-1}$  apparaissent.<sup>14, 334, 335</sup> De même, la liaison thiocyanate localisée habituellement à  $2333\text{-}2359\text{ cm}^{-1}$  n'apparaît pas sur le spectre IR. Cette absence traduit la disparition de cette liaison et par conséquent confirme le greffage du fluorophore.<sup>334</sup> Par ailleurs, une nouvelle bande à  $1620\text{ cm}^{-1}$  est liée à la présence du groupement carboxylique de la molécule FITC. Les nombreuses bandes comprises entre  $1400$  et  $1100\text{ cm}^{-1}$  sont caractéristiques des vibrations  $\text{CH}$  et  $\text{CH}_2$  de la molécule FITC.<sup>288, 297</sup> Toutes ces vibrations confirment le greffage de cette molécule sur la surface des nanoparticules.

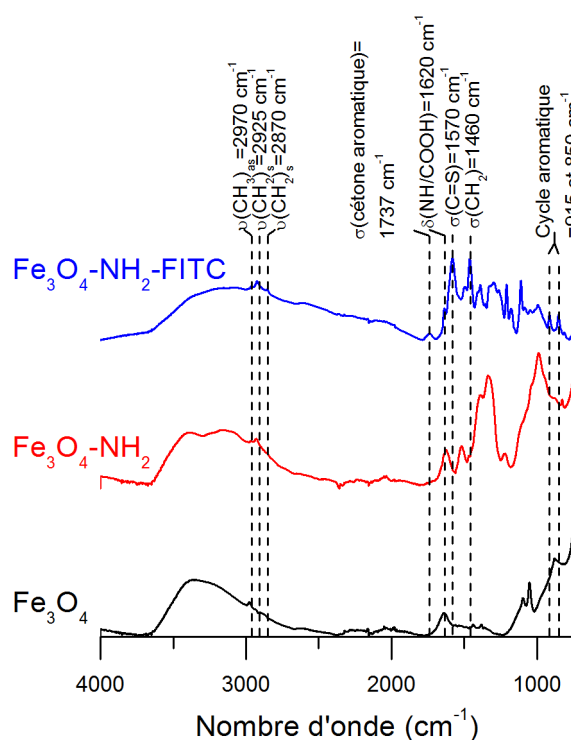


Figure 112 : Courbes IR des poudres  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  et  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-NH}_2$  et  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-NH}_2\text{-FITC}$  de  $4000$  à  $750\text{ cm}^{-1}$  ( $\delta$  : cisaillement;  $\nu$  : étirement antisymétrique;  $\nu_s$  : étirement symétrique;  $\sigma$  : déformation)

La spectroscopie XPS permet elle aussi de souligner la présence de la molécule FITC à la surface des nanoparticules d'oxydes de fer (Tableau 20 et Figure 113). En premier lieu, les concentrations atomiques en carbone, en oxygène et en fer varient fortement (Tableau 20). En effet, après greffage du fluorophore, la concentration atomique en carbone des nanoparticules modifiées (principal élément constitutif de la molécule FITC) passe de  $12\%$  à  $47\%$  pour les nanoparticules  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-NH}_2$  et  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-NH}_2\text{-FITC}$  respectivement. En parallèle, les proportions relatives à l'oxygène ( $50\%$  à  $33\%$ ), au silicium ( $5\%$  à  $3\%$ ) et au fer ( $30\%$  à  $13\%$ ) diminuent. Ces diminutions traduisent un recouvrement de la surface des nanoparticules en molécules FITC.

<b>Concentration atomique (%)</b>	<b>C</b>	<b>N</b>	<b>O</b>	<b>Fe</b>	<b>Si</b>
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	9	-	56	35	-
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -NH <sub>2</sub> (Protocole 2)	12	4	50	29	5
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -NH <sub>2</sub> -FITC	47	4	33	13	3

Tableau 20 : Concentrations atomiques en % des poudres Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> et Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-NH<sub>2</sub> et Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-NH<sub>2</sub>-FITC

Les désommmations des pics du carbone, de l'oxygène, de l'azote et du silicium sont utilisées afin de retrouver les contributions provenant de la molécule FITC (Figure 113). Au niveau du pic du carbone, le fluorochrome est identifié par les contributions correspondant aux groupements CH (passant respectivement de 63% à 70% pour les poudres Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-NH<sub>2</sub> et Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-NH<sub>2</sub>-FITC respectivement) très présents dans les cycles carbonés et par l'apparition du groupement COOH (6%) à 288,7 eV (Figure 113-C). Un décalage important de la contribution C-N de 285,8 eV à 286,2 eV est observé. Il est attribué à la présence nouvelle des groupements C=O et C-O de la FITC. Leur énergie de liaison coïncide avec celle des groupements C-N. La présence de la molécule FITC se retrouve aussi sur le pic O1s de la poudre analysée. Un épaulement large vers les hautes énergies apparaît. Il comprend deux contributions dont l'une est propre aux liaisons C=O (40%) à 531,1 eV et l'autre est caractéristique des liaisons C-O (15%) à 532,9 eV.<sup>336, 337</sup> Un shift en énergie vers les hautes énergies est observé sur ces deux contributions comparées à celles des poudres Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-NH<sub>2</sub>. Enfin, la contribution NH<sub>3</sub><sup>+</sup> à 401,4 eV sur l'échantillon Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-NH<sub>2</sub> disparaît pour ne laisser que la contribution NH<sub>2</sub> à 399,8 eV. Cette contribution est légèrement décalée vers les hautes énergies comparée à celle observée sur les nanoparticules Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-NH<sub>2</sub> (399,3 eV). Ainsi la disparition de la contribution NH<sub>3</sub><sup>+</sup> et le décalage de l'énergie de liaison de la contribution NH<sub>2</sub> indique que le greffage entre les sites NH<sub>2</sub> de la molécule APTES et le groupement N=C=S du fluorophore FITC a bien eu lieu. L'environnement électronique de l'azote de l'APTES a été modifié.

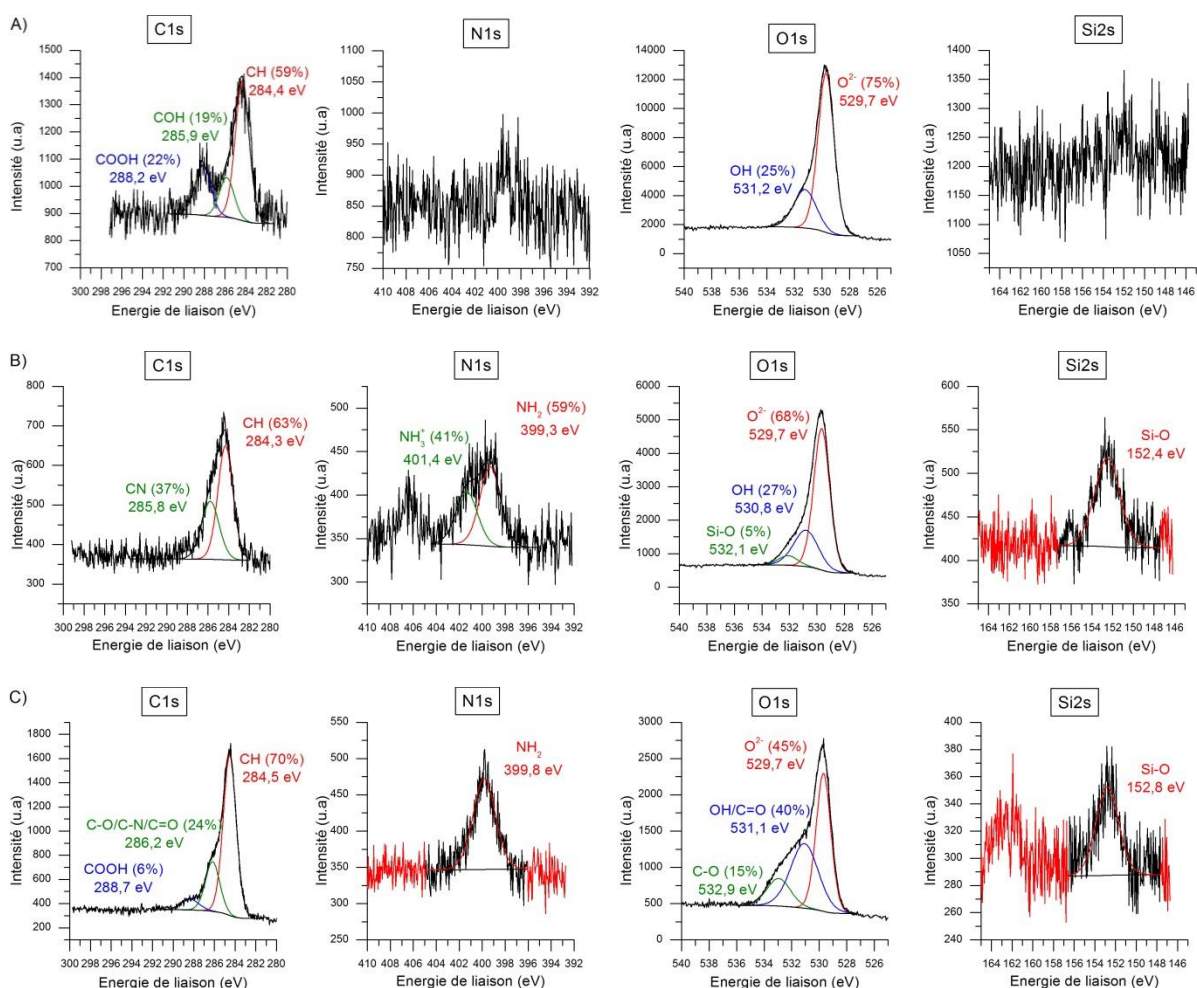


Figure 113 : Régions C1s, O1s, N1s et Si2s des poudres A) Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, B) Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-NH<sub>2</sub> et C) Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-NH<sub>2</sub>-FITC

### 3.3.2.4 Conclusion sur la partie greffage de la FITC sur les SPIONS

Les nanoparticules issues du dispositif hydrothermal en continu sont donc fonctionnalisables en post-synthèse (par l'APTES) et permettent de greffer des fluorophores (FITC) détectables par UV-Visible. 2,1 molécules de FITC par nm<sup>2</sup> sont retrouvées à la surface des nanoparticules. Toutes les analyses successives par ATG, XPS, DLS, zétamétrie, IR et UV-Visible réalisées sur les échantillons Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-NH<sub>2</sub> et Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-NH<sub>2</sub>-FITC ont permis de montrer l'efficacité du greffage du fluorophore en grande quantité sur des particules magnétiques d'oxydes de fer préalablement silanisées.

## 3.4 Premiers pas vers les applications biologiques

La cytotoxicité et génotoxicité des nanoparticules modifiées par l'APTES (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-NH<sub>2</sub>) sont étudiées sur des cellules HepG2\*. De plus, suite à une demande extérieure, les nanoparticules Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-NH<sub>2</sub>-FITC sont testées sur des rats pour tenter de conduire les nanoparticules dans la cochlée sans endommager leur audition.

\* Cellules HepG2 : hépatocytes utilisés comme modèle *in vitro* car le foie participe en première ligne à la filtration des nanoparticules.



### 3.4.1 Cytotoxicité et génotoxicité des nanoparticules Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-NH<sub>2</sub>

#### 3.4.1.1 Cytotoxicité des nanoparticules Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-NH<sub>2</sub>

Différents tests de cytotoxicités sur les nanoparticules de types Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-NH<sub>2</sub> ont été réalisés afin de vérifier la réponse de certaines cellules aux nanoparticules.

Le premier test consiste à vérifier leur cytotoxicité en mesurant la cinétique d'incorporation de l'uridine tritiée ([<sup>3</sup>H]uridine)\* dans des cellules de type HepG2 incubées 24h en présence de différentes concentrations d'oxydes de fer (gamme allant de 0,1 à 100 µg.mL<sup>-1</sup>) (Figure 114). Ces mesures sont comparées à deux témoins (cellules saines et cellules ayant incorporées du dichromate de potassium K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> à 25 µg/mL). Ce dernier est choisi car il induit une cytotoxicité importante lié à un stress oxydatif et des dommages importants sur l'ADN.<sup>338</sup> Cette technique est très sensible et reproductible.<sup>339</sup> Elle est plus sensible que les classiques tests MTT<sup>†</sup> ou encore bleu de trypan<sup>‡</sup>.

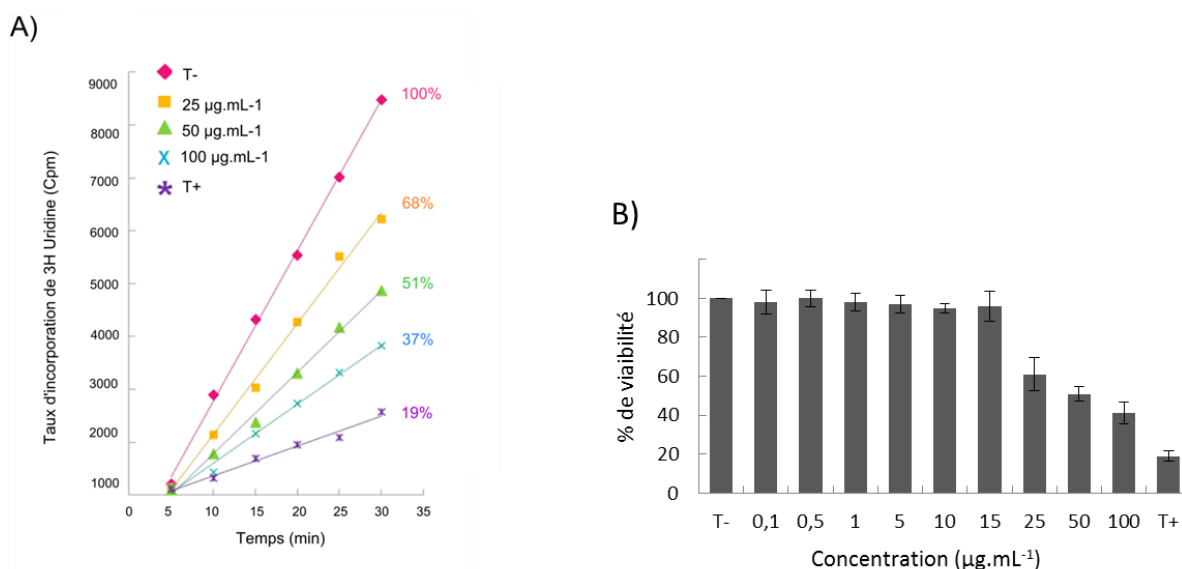


Figure 114 : Cinétique d'incorporation de l'uridine tritiée sur des cellules de type HepG2 incubées 24h en présence de différentes concentrations en oxydes de fer Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-NH<sub>2</sub> (0,1, 1, 5, 10, 15, 25, 50 et 100 µg.mL<sup>-1</sup>), sur des cellules HepG2 sans agents extérieurs (T-) et sur des cellules HepG2 soumis à du dichromate de potassium (T+) (25 µg.mL<sup>-1</sup>) exprimée A) en Cpm et B) en % de viabilité

Les résultats montrent que lorsque la concentration en oxyde de fer augmente et atteint 25 µg.mL<sup>-1</sup>, une diminution de la viabilité des cellules apparaît. Elle chute en effet à 61 ± 9%. Cette diminution continue pour des concentration en oxydes de fer de 50 et 100 µg.mL<sup>-1</sup> avec 51 ± 4 et 41 ± 6 % respectivement. Cependant, quelle que soit la concentration en oxyde de fer, le taux d'incorporation reste supérieur aux cellules témoins ayant incorporées le dichromate de potassium.

\* Uridine : nucléoside constitué d'une nucléobase (uracile base azoté) liée à un ribose

† MTT : test colorimétrique permettant de déterminer le nombre de cellules vivantes après une exposition au sel jaune de tétrazolium MTT (bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tétrazolium). Sous l'action de la cellule vivante (succinate déshydrogénase mitochondriale), le sel est réduit et un produit de couleur bleu-violet est formé. La proportion de cellules vivantes est proportionnelle à l'intensité lumineuse. Un spectrophotomètre est utilisé pour mesurer cette intensité

‡ Bleu de trypan : test de coloration des cellules mortes. Cette molécule est incorporée définitivement par les cellules mortes alors que les cellules vivantes la relarguent



La détermination de la concentration inhibitrice médiane  $IC_{50}$  en fonction de la viabilité des cellules HepG2 incubées 24h en présence de différentes concentrations d'oxydes de fer est alors déterminée en Figure 115.

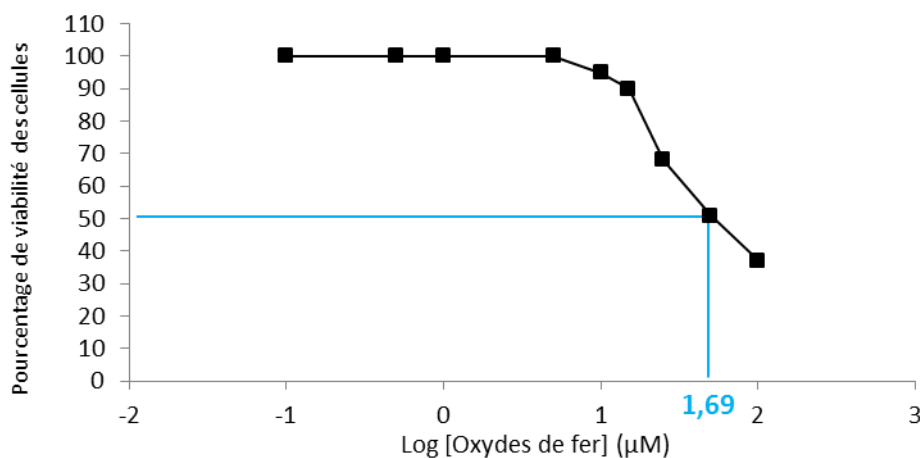


Figure 115 : Concentration inhibitrice  $IC_{50}$  des nanoparticules d'oxydes de fer  $Fe_3O_4-NH_2$

Les résultats indiquent qu'au-delà de 1,69  $\mu M$  (11,34  $\mu g.mL^{-1}$ ), la concentration en oxydes de fer de type  $Fe_3O_4-NH_2$  commence à être toxique. Plus de 50% des cellules meurent au-dessus de cette concentration.

La réversibilité de l'effet cytotoxique est testée. Pour cela, l'activité de synthèse de l'ARN est mesurée selon différentes concentrations en oxydes de fer (50 et 100  $\mu g.mL^{-1}$ ) et en présence (T+) ou non (T-) du dichromate de potassium. Les cellules HepG2 ont été exposées aux nanoparticules durant 24h puis uniquement dans un milieu de culture MEM (Figure 116).

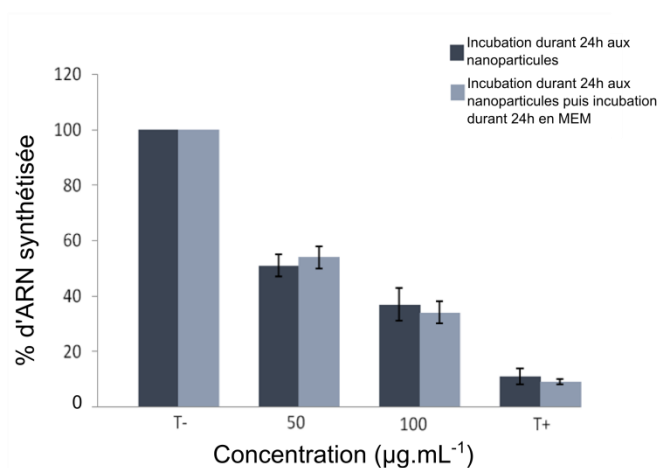


Figure 116 : Tests de la réversibilité de la cytotoxicité des nanoparticules  $Fe_3O_4-NH_2$  sur des cellules HepG2 exposées durant 24h puis exposées uniquement en MEM durant 24h

Lorsque les nanoparticules sont exposées uniquement au MEM après une exposition aux nanoparticules d'oxydes de fer, le pourcentage d'ARN synthétisée reste identique à celui observé après

une exposition de 24h aux nanoparticules. Les nanoparticules d'oxydes de fer de type  $\text{NH}_2$  génère une cytotoxicité irréversible.

Cependant, l'évaluation de la viabilité cellulaire (cellules HepG2) au test Alamar Blue® ne montre aucune modification de l'activité cellulaire après une exposition de 24h à la même gamme de concentration en oxydes de fer ( $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-NH}_2$ ) (Figure 117). La viabilité cellulaire reste proche de 100% quelle que soit la concentration en nanoparticules  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-NH}_2$ . Ce résultat démontre la pertinence mais aussi l'extrême sensibilité du test de cinétique d'incorporation de l'uridine tritiée pour évaluer la cytotoxicité des nanoparticules.

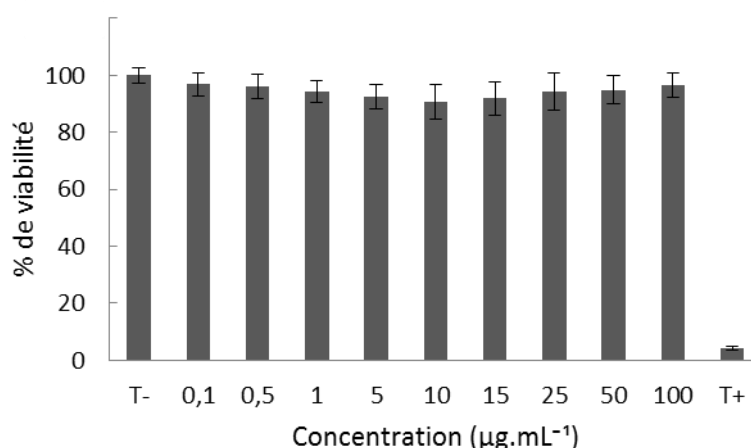


Figure 117 : Evaluation de la viabilité des cellules HepG2 incubées 24h en présence de différentes concentrations en oxydes de fer (0,1, 0,5, 1, 5, 10, 15, 25, 50, 100, T- : en l'absence d'agent extérieur et T+ : en présence de dodécylsulfate de sodium  $\text{NaC}_{12}\text{H}_{25}\text{SO}_4$ ) : test Alamar Blue

#### 3.4.1.2 Génotoxicité des nanoparticules $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-NH}_2$

La génotoxicité des nanoparticules, très rarement étudiées dans la littérature, est évaluée par le test des comètes (Figure 118 et Figure 119). Son principe est présenté en Annexe 14. Si les nanoparticules se révèlent être génotoxiques, des cassures sur l'ADN lors des processus enzymatiques de réparation des dommages ou de fragmentation de l'ADN apparaissent. Il est alors possible à partir de ce test de détecter et quantifier la détérioration de l'ADN. Les échantillons exposés aux nanoparticules sont comparés à deux échantillons témoins : T-FPG (cellules HepG2 exposées au formamidopyrimidine DNA glycosylase (FPG) permettant la détection de dommages génotoxiques spécifiques) et T+FPG (cellules HepG2 exposées au FPG et méthanesulfonate de méthyle  $\text{C}_2\text{H}_6\text{O}_3\text{S}$  (25  $\mu\text{M}$ )).

\* Test Alamar Blue® : test basé sur la détection d'une activité métabolique. L'Alamar Blue est un indicateur fluorométrique/colorimétrique qui permet d'évaluer les fonctions métaboliques et la santé cellulaire. C'est un indicateur d'oxydation-réduction (faiblement toxique pour les cellules et non carcinogène) qui change de couleur ou de fluorescence en réponse à une réduction chimique du milieu de croissance cellulaire. Les cellules viables et dans un état de croissance maintiennent un environnement réduit alors que dans le cas contraire un environnement oxydé est présent. Une fois réduit par les cellules active métaboliquement, l'indicateur bleu et peu fluorescent devient rouge et hautement fluorescent. La quantité de fluorescence produite est proportionnelle au nombre de cellules vivantes

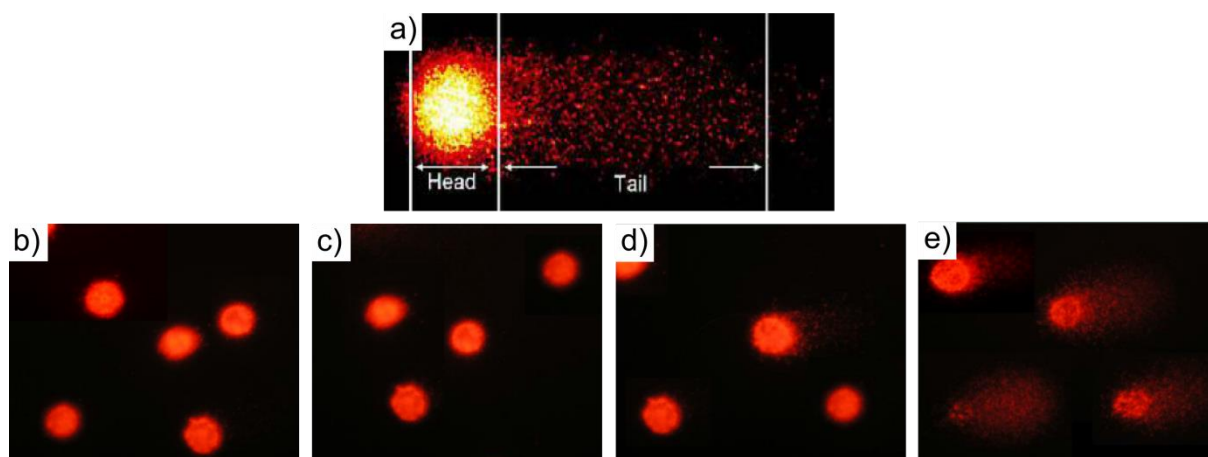


Figure 118 : Images du test comètes des cellules HepG2 exposées aux nanoparticules d'oxydes de fer  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-NH}_2$  selon différentes concentrations : a) Zoom des cassures d'ADN (pas d'exposition aux nanoparticules : schéma type dans le cas des cassures de l'ADN), b) T- (sans agent), c)  $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , d)  $15 \mu\text{g.mL}^{-1}$  et e) T+ (présence de  $\text{C}_2\text{H}_6\text{O}_3\text{S}$  ( $25 \mu\text{M}$ ))

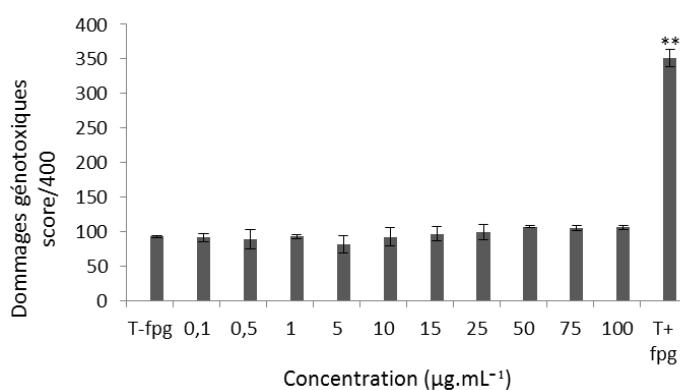


Figure 119 : Evaluation de la génotoxicité des nanoparticules d'oxydes de fer  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-NH}_2$  à différentes concentrations ( $0,1$ ,  $0,5$ ,  $1$ ,  $5$ ,  $10$ ,  $15$ ,  $25$ ,  $50$ ,  $75$  et  $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) sur des cellules HepG2 et sur des cellules témoins sans agents (T-) et en présence de  $\text{C}_2\text{H}_6\text{O}_3\text{S}$  (T+)

Quelle que soit la concentration des nanoparticules d'oxydes de fer, aucun effet génotoxique n'est observé. Les dommages génotoxiques se situent aux alentours de 100 sur la gamme entière de concentration. Ces dommages s'élèvent à 356 dans le cas des cellules exposées au méthanesulfonate de méthyle (score/400). Ces résultats sont aussi confirmés visuellement sur la Figure 118. En effet, jusqu'à  $15 \mu\text{g.mL}^{-1}$  en oxyde de fer ( $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-NH}_2$ ), aucune cassure de l'ADN n'est observée contrairement au témoin T+FPG.

Ainsi les nanoparticules  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-NH}_2$  ne montrent pas d'effet génotoxique sur des concentrations importantes (jusqu'à  $100 \mu\text{g/mL}$ ) alors que les concentrations supérieures ou égales à  $25 \mu\text{g.mL}^{-1}$  commençaient à montrer un effet cytotoxique sur les cellules HepG2.

Des images MET de cellules HepG2 exposées aux nanoparticules  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-NH}_2$  à une concentration de  $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$  sont réalisées (Figure 120). Après 4h d'exposition, une internalisation des nanoparticules apparaît avec une localisation vésiculaire.

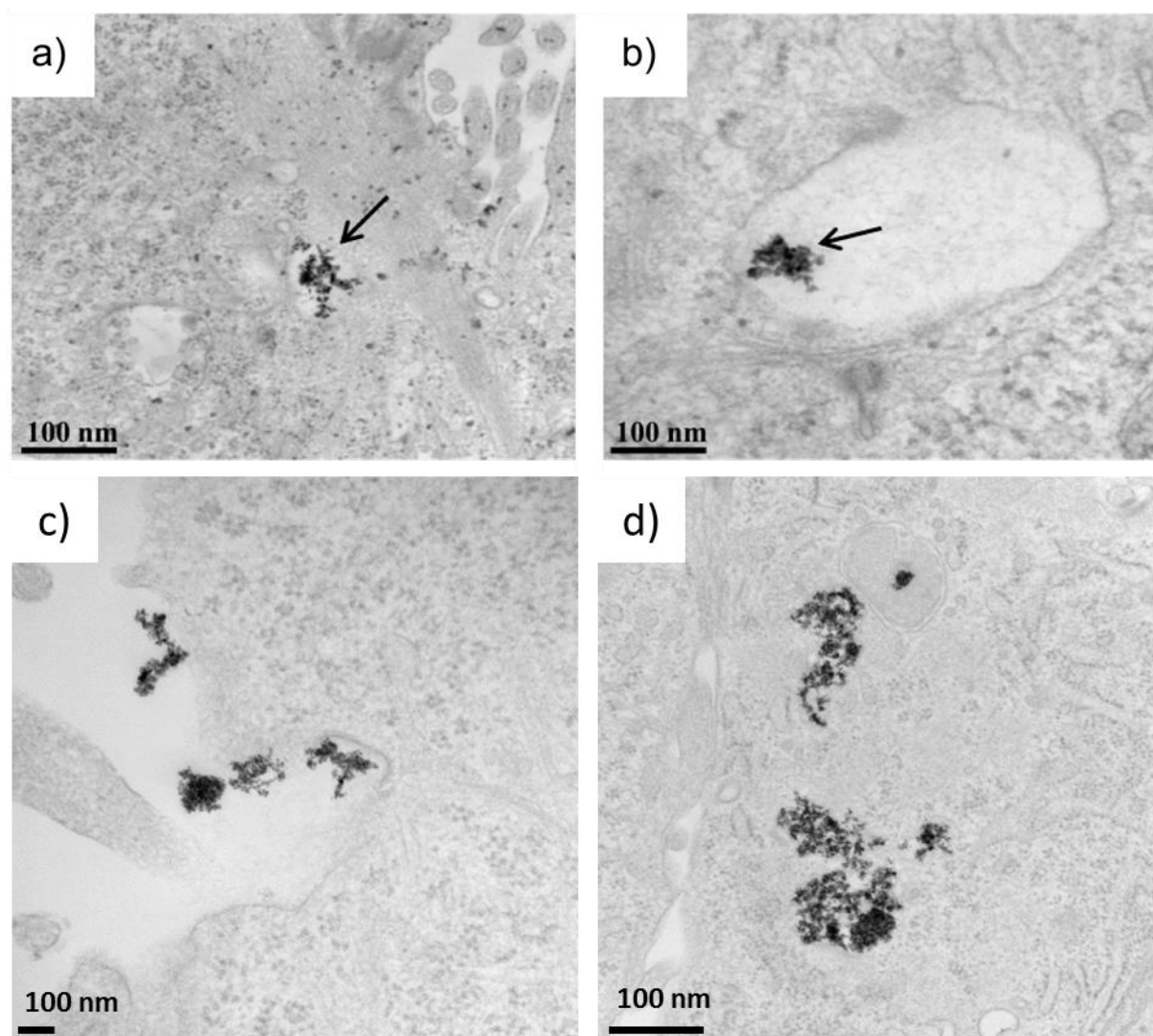


Figure 120 : (a-b) Clichés MET des cellules HepG2 après 4h d'exposition aux nanoparticules  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-NH}_2$

Dernièrement, un test permettant de mesurer le stress oxydant que peuvent engendrer les nanoparticules SPIONs, en partenariat avec le laboratoire BioPeroXiL, a été réalisé (Figure 121). Ce test nommé DHE\* (marquage de la dihydroéthidine) permet la mesure de la quantité d'anions superoxyde  $\text{O}_2^{\cdot-}$ † (également noté  $\text{O}_2^-$ ) produite par les nanoparticules.

\* Test DHE : les anions superoxydes ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ) sont détectés par coloration à la dihydroéthidine. Cette molécule non fluorescente s'oxyde rapidement sous l'action des anions superoxydes et devient fluorescent (éthidium  $\lambda_{\text{excitation}} = 480 \text{ nm}$ ) et s'intercale au niveau des bases azotés de l'ADN, ce qui assure sa rétention et sa détection dans les cellules par cytométrie de flux  
 †Superoxyde  $\text{O}_2^-$  : espèce réactive de l'oxygène qualifiée de pro-oxydant

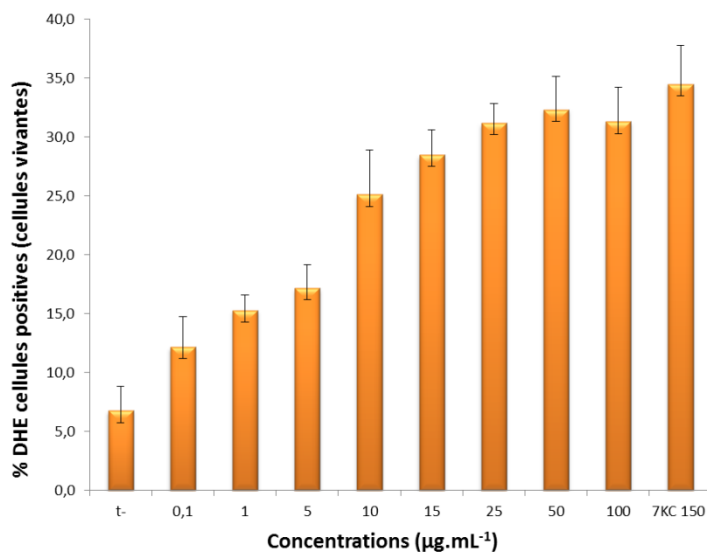


Figure 121 : Evaluation du stress oxydatif des cellules HepG2 exposées aux nanoparticules  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-NH}_2$  (T- : cellules HepG2 exposées à aucun agent extérieur et T+ : cellules HepG2 exposées au 7-KC (7-cétocholestérol ou 7-KetoCholesterol en anglais)\* à une concentration de  $150\mu\text{M}$ )

Les nanoparticules  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-NH}_2$  génèrent un stress oxydatif qui est susceptible de générer par la suite des mutations de l'ADN, des altérations des membranes cellulaires ou encore des oxydations irréversibles de protéines. Ce résultat pourrait expliquer la cytotoxicité des nanoparticules observée précédemment grâce au test de cinétique d'incorporation de l'uridine tritiée.

### 3.4.1.3 Conclusion

A partir d'une concentration de  $25 \mu\text{g.mL}^{-1}$  en nanoparticules  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-NH}_2$ , une cytotoxicité apparaît lors du test d'incorporation de l'uridine tritiée. Les tests habituellement utilisés pour déterminer ou non le potentiel cytotoxique des nanoparticules n'indiquent pas de cytotoxicité (Alamar blue, MTT). Ce test apparaît donc comme très sensible. Cependant, les concentrations habituellement injectées pour de l'imagerie IRM (environ  $15\mu\text{g}_{\text{Fe}_3\text{O}_4}.\text{mL}^{-1}$ ) ne sont pas dans la gamme posant problème. Cette toxicité pourrait provenir du stress oxydatif généré par les SPIONs. La génotoxicité des SPIONs- $\text{NH}_2$  a été évaluée sur une large gamme de concentration en oxydes de fer ( $0,1$  à  $100 \mu\text{g}_{\text{Fe}_3\text{O}_4}.\text{mL}^{-1}$ ). Aucune génotoxicité n'est avéré.

## 3.4.2 Applications pour la médecine ORL

Les nanoparticules  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-NH}_2\text{-FITC}$  conçues pour une application biologique en IRM/IO sont testées et injectées au contact de la fenêtre ronde<sup>†</sup> (Figure 108) préalablement perforée sur des rats. Elles sont guidées par des aimants jusqu'à la cochlée. De volume faible ( $200 \mu\text{L}$  chez l'homme et  $10\mu\text{L}$  chez le rat), la cochlée est susceptible d'être traumatisée par l'injection des nanoparticules. Des test auditifs sont donc mis en place.<sup>328</sup>

\* 7KC : le 7-cétocholestérol est un oxystérol (produit d'oxydation du cholestérol) qui résulte d'une attaque radicalaire.

† Fenêtre ronde : membrane qui permet la communication entre l'oreille moyenne et interne tout empêchant la périlymphe (liquide de composition ionique proche du liquide céphalo rachidien) de sortir de l'oreille

### 3.4.2.1 Protocoles

Cinq rats adultes mâles type Wistar de 250 à 300g (Charles River, L'Arbresle, France) ont été utilisés dans le cadre de cette étude. Ces travaux ont reçu l'autorisation du comité d'éthique et du Ministère de la Recherche et de l'Enseignement Supérieur.

L'acte chirurgical se déroule après une anesthésie générale avec une induction par inhalation d'isoflurane 2,5%. Ce taux est maintenu entre 2 et 3 % durant l'opération. L'oreille gauche des animaux a reçu l'injection du gel de nanoparticules (5mg/mL) (gel composé d'acide hyaluronique (PROVISC®) dans l'objectif d'accroître la viscosité du mélange afin qu'il reste sur la fenêtre ronde). L'oreille droite sert de témoin (Figure 122). Une fois injectées, les nanoparticules sont mobilisées à l'aide d'un aimant disposé selon quatre positions différentes durant 10 min (Figure 123). L'incision réalisée au cours de l'acte chirurgical est recousue à l'aide de fils non résorbables de type Ethicon 3.0.

Des tests de Potentiels Evoqués Auditif (PEA) sont réalisés J-1, J0, J+7, J+30 à l'aide de l'appareil Echodia de mesure de RT Conception (Clermont Ferrand, France). Les PEA post-opératoire sont effectués après le réveil de l'animal. Une injection de 0,3mg de SOLUPRED a été administrée en intrapéritonéal avant le réveil.

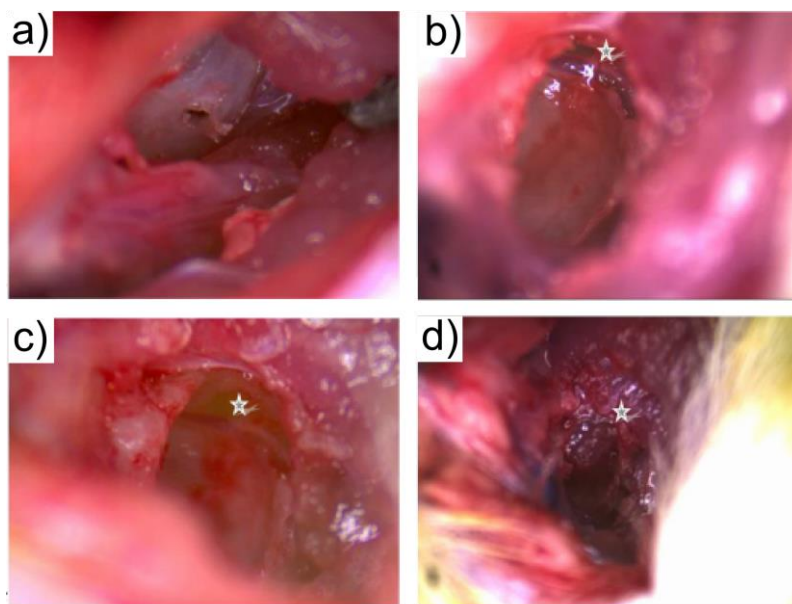


Figure 122 : Zone d'incision : a) ouverture de la bulle, b) fenêtre ronde, c) fenêtre couverte par le gel de nanoparticules et d) colmatage par un fragment musculaire<sup>328</sup>



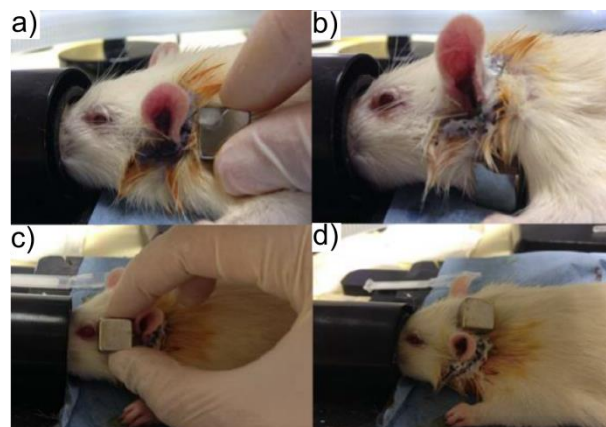


Figure 123 : Positions de l'aimant autour de l'oreille du rat : a) en arrière, b) en bas, c) en avant et d) en haut<sup>328</sup>

Concernant les PEA, quatre électrodes sous-cutanées ont été disposées vers les deux mastoïdes\*, du dos et au niveau du crâne. Dans chaque conduit auditif, un écouteur est placé et joue le rôle de stimulateur sonore. Des stimulations sonores de 2, 8, 16 et 32 kHz avec des intensités variant entre 30 dB et 80 dB sont appliquées.

### 3.4.2.2 Résultats

Les résultats ne montrent aucune différence avant l'opération entre l'oreille gauche et droite. Sur l'ensemble des fréquences testées, l'audition des rats est correcte (Figure 124). Cependant, à 2kHz, les seuils auditifs mesurés sont plus importants et peuvent s'expliquer par la calibration des PEA (précision trop faible dans la détection de ces signaux). Après injection des nanoparticules (J0), une augmentation des seuils auditifs apparaît sur l'oreille gauche. Ces seuils redeviennent normaux après 30 jours.

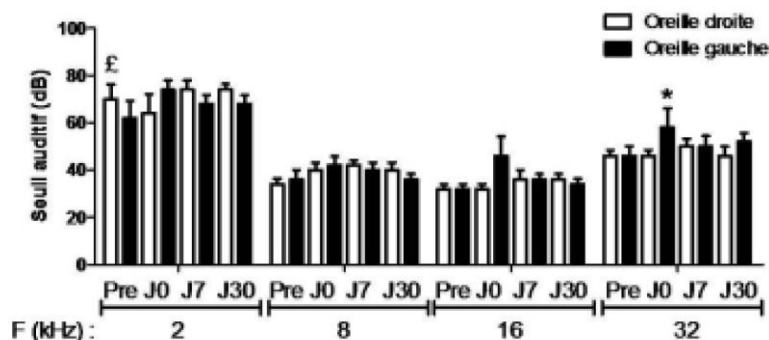


Figure 124 : Seuils auditifs de l'oreille gauche et droite (témoin) 24h avant injection des nanoparticules (Pre) et à J0, J+7 et J+30 après l'injection des nanoparticules. Ils sont mesurés selon différentes fréquences (2,8, 16 et 32 KHz)<sup>328</sup>

Enfin l'étude histologique (coloration au bleu de Prusse) indique la présence des nanoparticules  $Fe_3O_4-NH_2-FITC$  dans le tour basal de la cochlée (trois prélèvements effectués), dans le deuxième tour, dans la strie vasculaire† et dans le modiulus\* et le tout sans modification de la morphologie des cellules de la cochlée (Figure 125).

\* Mastoïde : partie inférieure de l'os temporal (os du crâne se situant sur la partie latérale de la tête)

† Strie vasculaire : épithélium qui tapisse le mur latéral du canal cochléaire et très vascularisé

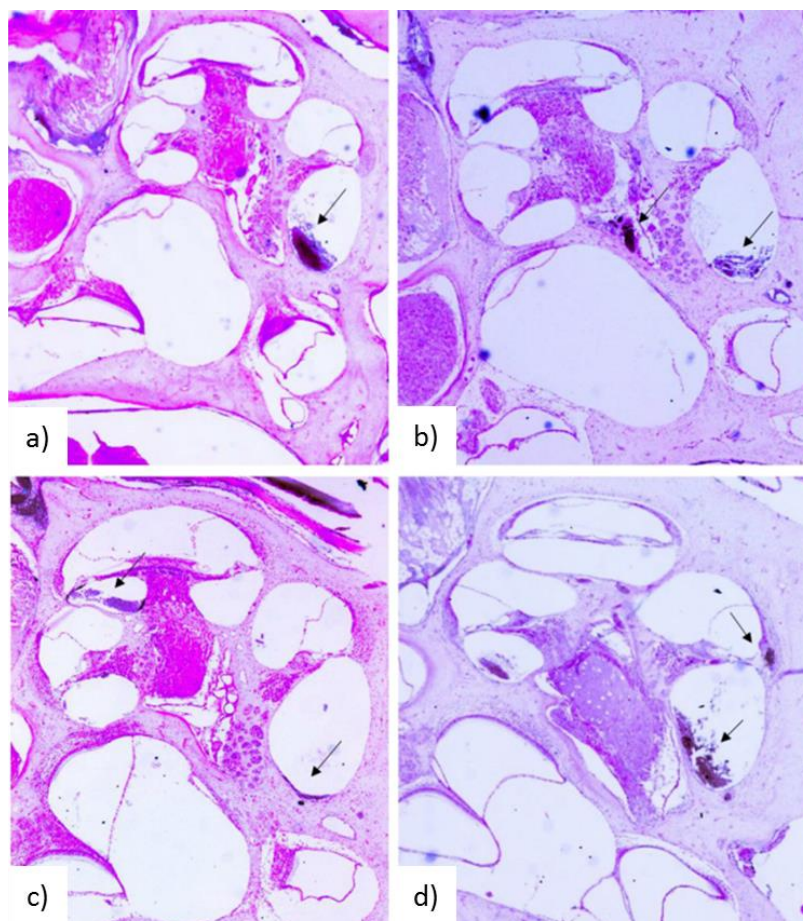


Figure 125 : Présence des nanoparticules a) dans le tour basal de la cochlée, b) dans le tour basal et le modiulus, c) dans le deuxième tour et d) dans la strie vasculaire

### 3.4.2.3 Conclusion

Ces premiers tests ont permis de mettre en évidence après injection des nanoparticules, leur présence dans la cochlée. De plus, l'audition des rats reste correcte. Après 30 jours, les seuils auditifs sont comparables à ceux mesurés avant l'opération. Cette voie ouvre de nouvelles perspectives dans le guidage et l'administration de nanoparticules, véhicules de médicament dans l'oreille interne.

## 3.5 Conclusion

Toutes ces étapes de synthèse en milieu PBS ou DMSO ont permis de montrer que les nanoparticules  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -LDOPA et  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -DHCA issues de la synthèse hydrothermale possédaient des groupements chimiques fonctionnels et libres. Ces groupements sont nécessaires pour greffer des polymères de type PEG afin d'améliorer la furtivité des nanoparticules. Des macrocycles (DOTA, MANOTA et NODAGA) sont aussi greffés sur ces nanoparticules dans le but de complexer un radioélément ( $^{64}\text{Cu}$ ) pour une utilisation en imagerie TEP. Les nanoparticules modifiées par le PEG ont montré une très bonne stabilité colloïdale dans différents milieux ( $\text{NaCl}$  ( $10^{-2}\text{M}$ ) et PBS ( $1\text{x}$ )) et une très bonne réponse comme

\* Modiulus : noyau central de la cochlée



agent de contraste  $T_2$  avec une relaxivité  $r_2$  de  $357 \pm 9 \text{ L.mmol}_{\text{Fe}}^{-1}.\text{s}^{-1}$ . Les nanoparticules possédant à leur surface des macrocycles ont montré une très bonne réponse en IRM avec des valeurs de  $r_2$  proches de  $200 \text{ L.mmol}_{\text{Fe}}^{-1}.\text{s}^{-1}$ . Les macrocycles présents en surface conservent leur capacité à complexer efficacement le  $^{64}\text{Cu}$ . Le taux d'incorporation s'élève respectivement à 87% et 91% pour les nanoparticules  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -LDOPA-NODAGA et  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -LDOPA-MANOTA. Elles sont adaptées pour une application en imagerie bimodale IRM/TEP.

Enfin, une autre application en imagerie bimodale (IRM/IO) a été envisagée. Il est possible de fonctionnaliser les nanoparticules nues par une couche d'APTES puis de greffer en grande quantité un fluorophore (FITC) sur cette couche ( $2,1$  molécules de FITC.nm $^{-2}$ ). Ces nanoparticules ont été internalisées avec succès dans l'oreille interne de rats, sans perte d'audition. De nouveaux tests biologiques ont été déployés pour évaluer la toxicité des nanoparticules : la cinétique d'incorporation d'uridine tritiée (test très sensible) et le test des comètes pour l'évaluation de la génotoxicité.

## **Conclusion générale et perspectives**



## Conclusion

L'objectif de cette thèse était de synthétiser des nanoparticules d'oxydes de fer préfonctionnalisées par des ligands organiques en milieu hydrothermal et en continu. Une dernière étape de fonctionnalisation fut nécessaire pour les utiliser comme agent de contraste bimodal actif en IRM et en TEP.

La première étape a été de synthétiser des nanoparticules de magnétite ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) modifiées en surface par une première couche organique afin d'optimiser la taille finale des nanoparticules, leur état de dispersion et le taux de greffage (nombre de molécules organiques présentes à la surface des nanoparticules). L'objectif était de les employer comme agent de contrastes en IRM avec la nécessité d'avoir des groupements chimiques réactifs à leur surface pour greffer d'autres ligands d'intérêts. Plusieurs paramètres de synthèse ont été testés pour mener à bien cette première étape. L'étude s'est portée sur trois agents organiques différents (DHCA, LDOPA, CA), trois concentrations différentes en agents ( $[\text{molécules organiques}]/[\text{Fe}^{2+}+\text{Fe}^{3+}] = 33, 50 \text{ et } 100\%$ ), trois températures de synthèse ( $90^\circ\text{C}$ ,  $150^\circ\text{C}$  et  $250^\circ\text{C}$ ) et enfin trois lieux différents d'ajout des molécules organiques sur le dispositif hydrothermal en continu (avant la synthèse en présence des ions  $\text{Fe}^{2+}$  et  $\text{Fe}^{3+}$  ou de la base (soude) ou bien en sortie de réacteur après la synthèse des nanoparticules). Les résultats ont montré qu'à  $150^\circ\text{C}$ , le ratio 100% et le lieu d'ajout avec les ions ferreux et ferriques constituaient les meilleurs paramètres pour obtenir des nanoparticules très peu oxydées au cours de la synthèse ( $\delta_{\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-LDOPA}} = 0,000$ ,  $\delta_{\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-DHCA}} = 0,006$ ,  $\delta_{\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-CA}} = 0,072$  et  $\delta_{\text{Fe}_3\text{O}_4} = 0,042$ ), de taille de cristallites inférieure à 20 nm ( $\emptyset_{\text{DRX}}$ ,  $\emptyset_{\text{MET}}$  et  $\emptyset_{\text{magnétique}}$ ) tout en assurant un très bon taux de greffage (8,9 molécules de LDOPA/nm<sup>2</sup>). Les molécules DHCA, LDOPA et CA ont montré un effet antioxydant sur les nanoparticules d'oxydes de fer au cours de la synthèse des nanoparticules en évitant la formation de la phase hématite à haute température ( $250^\circ\text{C}$ ). Enfin, selon ces conditions, les nanoparticules de type  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-LDOPA}$  se sont révélées être le meilleur candidat pour une application biologique. La molécule organique a conduit à un paramètre de maille égal à celui de la magnétite pure ( $a = 8,396 \pm 0,003 \text{ \AA}$ ), une taille de cristallite inférieure à 20 nm, une bonne stabilité des nanoparticules en suspension dans un milieu biologique avec un diamètre hydrodynamique moyen inférieure à 120 nm. Ces poudres  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-LDOPA}$  ont aussi montré une très bonne relaxivité  $r_2$  ( $418 \pm 10 \text{ L.mmol}_{\text{Fe}}^{-1}.\text{s}^{-1}$ ). Pour arriver à une telle amélioration, les protocoles de purification et de stockage des échantillons ont été adaptés. En effet, les étapes pouvant favoriser l'agglomération des nanoparticules entre elles à savoir les lavages par centrifugation et les étapes de lyophilisation ont été évitées. Cette étude novatrice a conduit à la rédaction de deux articles. Toujours dans un souci d'amélioration de protocole et de mise à l'épreuve de la technologie, une autre molécule, le PHA, a été testée pour tenter d'améliorer la stabilité des nanoparticules en suspension. Celle-ci a contribué à diminuer le diamètre hydrodynamique des nanoparticules d'oxyde de fer sans modification de la forme des nanoparticules tout en assurant un très bon taux de greffage à la surface des particules (4,6 molécules de PHA/nm<sup>2</sup>). Tout comme les autres molécules organiques testées, le PHA a modifié favorablement les

propriétés physico-chimiques des oxydes de fer. Ainsi pour la première fois, le PHA a été greffé en continu lors de la synthèse même des nanoparticules d'oxyde de fer.

Après avoir amélioré l'état de dispersion des nanoparticules synthétisées en milieu hydrothermal, des couplages entre les molécules catéchols (DHCA et LDOPA) et des polymères (molécules de polyéthylène glycol) ont été réalisés pour montrer que les groupements chimiques des ligands issus de l'étape de préfonctionnalisation sont fonctionnels. Deux types de MeO-PEG-NH<sub>2</sub> (MeO-PEG<sub>2000</sub>-NH<sub>2</sub> et MeO-PEG<sub>10000</sub>-NH<sub>2</sub>) ont été greffés sur les groupements carboxyliques libres de la LDOPA et DHCA. Ce couplage s'est déroulé selon deux tampons d'activation à pH=4,7 (MES ou PBS). Au cours de cette étude, il en est ressorti que la combinaison des molécules de PEG<sub>2000</sub> et du tampon d'activation MES a assuré à la fois une amélioration du taux de greffage et une meilleure stabilité colloïdale des nanoparticules en milieu MEM. Il a, par exemple, été possible de greffer jusqu'à 0,6 molécules de PEG<sub>2000</sub> sur les nanoparticules Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-LDOPA contre 0,2 PEG<sub>10000</sub>/nm<sup>2</sup>. Ces molécules de PEG, une fois greffées, génèrent un effet stérique important avec un écrantage en potentiel  $\zeta$  passant respectivement de -30 à -15 mV pour les nanoparticules Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-LDOPA et Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-LDOPA-PEG<sub>2000</sub> (tampon d'activation MES). Enfin, en milieu MEM, les nanoparticules Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-PEG<sub>2000</sub> ont montré une bonne stabilité colloïdale avec un diamètre hydrodynamique de 106 ± 1 nm contre 121 ± 1 nm (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-LDOPA) et 150 ± 1 nm (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-LDOPA-PEG<sub>10000</sub>). La taille moyenne est bien inférieure aux deux autres nanoparticules. Enfin la relaxivité  $r_2$  élevée de l'échantillon Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-LDOPA-PEG<sub>2000</sub> (357 ± 9 L.mmol<sub>Fe</sub><sup>-1</sup>.s<sup>-1</sup>) fait de cet oxyde de fer un très bon candidat comme agent de contraste T<sub>2</sub>.

En parallèle, ces mêmes nanoparticules (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-LDOPA et Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-LDOPA-PEG<sub>2000</sub>) ont servi de support pour greffer cette fois-ci des ligands de type macrocycle (DOTA, NODAGA et MANOTA) pour complexer le radioélément <sup>64</sup>Cu en leur centre. Deux types de synthèse ont été réalisées : l'une en milieu PBS et l'autre en milieu DMSO. De façon générale, il s'est avéré qu'en milieu DMSO, les nanoparticules conservées sous forme de poudre assurent un taux de radiomarquage très élevé de l'ordre de 70% pour les nanoparticules fonctionnalisées par le DOTA et de l'ordre de 90% pour celles couplées avec le NODAGA et le MANOTA. Enfin, les échantillons modifiés par le DOTA et le NODAGA ont montré respectivement une valeur de  $r_2$  de 163 ± 10 L.mmol<sub>Fe</sub><sup>-1</sup>.s<sup>-1</sup> et de 197 ± 7 L.mmol<sub>Fe</sub><sup>-1</sup>.s<sup>-1</sup>. Ils sont ainsi adaptés comme agent bimodal pour l'IRM et la TEP. Cependant, contrairement au cas des fonctionnalisations avec le DOTA où les échantillons ont été exclusivement stockés sous forme de poudre, celles réalisées avec le NODAGA en milieu PBS (échantillons stockés sous forme de suspension pour optimiser initialement la stabilité colloïdale) ont conduit à une chute drastique du taux de radiomarquage (4% pour les nanoparticules Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-LDOPA-NODAGA et 11% Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-LDOPA-PEG<sub>2000</sub>-NODAGA). Une durée de stockage importante en suspension (avant et après synthèse) a pu accélérer la désorption de LDOPA de la surface des nanoparticules avec en parallèle une libération d'ions fer qui ont été en mesure de se complexer avec les macrocycles les rendant ainsi inaccessibles pour le cuivre radioactif. Aucune différence entre les deux solvants n'a pu être observée sur la quantité de molécules greffées. Il est donc préférable de stocker les échantillons sous forme de poudre pour maximiser l'efficacité de radiomarquage. Dans ces conditions, les nanoparticules sont aptes pour être utilisées en imagerie bimodale IRM/TEP.

Enfin, une dernière stratégie a été développée. Elle résulte dans la modification de la surface des nanoparticules nues, issues du dispositif hydrothermal, par l'APTES (nanoparticules  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-NH}_2$ ). Cette molécule en plus de conduire à une amélioration de la stabilité des nanoparticules en suspension sert de lien pour greffer une molécule fluorescente (FITC) en quantité suffisante pour une application éventuelle en IRM/IO.

Ces dernières nanoparticules ( $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-NH}_2$ ) n'ont montré aucune génotoxicité et cytotoxicité à l'exception du test à l'uridine tritiée (test très sensible). De même, elles ont montré des résultats très prometteurs pour une application éventuelle en ORL après injection dans les oreilles de rats. En effet, il est possible de les guider efficacement dans la zone souhaitée (cochlée, partie anatomique de l'oreille) tout en préservant l'audition des rats.

Toutes ces étapes successives ont permis de mettre en avant que des nanoparticules d'oxydes de fer synthétisées et fonctionnalisées en milieu hydrothermal continu pouvaient être employées pour greffer d'autres molécules organiques d'intérêts (PEG et macrocycle) et surtout qu'elles sont aptes à être utilisées dans le domaine biomédical (diagnostic) en imagerie bimodale IRM/TEP, là où beaucoup de nanoparticules d'oxydes de fer sont initialement synthétisées par décomposition thermique. Ce côté novateur par la synthèse hydrothermale, en continu et également l'emploi de macrocycles adaptés pour la complexation du cuivre ouvrent de nouvelles perspectives en applications biologiques.

## Perspectives

D'autres études en vue d'améliorer le greffage, la stabilité colloïdale, la conservation des différentes fonctions chimiques des molécules organiques au cours des synthèses hydrothermales peuvent être menées en modifiant certains paramètres.

### **Influence du débit lors des synthèses hydrothermales :**

Le premier paramètre directement lié au dispositif est le débit. Du fait des hautes pressions et de la géométrie du réacteur, un débit plus ou moins important peut générer des régimes turbulents ou non pouvant ainsi impacter sur de nombreuses caractéristiques telles que la taille, l'état d'oxydation mais aussi la conformation spatiale et le taux de greffage de la molécule organique. En effet, compte tenu du temps de synthèse très court des oxydes de fer à l'intérieur du réacteur (de l'ordre de quelques secondes), un débit plus faible que celui sélectionné lors de cette étude conduira à une augmentation du temps de séjour des nanoparticules dans le réacteur. Un temps plus long peut laisser supposer un greffage plus efficace des molécules organiques à la surface des nanoparticules. Cependant une réduction du débit peut en parallèle influencer d'autres paramètres tels que la taille, la forme et l'état d'oxydation. L'optimisation des paramètres de synthèse peut se révéler difficile pour améliorer à la fois le taux de greffage, la taille et l'état d'agglomération des nanoparticules entre elles.

### Influence de la pression au cours de synthèses hydrothermales :

La température et le pH sont deux facteurs qui induisent de potentielles oxydations des molécules LDOPA et DHCA vers des quinones ou des LDOPAchromes. Cependant, il est possible que la pression importante choisie au cours de cette étude (25 MPa) puisse exercer de fortes contraintes sur les molécules organiques pouvant conduire à une modification spatiale et chimique de celles-ci à la surface des nanoparticules. Ainsi, il serait aussi intéressant d'étudier l'influence de la pression. En effet, les difficultés de réaliser des post greffages (Chapitre 3) sur les fonctions amines de la LDOPA pourraient suggérer une modification de cette dernière (LDOPAchrome, quinone...). Il peut être intéressant de voir si d'autres pressions (plus faibles) seraient tout aussi efficaces pour synthétiser des nanoparticules modifiées en surface sans soumettre ces agents à de fortes contraintes (état plus favorable pour la molécule organique).

### Influence d'autres catéchols durant les synthèses hydrothermales :

De nombreuses molécules à base de catéchols existent. La nitroDOPA (Figure 55) peut être un choix idéal pour compléter cette étude. Selon de récentes études, par la présence du groupement nitro ( $\text{NO}_2$ ), elle assure une stabilité dans le temps plus importante des particules d'oxydes de fer en suspension tout en évitant les transformations de la surface des nanoparticules inorganiques (libération d'ions  $\text{Fe}^{2+}$ ).<sup>123, 272</sup> Cependant, son prix peut être un facteur limitant. Cette molécule vient d'être synthétisée dans notre groupe et les premiers greffages réalisés sont prometteurs.

### Pré-fonctionnalisation des molécules organiques :

Pour éviter de possibles interactions des groupements carboxyles et amines des molécules DHCA, LDOPA et nitroDOPA notamment avec la surface des nanoparticules au cours de leur synthèse (§ 2.3.2 et § 2.5.2) ou encore les transformations de la LDOPA en LDOPAchrome (§ 2.5.2) préjudiciables pour greffer efficacement par la suite d'autres molécules organiques (PEG, macrocycles...), il peut être intéressant de protéger ces fonctions réactives (pour rendre les fonctions réactives non réactives) durant la synthèse hydrothermale en continu (Figure 126).

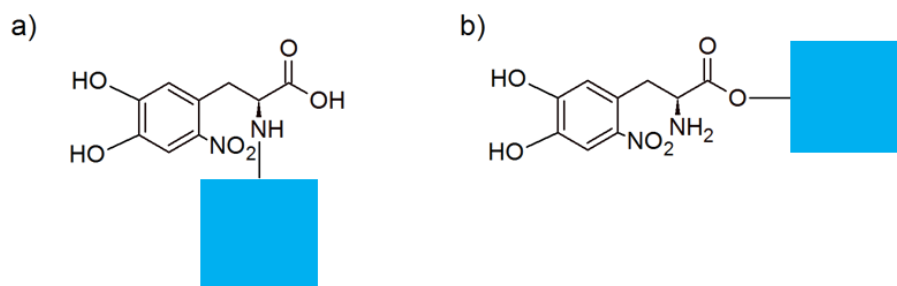


Figure 126 : Protection des groupements a)  $\text{NH}_2$  et b)  $\text{COOH}$  de la nitroDOPA par une molécule chimique

Ces protections vont transformer ces deux groupements ( $\text{NH}_2$  et  $\text{COOH}$ ) en groupements moins réactifs. Elles sont réversibles. Par exemple, la fonction amine peut être protégée par un carboxybenzyle (Cbz) comme illustré Figure 127, puis déprotégée.

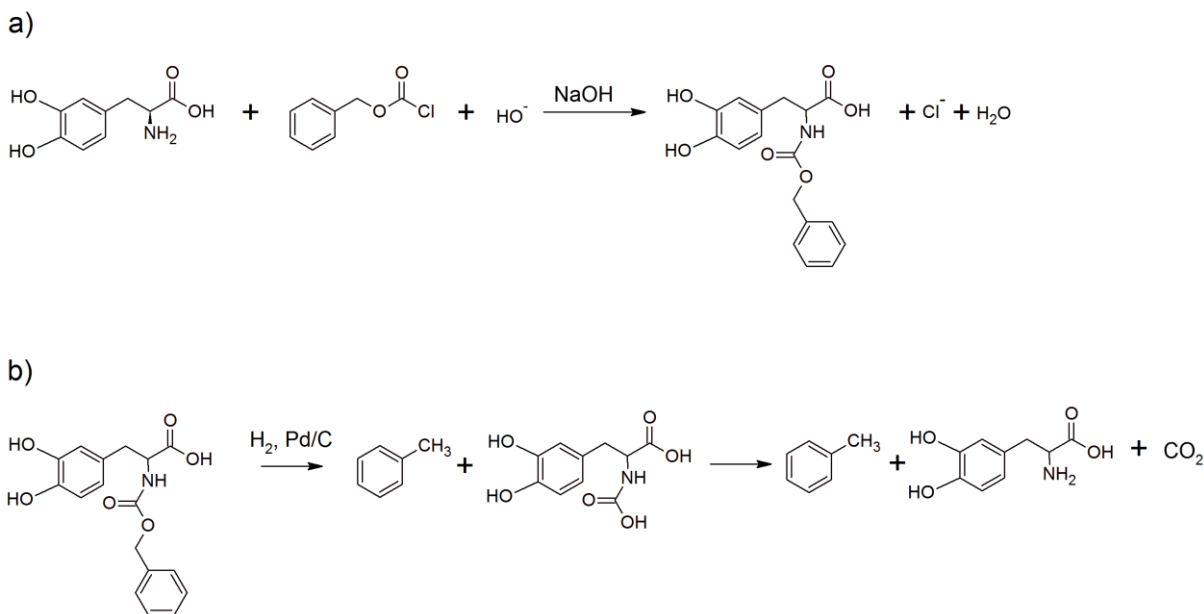


Figure 127 : Réaction chimique consistant en a) la protection d'une amine par un carboxybenzyle et en b) la déprotection

La déprotection s'effectue par exemple en présence de  $H_2$  dans du méthanol et du palladium sur charbon. La fonction acide carbamique résultante (-O-CO-NH-) se décarboxyle spontanément libérant du  $CO_2$ . D'autres protections existent comme avec le groupe 1,1-diméthyléthoxycarbonyle (Boc).

En ce qui concerne le groupement carboxyle, il est possible de l'estérifier à l'aide de méthanol, d'alcool benzylique ou d'éthanol. La déprotection se déroule par saponification ou par hydrogénolyse catalytique sur Pd.

Une fois déprotégés, ces groupements seront totalement libres et fonctionnels pour greffer d'autres molécules. Cependant, il faut prendre en considération que si cette étape (protection) est réalisée, l'effet dispersant généré par les groupements  $COO^-$  ou  $NH_3^+$  au cours de la synthèse hydrothermale en continu peut être perdu et une agglomération des particules peut apparaître à cause de la perte de l'effet électrostatique. Il peut se révéler difficile de trouver un juste compromis.

Cependant, pour tenter de conserver cet effet dispersant (répulsion), la réalisation d'une autre étude (Figure 128) portant sur le greffage de PEG sur les fonctions précédemment cités de la LDOPA, nitroDOPA ou le DHCA peut se révéler très bénéfique. Les particules d'oxydes de fer seront directement fonctionnalisées avec le nouvel agent conçu (LDOPA+PEG, nitroDOPA+PEG ou DHCA+PEG). L'ajout du PEG permet de fournir un effet stérique et de la furtivité (pour les applications biologiques) aux nanoparticules. Cette nouvelle molécule protège les fonctions susceptibles d'interagir entre elles ou avec la nanoparticule et bénéficie du pouvoir chélatant important des catéchols avec la surface des nanoparticules d'oxydes de fer. Cependant, il sera peut-être nécessaire de diminuer la température de synthèse car les PEG restent fragiles, par exemple à  $150^\circ C$ .



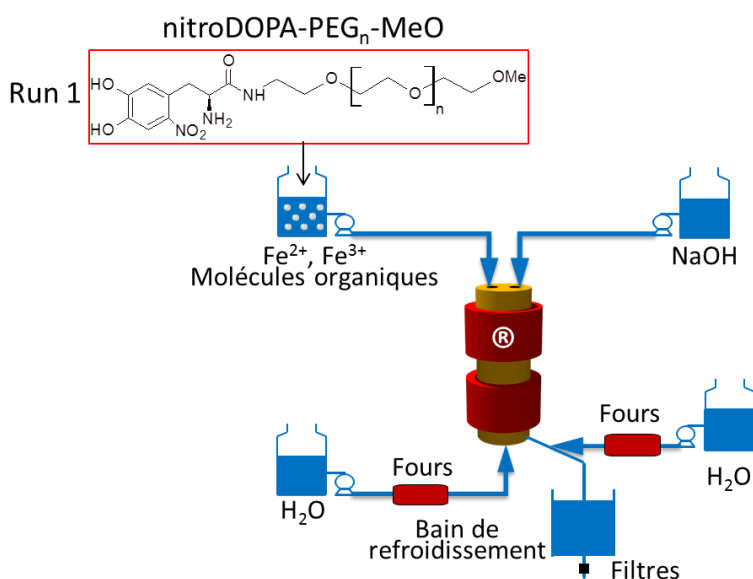


Figure 128 : Ajout de nitroDOPA-PEG<sub>n</sub>-MeO en run 1 avec les ions ferreux et ferriques à l'aide du dispositif en continu

La nouvelle voie de greffage installée sur le dispositif hydrothermal faisant référence au run 3 (Figure 129) (§ 2.5.2) permet une fonctionnalisation des nanoparticules « post-synthèse ». Même si cette voie de fonctionnalisation n'est pas la plus pertinente dans cette étude pour l'ajout de LDOPA, de DHCA et d'acide citrique (effet antioxydant moindre et greffage moins concluant), elle n'en reste pas moins toute aussi intéressante pour greffer d'autres molécules. En effet, l'étude précédemment menée a montré que la meilleure voie de greffage en terme de stabilité, d'effet antioxydant et de taille reste la run 1 (voie acide) pour ajouter les molécules CA, LDOPA et DHCA. Il est donc envisageable de venir greffer *in situ via* la run 3 des PEG pour tenter d'améliorer la stabilité des suspensions. Cependant, compte tenu du pH fortement basique en sortie de réacteur (pH = 12), il sera important de tamponner le milieu PEG en sortie de réacteur (avec du PBS par exemple) vers un pH neutre pour assurer les activations des groupements ciblés et le greffage (Figure 129).

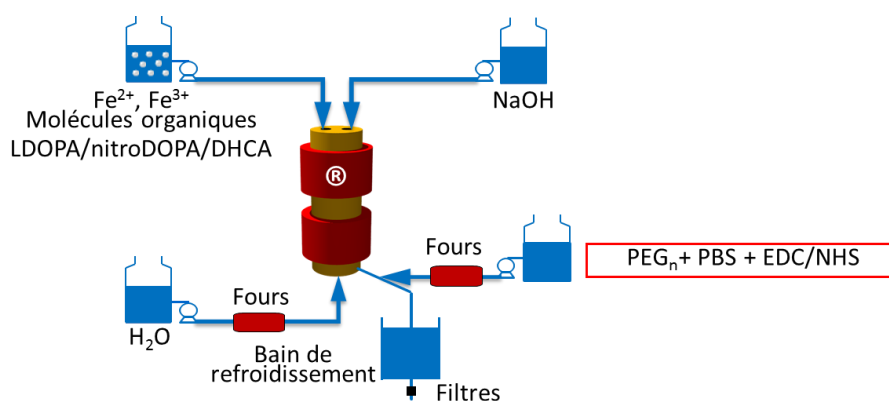


Figure 129 : Greffage *in situ* en run 3 des molécules PEG<sub>n</sub> sur l'aide du dispositif en continu

Concernant les greffages des molécules d'intérêts, des améliorations sont aussi envisageables.

### Utilisation de la chimie clic pour greffer les macrocycles :

Face aux problèmes rencontrés concernant les greffages des macrocycles, la mise en place d'une chimie clic peut s'avérer très efficace et pertinente. Le temps de réaction de ce type de chimie est de quelques minutes contre quelques heures pour la chimie classique. L'utilisation de la chimie clic catalysée par le cuivre n'est pas envisageable à cause de la présence des macrocycles (complexation non désirée). Pour cela, une chimie clic sans cuivre basée sur des réactions bioorthogonales est nécessaire (Figure 130). Elle résulte de la réaction entre une molécule possédant un azide ( $N_3$ ) et une molécule possédant un alcyne contraint tels qu'un cyclooctyne (alcyne alicyclique possédant 8 atomes de carbone dans son cycle).

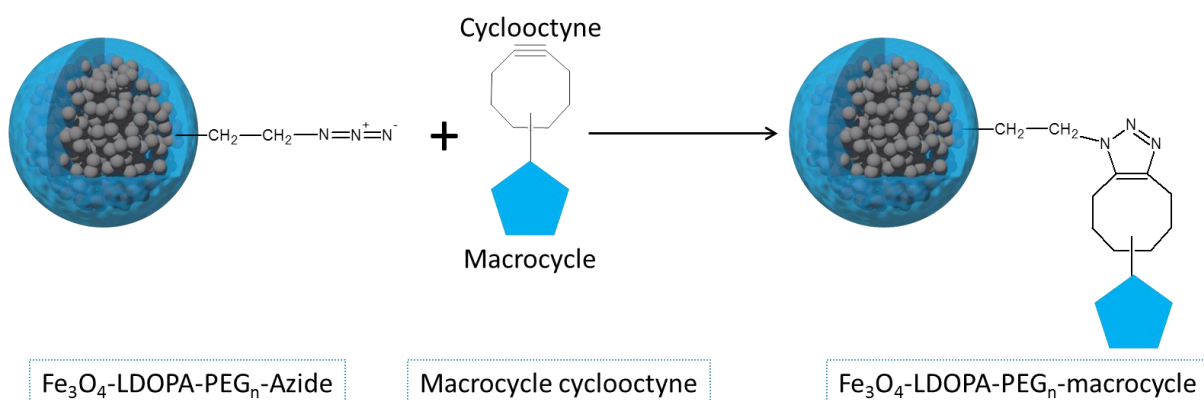


Figure 130 : Greffage de macrocycle cyclooctyne sur les nanoparticules Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-LDOPA-PEG-Azide

### Greffer le macrocycle sur la nitroDOPA en 1<sup>ère</sup> étape :

Une synthèse nitroDOPA-macrocycle en première étape suivie ensuite d'une fonctionnalisation avec les nanoparticules non modifiées en surface est également une voie à explorer (Figure 131).

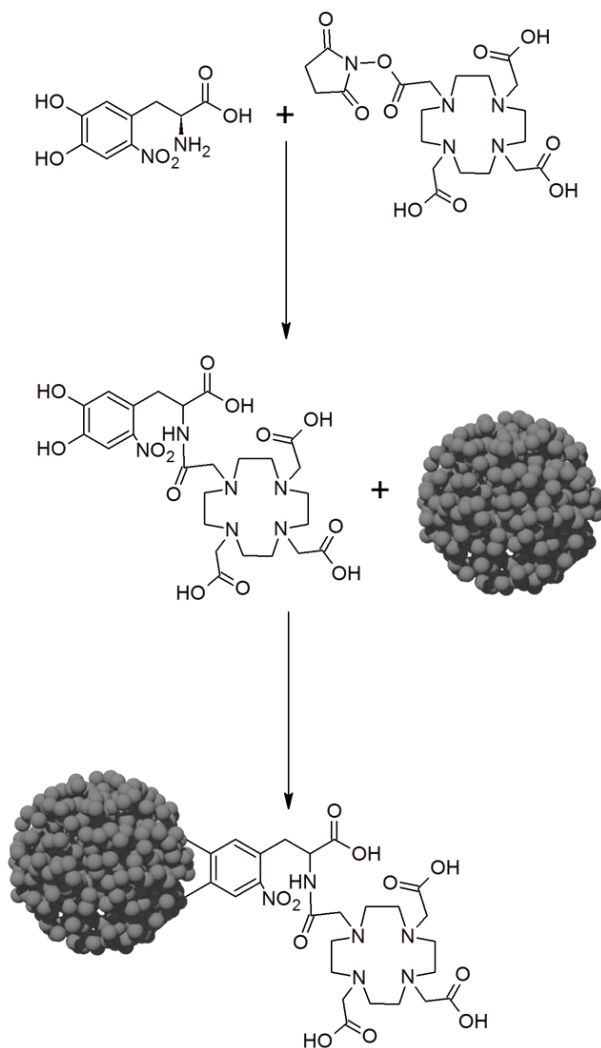


Figure 131 : Greffage du DOTA-NHS sur la nitroDOPA pour fonctionnaliser des nanoparticules de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$

#### Pré-marquer le macrocycle avant le greffage :

Il peut être également intéressant de procéder à un marquage inverse, c'est-à-dire préalablement radiomarquer le macrocycle puis greffer ce dernier sur les nanoparticules pour éviter ainsi des complexations non désirées par la présence de certains sels issus des synthèses (sels métalliques ou sels minéraux) (Figure 132).

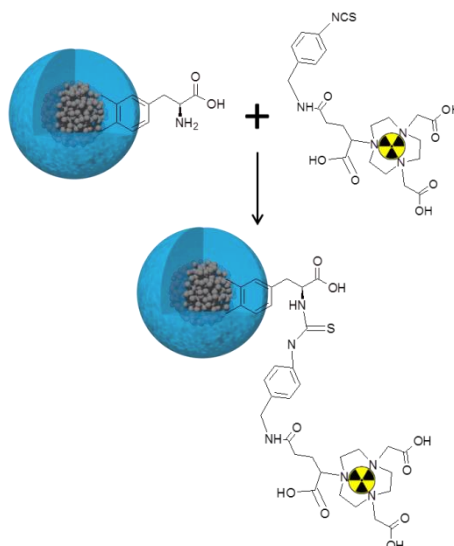


Figure 132 : Schéma de radiomarquage inverse du NODAGA-NCS suivi du greffage sur les nanoparticules Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-LDOPA

#### Ajout de PEG bifonctionnels :

Une autre voie à étudier consiste à utiliser des PEG possédant des groupements terminaux fonctionnels et réactifs pour greffer les macrocycles à leur extrémité. Ces macrocycles seront alors éloignés de la surface des nanoparticules et l'accès du <sup>64</sup>Cu à ces derniers peut être facilité.

#### Greffage de protéines en vue d'une application cardiovasculaire (travail post-doctoral de T. Courant actuellement au laboratoire) :

Dans le but de développer un agent bimodal actif en IRM et en TEP pour une application cardiovasculaire, l'Annexine V sera greffée à la surface des nanoparticules. Cette protéine possède une forte affinité avec la phosphatidylsérine\*, ce qui en fait un marqueur de choix pour l'apoptose†. Pour cela, des nanoparticules Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-nitroDOPA sont fonctionnalisées par un PEG-OPSS (ortho-pyridyl disulfide) pour greffer cette protéine *via* un échange de thiols (Figure 133). Ce type de PEG améliore la stabilité colloïdale des nanoparticules tout en assurant l'accessibilité des protéines aux récepteurs ciblés. Le groupement pyridyl disulfide est très stable en milieu aqueux et organique comparé au groupement thiol libre (SH) ce qui permet de conserver les nanoparticules en suspension avant fonctionnalisation.

Pour réaliser la bioconjugaison, la protéine est modifiée (Figure 133). Dans un premier temps, des fonctions thiols protégées sous forme de thioacétate sont introduites par réaction entre le SATA (N-Succinimidyl S-AcetylThioAcetate) et les lysines réactives de la protéine. Dans un second temps, les thiols protégés sont rendus libres par action de l'hydroxylamine. Par échange de thiols, la protéine est

\* Phosphatidylsérine : phospholipides se situant habituellement du côté intracellulaire. Il peut se retrouver du côté extracellulaire lors de la mort cellulaire

† Apoptose : mort cellulaire

greffée à la surface des nanoparticules. Les résidus de synthèse sont éliminés par dialyse, filtration à flux tangentielle ou encore chromatographie d'exclusion stérique\*.

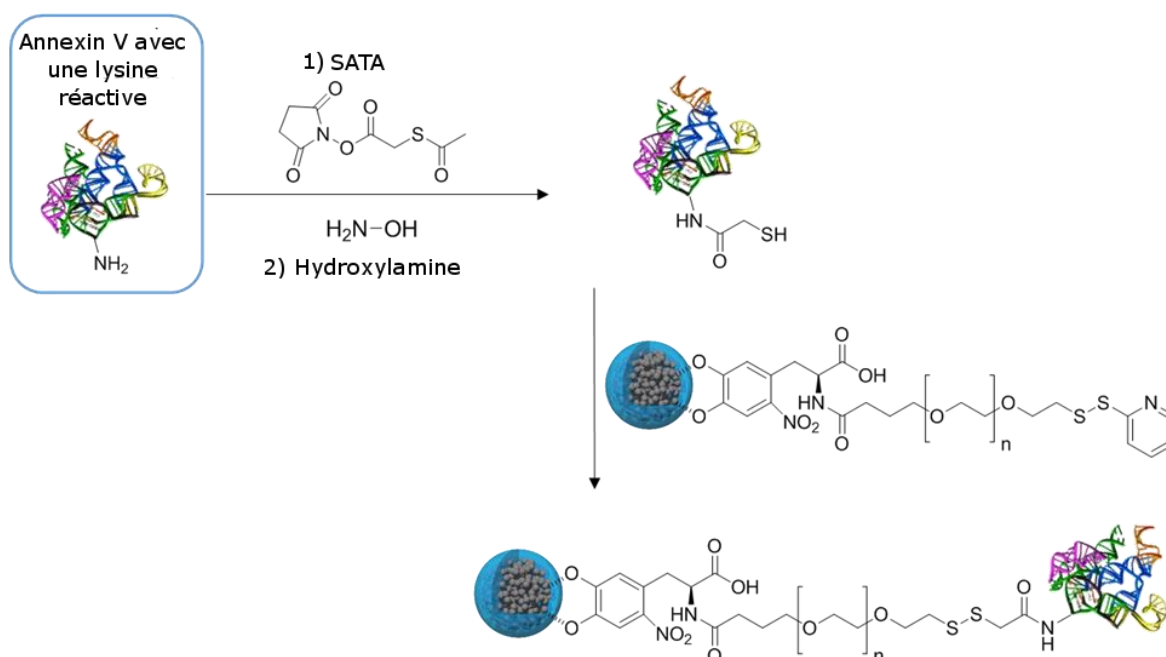


Figure 133 : Greffage de l'Annexin V sur la surface des nanoparticules Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-nitroDOPA-PEG-OPSS

### Tests biologiques :

Les expériences mises en œuvre pour évaluer la cytotoxicité et la génotoxicité des SPIONs-NH<sub>2</sub> devront être reprises pour les nanohybrides retenus pour les applications *in vivo* à savoir pour les suspensions Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-LDOPA-PEG-NODAGA et Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-nitroDOPA-PEG-NODAGA. L'imagerie bimodale de ces nanohybrides est quant à elle programmée pour le mois d'octobre prochain après injection en intraveineuse (IV) sur des modèles de rats sains : IRM (3T) et TEP. La collaboration avec les collègues ORL devra quant à elle conduire à des observations de l'oreille interne en IRM et TEP également.

Pour aller plus loin, il peut être intéressant de concevoir un agent trimodal IRM/TEP/IO avec un cœur magnétique pour l'IRM, des macrocycles pour la TEP et des fluorophores pour l'imagerie optique

\* Chromatographie d'exclusion stérique : chromatographie en phase liquide qui repose sur le principe de séparation de molécules en fonction de leur volume hydrodynamique

# **Annexes**



## Annexe 1 : Tableau récapitulatif des techniques expérimentales

Techniques	Appareils	Caractéristiques
ZFC/FC	Physical Property Measurement System (PPMS) de Quantum Design	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Courbe hystérésis mesurée sur <math>[-10^4 \text{ Oe}; 10^4 \text{ Oe}]</math> à 300K</li> <li>- Champ magnétique appliqué 500 Oe</li> <li>- Température : 5K à 320 K</li> </ul>
DLS	Malvern Zetasizer Nano ZS supplied	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Indice de réfraction : 2,42</li> <li>- Coefficient d'absorption : 0,042</li> <li>- Angle de rétrodiffusion : <math>173^\circ</math></li> <li>- Température : <math>25^\circ\text{C}</math></li> </ul>
MET	JEOL JEM 2100F	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Résolution de 0,19 nm</li> <li>- 200 kV</li> </ul>
XPS	PHI 5000 Versaprobe	<ul style="list-style-type: none"> <li>- <math>E_{K_\alpha}(\text{Al}) = 1486,7 \text{ eV}</math></li> <li>- Diamètre du spot : 200 <math>\mu\text{m}</math></li> <li>- Neutralisation pour minimiser les effets de charges</li> <li>- Calibration sur le pic C1s (284,5eV)</li> <li>- Poudres incluses dans une feuille d'indium</li> </ul>
IR	Bruker Equinox 55 ThermoFisher Iz10	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 2 mg de poudre sont mélangés avec 200 mg de KBr</li> <li>- Résolution : <math>2 \text{ cm}^{-1}</math></li> <li>- Gamme : 4000 à <math>400 \text{ cm}^{-1}</math></li> <li>- Résolution : <math>4 \text{ cm}^{-1}</math></li> <li>- Gamme : 4000 à <math>525 \text{ cm}^{-1}</math></li> </ul>
Raman	inVia Renichaw	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Laser He/Ne (<math>\lambda = 632,8 \text{ nm}</math>)</li> <li>- Densité de puissance : <math>\sim 3 \text{ kW/cm}^2</math></li> </ul>
Potentiel $\zeta$	Malvern Zetasizer Nano ZS supplied	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Echantillon dispersé dans 12 mL</li> <li>- Gamme de pH : 2-12</li> <li>- Titration : <math>[\text{HCl}] = 0,1\text{M}</math>, <math>[\text{NaOH}] = 0,1\text{M}</math> ou <math>[\text{NaOH}] = 0,01\text{M}</math></li> </ul>
BET	Micromeritics Tristar II	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Dégazage : <math>100^\circ\text{C}/24\text{h}</math> sous un vide primaire (P=20 mtorr)</li> <li>- Masse échantillon : 25-200 mg</li> <li>- Molécule sonde : <math>\text{N}_2</math></li> </ul>
ATG	Discovery TGA-TA Instrument	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Débit : <math>\text{N}_2</math> à <math>25 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}</math></li> <li>- Rampe : <math>5^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}</math></li> <li>- Gamme de température : 25 à <math>800^\circ\text{C}</math></li> </ul>
DRX	D5000 Siemens D8 Bruker	<ul style="list-style-type: none"> <li>- <math>\text{Cu } K_\beta</math> (<math>\lambda = 1,39222 \text{ \AA}</math>)</li> <li>- <math>2\theta</math> : <math>20-59^\circ</math></li> <li>- pas : <math>0,03^\circ/150\text{s}</math></li> <li>- <math>\text{Cu } K_{\alpha 1,2}</math> (<math>\lambda_{\alpha 1} = 1,540598 \text{ \AA}</math> et <math>\lambda_{\alpha 2} = 1,544426 \text{ \AA}</math>)</li> <li>- <math>2\theta</math> : <math>25-65^\circ</math></li> <li>- pas : <math>0,026^\circ/52\text{s}</math></li> </ul>
IRM	IRM 3T clinique Siemens Magnetom Trio TIM	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Gamme de concentration en fer : 1, 3, 5, 7, 10 and 20 <math>\mu\text{g/mL}</math></li> <li>- TR = 5000 ms</li> <li>- TE = 8 ms à 256 ms avec un intervalle de 8 ms</li> <li>- FOV (champ de vue) = <math>100 \times 80 \text{ mm}</math></li> <li>- Matrice de pixel : <math>256 \times 204</math></li> <li>- TI : 50, 200, 400, 700, 1000, 1200, 1500, 2500, 4000, 5500 ms</li> </ul>

Tableau 21 : Tableau récapitulatif des techniques expérimentales



## Annexe 2 : Supporting Information - Publication 1 : One-step continuous synthesis of functionalized magnetite nanoflowers (Nanotechnology)

### SUPPORTING INFORMATION

**Manuscript title:** *One-step continuous synthesis of functionalized magnetite nanoflowers*

**Authors:** G. THOMAS,<sup>1</sup> F. DEMOISSON,<sup>1</sup> R. CHASSAGNON,<sup>1</sup> E. POPOVA<sup>2</sup> and N. MILLOT<sup>\*1</sup>

**Affiliation:** <sup>1</sup>Laboratoire Interdisciplinaire Carnot de Bourgogne, UMR 6303 CNRS - Université de Bourgogne Franche-Comté, BP 47870, 21078 Dijon cedex, France

<sup>2</sup>GEMaC, CNRS, Université de Versailles-St-Quentin, 45 avenue des Etats-Unis, 78035 Versailles, France

\*To whom correspondence should be addressed

**Address:** Laboratoire Interdisciplinaire Carnot de Bourgogne, UMR 6303 CNRS - Université de Bourgogne, BP 47870, 21078 Dijon cedex, France

**Email:** [nmillot@u-bourgogne.fr](mailto:nmillot@u-bourgogne.fr)

#### Contents

**Figure S1.** Normalized XPS spectra of Fe2p collected on a) uncoated Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, b) Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-CA, c) Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-LDOPA and d) Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-DHCA nanoparticles

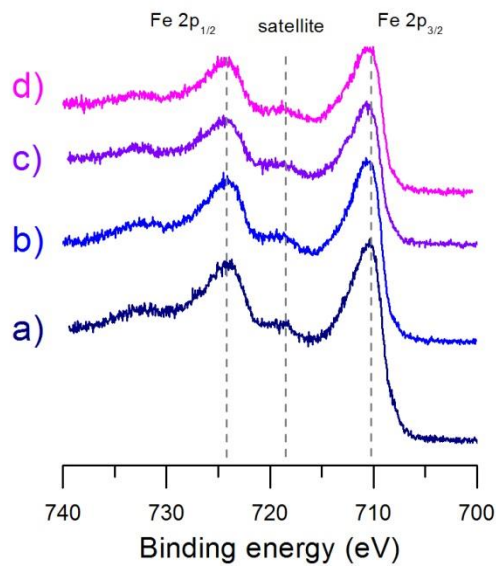
**Figure S2.** TGA curve of a) uncoated Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, b) Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-CA, c) Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-DHCA and d) Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-LDOPA nanoparticles and related amounts of grafted molecules

**Figure S3.** DLS histograms of suspensions of uncoated Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-CA, Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-DHCA and Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-LDOPA nanoparticles at physiological pH, A) in NaCl 10<sup>-2</sup> M, B) in PBS (0.1M) and C) in MEM. Suspensions are beforehand submitted to ultra-sound treatment

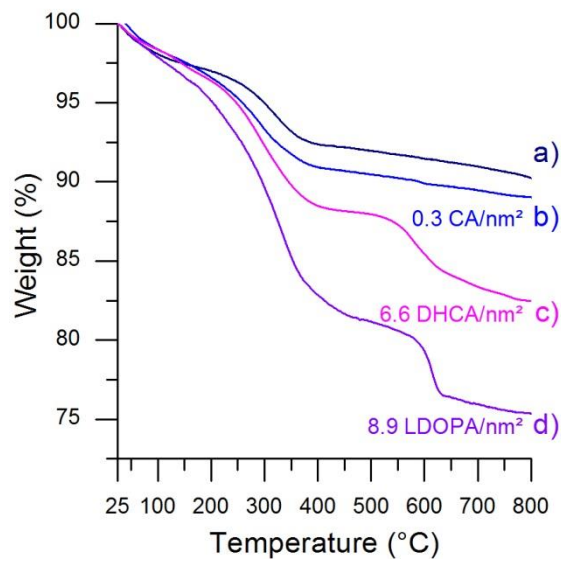
**Figure S4.** Magnetization curves vs. 1/H (Oe) of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> and Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-CA NPs

**Table S1.** Peak positions of the XPS Fe 2p peaks for Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-CA, Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-LDOPA and Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-DHCA nanoparticles

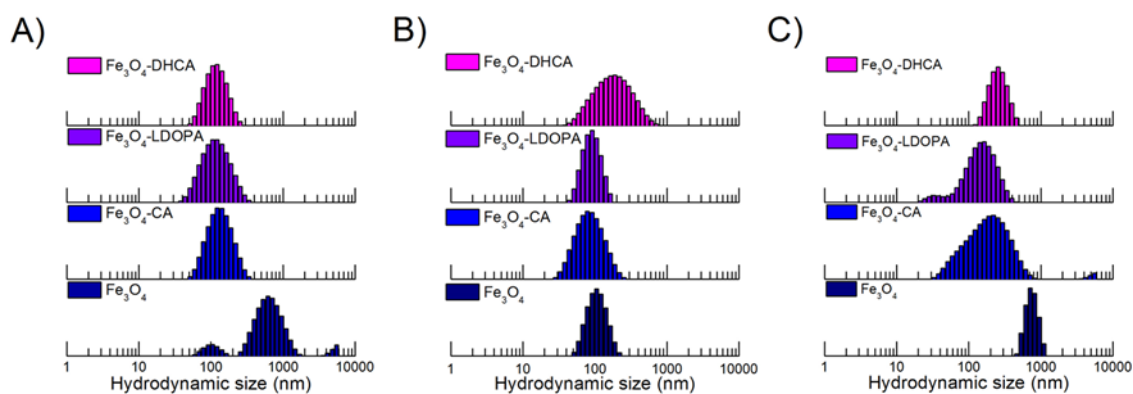
**Table S2.** Hydrodynamic diameters determined by DLS of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-CA, Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-DHCA and Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-LDOPA nanoparticles at physiological pH, in NaCl 10<sup>-2</sup> M, PBS (0.1M) and MEM



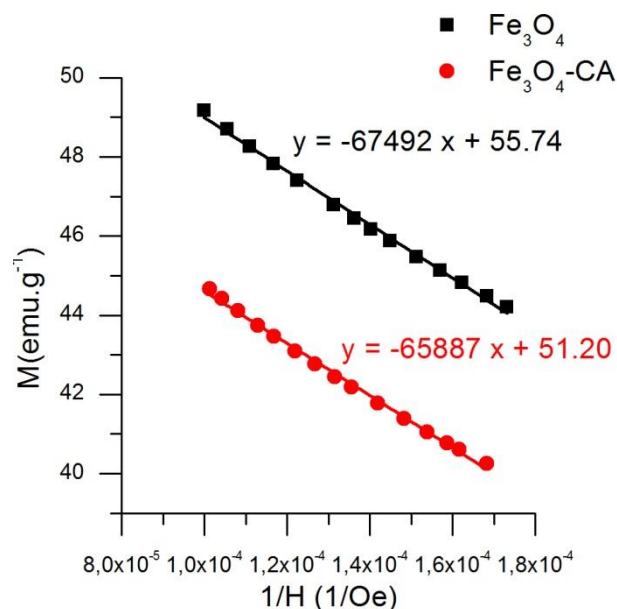
**Figure S1.** Normalized XPS spectra of Fe2p collected on a) uncoated Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, b) Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-CA, c) Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-LDOPA and d) Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-DHCA nanoparticles



**Figure S2.** TGA curve of a) uncoated Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, b) Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-CA, c) Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-DHCA and d) Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-LDOPA nanoparticles



**Figure S3.** DLS histograms of suspensions of uncoated  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ,  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-CA}$ ,  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-DHCA}$  and  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-LDOPA}$  nanoparticles at physiological pH, A) in  $\text{NaCl } 10^{-2} \text{ M}$ , B) in  $\text{PBS (0.1M)}$  and C) in  $\text{MEM}$ . Suspensions are beforehand submitted to ultra-sound treatment



**Figure S4.** Magnetization curves vs.  $1/H$  (Oe) of  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  and  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-CA}$  NPs

	Fe $2p_{1/2}$ (eV)	Satellite Fe $2p_{3/2}$ (eV)	Fe $2p_{3/2}$ (eV)	$\Delta(\text{Satellite- Fe } 2p_{3/2})$ (eV)
$\text{Fe}_3\text{O}_4$	724.0	718.6	710.4	8.2
$\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-CA}$	724.0	718.6	710.4	8.2
$\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-DHCA}$	724.0	718.7	710.3	8.4
$\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-LDOPA}$	724.4	718.9	710.8	8.1

**Table S1.** Peak positions of the XPS Fe 2p peaks for  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ,  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-CA}$ ,  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-LDOPA}$  and  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-DHCA}$  nanoparticles

	$D_H$ (nm)			
	$Fe_3O_4$	$Fe_3O_4$ -CA	$Fe_3O_4$ -LDOPA	$Fe_3O_4$ -DHCA
NaCl $10^{-2}$ M	$434 \pm 26$	$137 \pm 4$	$106 \pm 2$	$124 \pm 2$
PBS	$109 \pm 1$	$76 \pm 1$	$90 \pm 2$	$163 \pm 3$
MEM	$858 \pm 114$	$135 \pm 3$	$121 \pm 1$	$270 \pm 16$

**Table S2.** Hydrodynamic diameters,  $D_H$ , determined by DLS of  $Fe_3O_4$ ,  $Fe_3O_4$ -CA,  $Fe_3O_4$ -DHCA and  $Fe_3O_4$ -LDOPA nanoparticles at physiological pH, in NaCl  $10^{-2}$  M, PBS (0.1M) and MEM

**Annexe 3 : Supporting Information - Publication 2 : Functionalized Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles: influence of ligand addition sequence and pH during their continuous hydrothermal synthesis (RSC Advances)**

**Supporting Information**

**Functionalized Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles: influence of ligand addition sequence and pH during their continuous hydrothermal synthesis**

**G. Thomas, F. Demoisson, O. Heintz, N. Geoffroy, L. Saviot and N. Millot**

*Laboratoire Interdisciplinaire Carnot de Bourgogne UMR 6303 CNRS-Université de Bourgogne Franche-Comté, 9 Av. A. Savary, BP 47870 F- 21078 DIJON Cedex, FRANCE, E-mail: [nmilot@u-bourgogne.fr](mailto:nmilot@u-bourgogne.fr)*

## Contents

Table S1: XPS Fe2p peak positions for Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-LDOPA and Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-DHCA NPs from run{1/a/b}, run{2/a/b} and run{3/a/b}

Fig. S1: Raman spectra of A) Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-LDOPA from run{1/LDOPA/b}, run{2/LDOPA/b} and run{3/LDOPA/b} and B) Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-DHCA synthesized in run{1/DHCA/b}, run{2/DHCA/b} and run{3/DHCA/b} from 200 to 1000 cm<sup>-1</sup> ( $\tau$ : torsion)

Fig. S2: XPS spectra of Fe2p collected on A) Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-DHCA, B) Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-LDOPA NPs from run{1/a/b}, run{2/a/b} and run{3/a/b}

Fig. S3: Raman spectra of A) Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-LDOPA from run{1/LDOPA/b}, run{2/LDOPA/b} and run{3/LDOPA/b} and B) Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-DHCA synthesized in run{1/DHCA/b}, run{2/DHCA/b} and run{3/DHCA/b} from 1000 to 2000 cm<sup>-1</sup> ( $\nu$ : stretching)

Fig. S4: XPS spectra of desummed A) C(1s) Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-DHCA, B) C(1s) Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-LDOPA C) N(1s) contributions measured for Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-LDOPA and D) Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> NPs from run{1/a/b}, run{2/a/b} and run{3/a/b}

Fig. S5: TEM diameters distributions of A) unmodified NPs, B) Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-DHCA NPs and C) Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-LDOPA NPs determined from counting 100 crystallites from run{1/DHCA/b}, run{2/DHCA/b} and run{3/DHCA/b}

Fig. S6: TEM images of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-LDOPA from run{2/LDOPA/100%} A-C) and D) selected area electron diffraction of B)

	<b>a: DHCA</b>				<b>a: LDOPA</b>			
	Fe2p <sub>1/2</sub> (eV)	Satellite Fe2p <sub>3/2</sub> (eV)	Fe2p <sub>3/2</sub> (eV)	Δ(Satellite- Fe2p <sub>3/2</sub> ) (eV)	Fe2p <sub>1/2</sub> (eV)	Satellite Fe2p <sub>3/2</sub> (eV)	Fe2p <sub>3/2</sub> (eV)	Δ(Satellite- Fe2p <sub>3/2</sub> ) (eV)
<b>Ref: Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub></b>	723.9	718.6	710.4	8.2	723.9	718.6	710.4	8.2
<b>Run{1/a/100%}</b>	724.0	718.7	710.4	8.3	724.4	718.9	710.8	8.1
<b>Run{1/a/50%}</b>	724.2	718.7	710.5	8.2	724.3	718.8	710.9	7.9
<b>Run{1/a/33%}</b>	724.1	718.8	710.6	8.2	724.4	718.8	710.6	8.2
<b>Run{2/a/100%}</b>	724.1	n.d	710.5	n.d	724.2	718.6	710.6	8.0
<b>Run{2/a/50%}</b>	724.1	718.7	710.6	8.1	724.1	718.7	710.6	8.1
<b>Run{2/a/33%}</b>	724.1	718.8	710.5	8.3	724.1	718.8	710.7	8.1
<b>Run{3/a/100%}</b>	723.9	718.7	710.5	8.2	724.3	718.7	710.5	8.2
<b>Run{3/a/50%}</b>	724.0	718.6	710.5	8.1	724.2	718.8	710.7	8.1
<b>Run{3/a/33%}</b>	724.0	718.5	710.5	8.0	724.4	718.8	710.7	8.1

Table S1: XPS Fe2p peak positions for Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-LDOPA and Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-DHCA NPs from run{1/a/b}, run{2/a/b} and run{3/a/b}

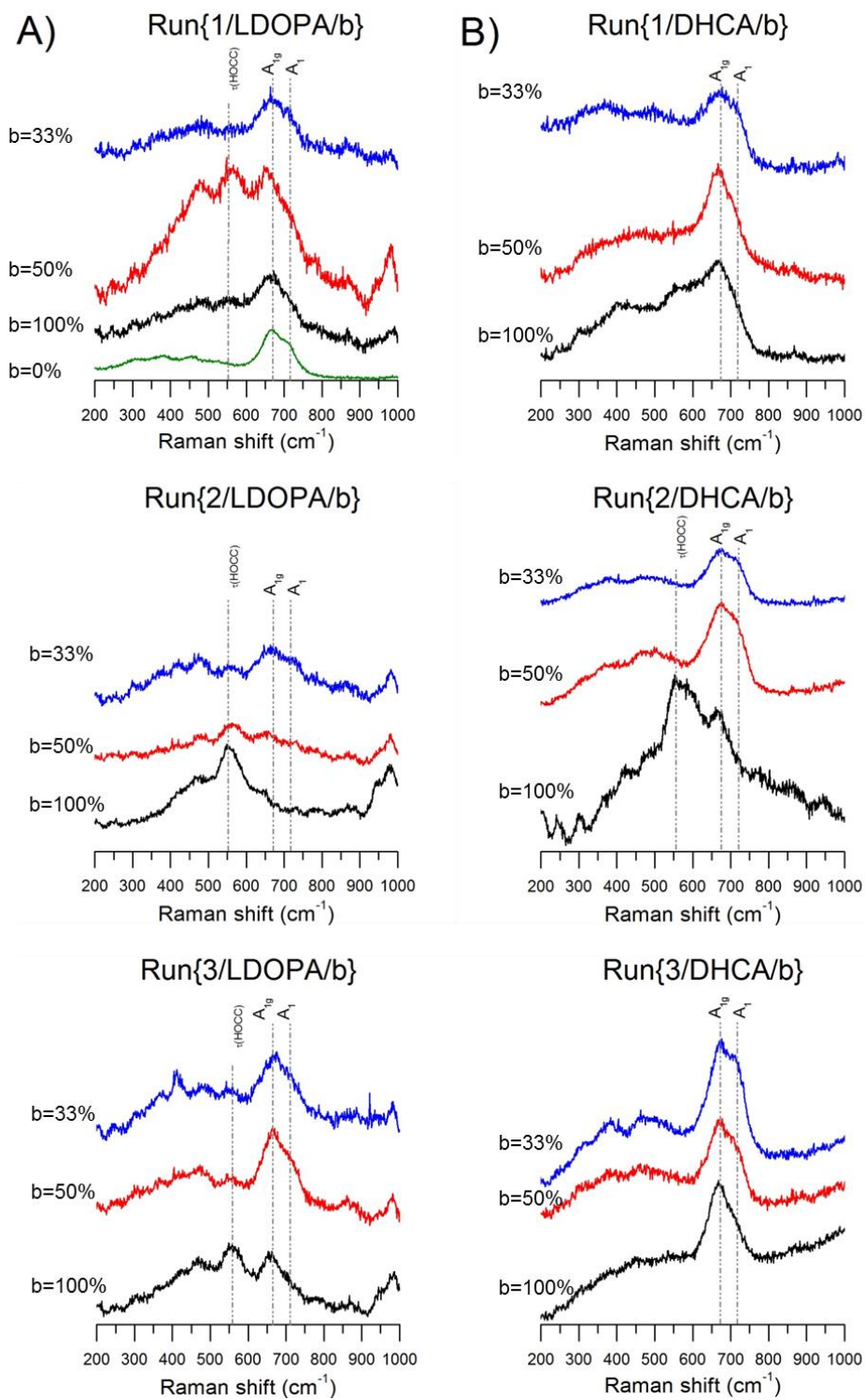


Fig. S1: Raman spectra of A)  $Fe_3O_4$ -LDOPA from run{1/LDOPA/b}, run{2/LDOPA/b} and run{3/LDOPA/b} and B)  $Fe_3O_4$ -DHCA synthesized in run{1/DHCA/b}, run{2/DHCA/b} and run{3/DHCA/b} from 200 to 1000  $cm^{-1}$  ( $\tau$ : torsion)



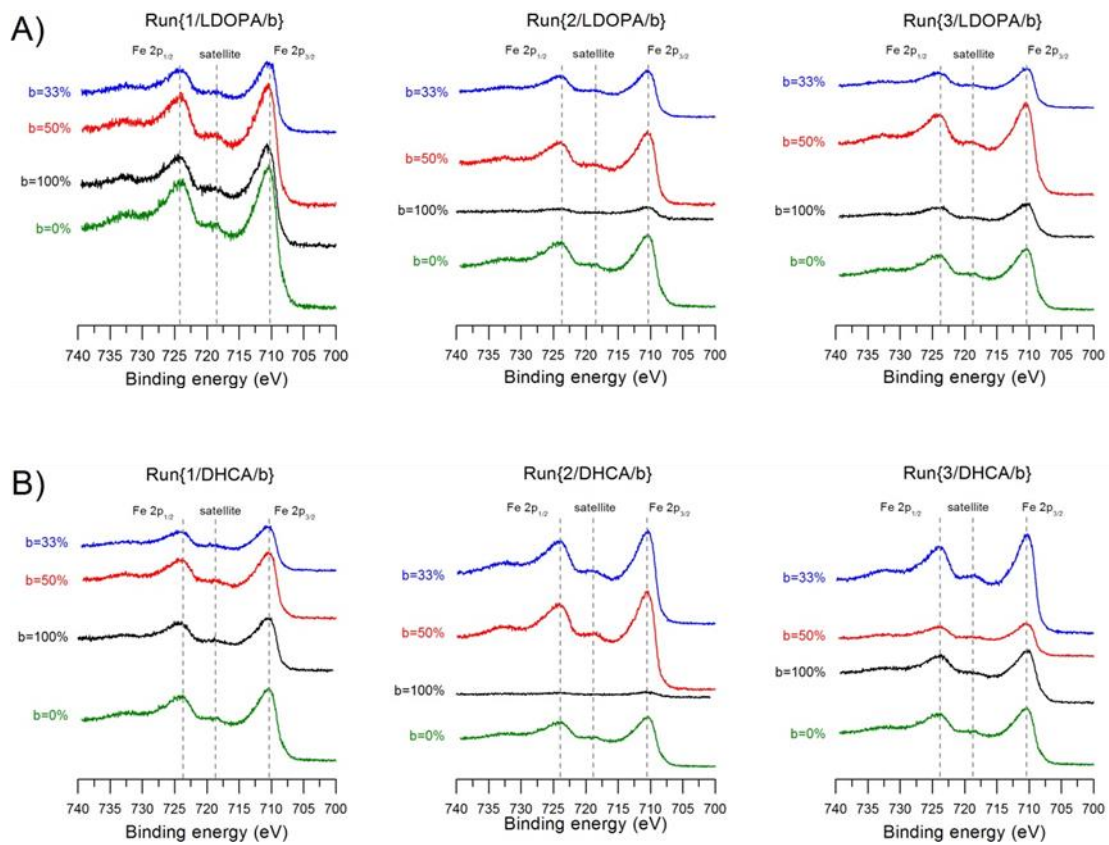


Fig. S2: XPS spectra of Fe2p collected on A) Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-DHCA, B) Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-LDOPA NPs from run{1/a/b}, run{2/a/b} and run{3/a/b}

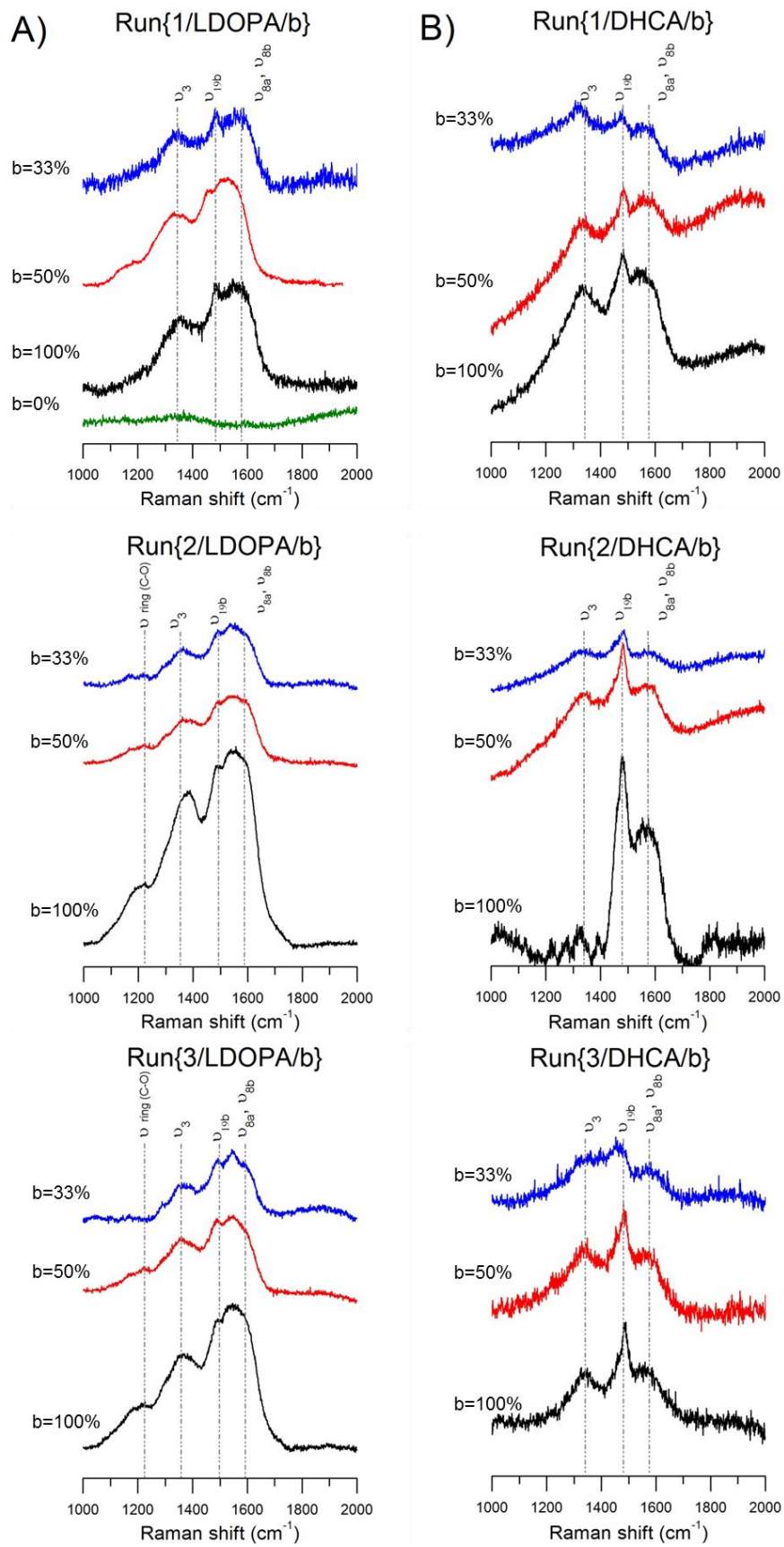


Fig. S3: Raman spectra of A) Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-LDOPA from run{1/LDOPA/b}, run{2/LDOPA/b} and run{3/LDOPA/b} and B) Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-DHCA synthesized in run{1/DHCA/b}, run{2/DHCA/b} and run{3/DHCA/b} from 1000 to 2000 cm<sup>-1</sup> (ν: stretching)

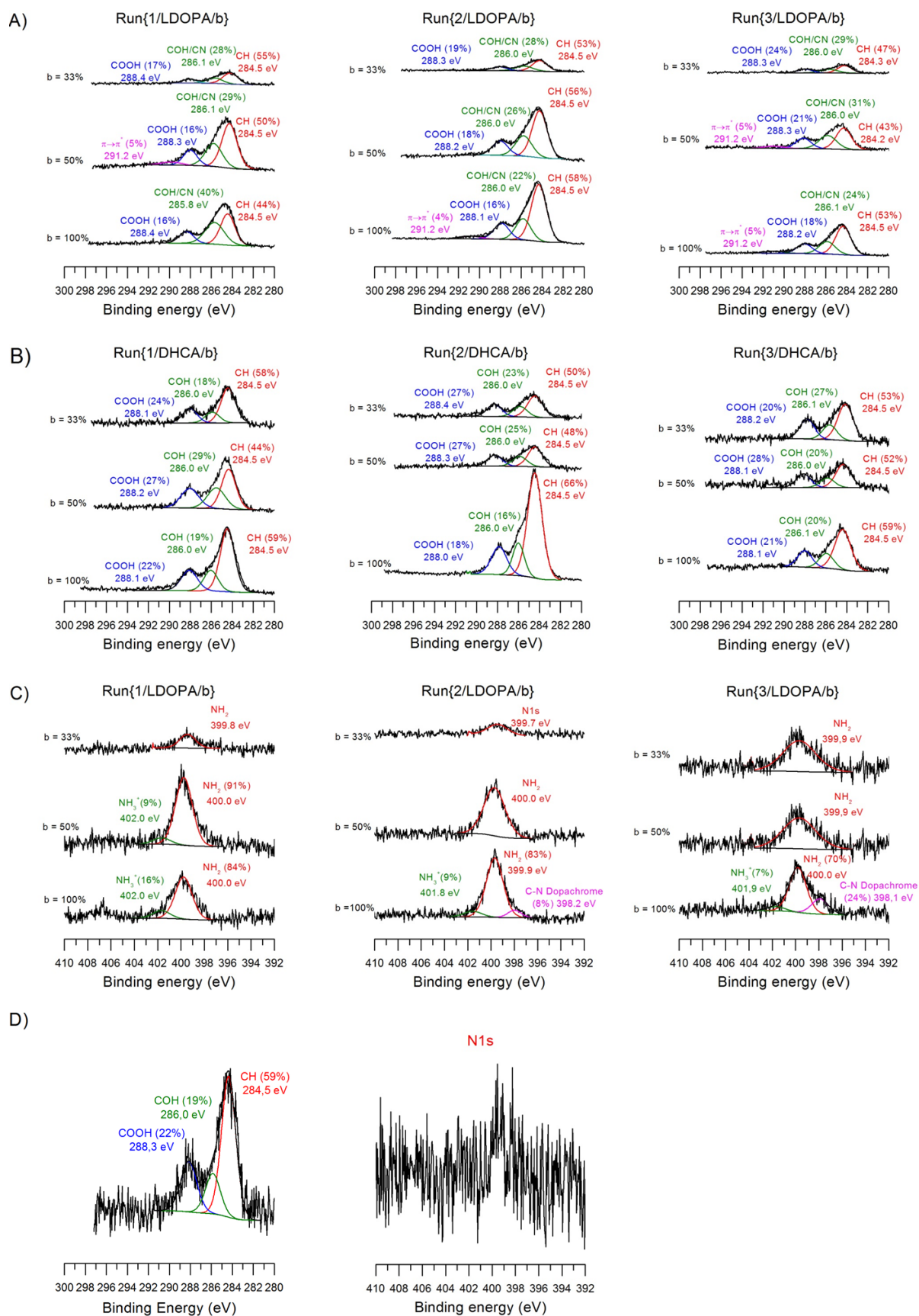


Fig. S4: XPS spectra of desumated A) C(1s) Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-DHCA, B) C(1s) Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-LDOPA C) N(1s) contributions measured for Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-LDOPA and D) Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> NPs from run{1/a/b}, run{2/a/b} and run{3/a/b}

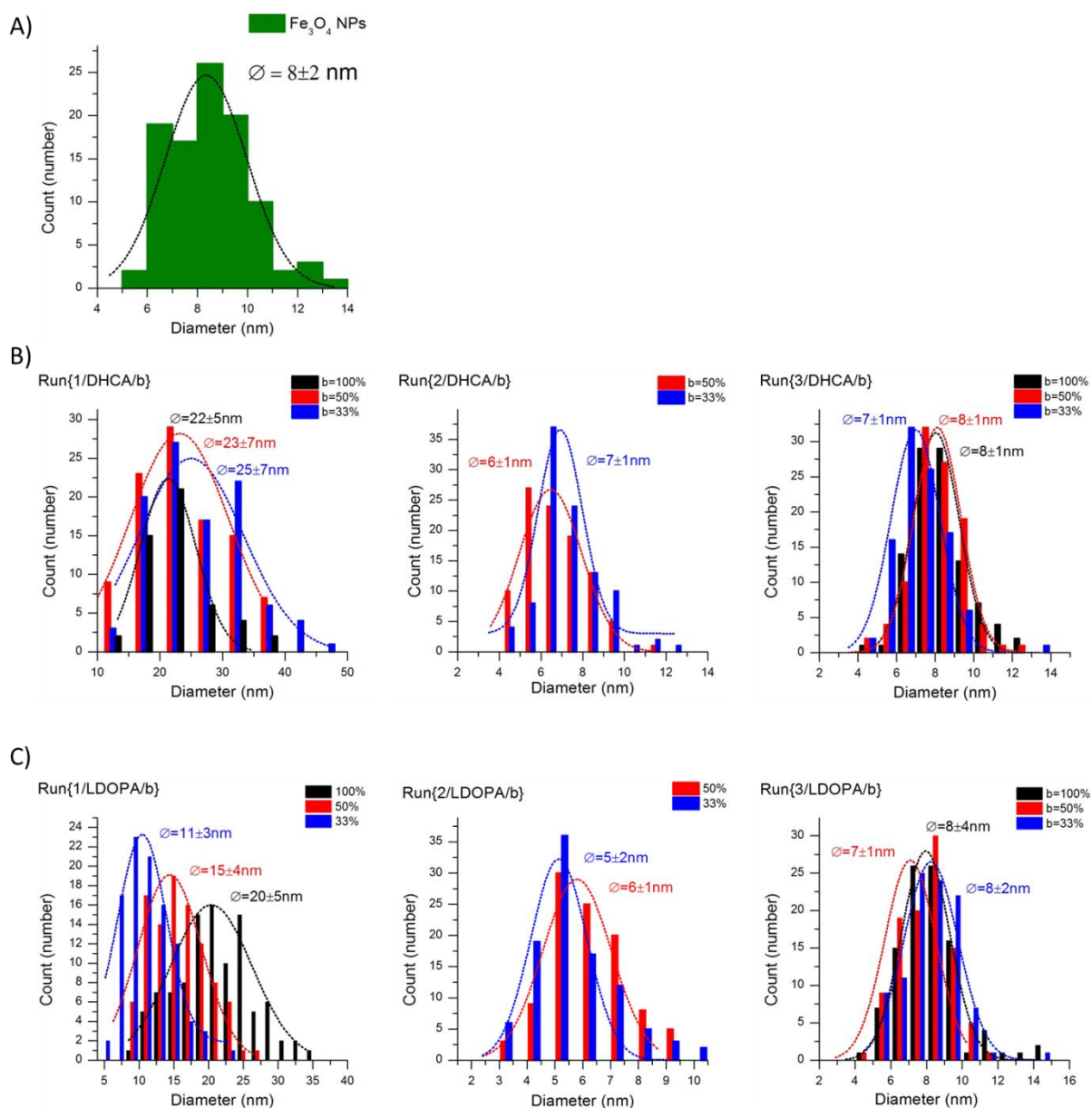


Fig. S5: TEM diameters distributions of A) unmodified NPs, B) Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-DHCA NPs and C) Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-LDOPA NPs determined from counting 100 crystallites from run{1/DHCA/b}, run{2/DHCA/b} and run{3/DHCA/b}



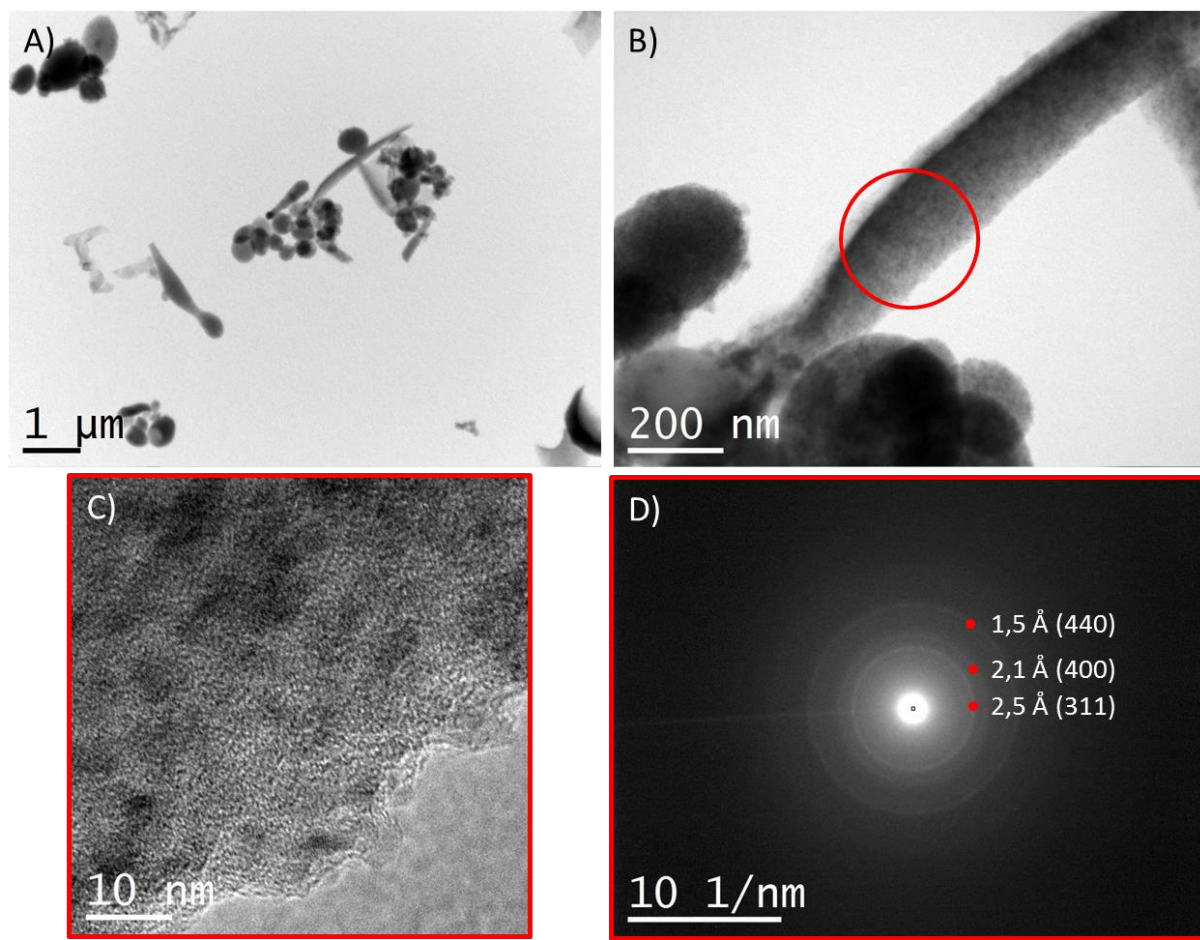


Fig. S6: TEM images of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-LDOPA from run{2/LDOPA/100% } A-C) and D) selected area electron diffraction of B)

## Annexe 4 : Magnétisme

### ZFC/FC

Ces mesures permettent d'observer, par la détermination de la température de blocage, la transition de l'état bloqué à l'état superparamagnétique. Pour cela, des mesures de magnétométrie DC sans champ magnétique (ZFC) ou dans un champ magnétique constant (FC)  $([-10^4 \text{ Oe}; 10^4 \text{ Oe}])$  sont réalisées. Avec la courbe ZFC, la température de blocage des nanoparticules est déterminée à partir du maximum de la courbe ZFC. Cependant, la largeur de ce pic est caractéristique de la distribution en volume des nanoparticules de l'échantillon étudié. En plus de pouvoir obtenir la température de blocage, il est possible de remonter à la taille des nanoparticules, leur distribution en taille mais aussi d'obtenir des informations sur les interactions magnétiques entre les nanoparticules (anisotropie).

Concernant les mesures ZFC, les nanoparticules sont refroidies à une basse température (quelques Kelvin) afin de placer ces dernières dans un état bloqué (ferromagnétique ou  $\tau_m < \tau_N$ ) et les moments magnétiques sont orientés aléatoirement. Un faible champ magnétique est appliqué et la susceptibilité magnétique est enregistrée tout au long de l'augmentation en température de l'échantillon. Aux alentours de la température de blocage, cette grandeur magnétique augmente rapidement puis diminue une fois cette température dépassée. Cette diminution se déroule en suivant une loi de Curie (ou Curie-Weiss si les particules sont en interactions magnétiques).

A propos des mesures FC, l'échantillon précédemment chauffé lors des mesures ZFC est à nouveau refroidi vers les basses températures mais en maintenant un champ magnétique appliqué (dans notre cas 500 Oe). Les courbes ZFC et FC se superposent au-dessus de la température de blocage, mais en deçà, la susceptibilité ou aimantation continue d'augmenter car les moments magnétiques sont bloqués dans la même direction que le champ magnétique appliqué (après les mesures ZFC).

## Courbe d'aimantation

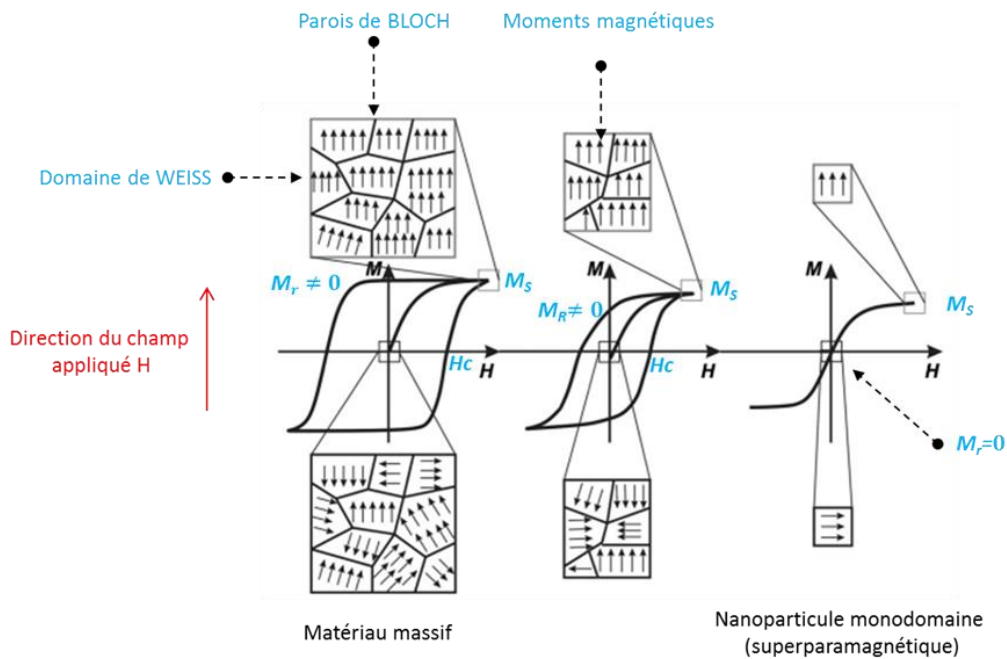


Figure 134 : Représentation schématique des parois de Bloch, des domaines de Weiss, du champ coercitif  $H_c$ , des aimantations rémanentes  $M_r$  (emu/g) (quand  $H$  est nul) et à saturation  $M_s$  (emu/g) (quand  $H$  est maximal) en fonction du champ magnétique appliqué  $H$  et leur évolution suivant la taille du matériau<sup>24</sup>

Pour mettre en évidence le caractère superparamagnétique, il est possible de mesurer l'aimantation  $M$  (résultante des moments magnétiques dans la direction du champ magnétique) des nanoparticules en fonction d'un champ appliqué. A l'aide de cette mesure, il est possible de remonter à la rémanence de l'échantillon ( $M_r$  : aimantation quand  $H=0$  Oe) et à l'aimantation à saturation ( $M_s$  : aimantation quand le champ appliqué  $H$  tend vers l'infini) et enfin  $H_s$  (le champ pour le quel  $M$  tend vers  $M_s$ ) (Figure 135). Le champ coercitif d'un matériau ferromagnétique désigne l'intensité du champ magnétique qu'il est nécessaire d'appliquer, à un matériau ayant initialement atteint son aimantation à saturation, pour annuler l'aimantation du matériau. Le champ coercitif est usuellement noté  $H_c$  ou  $B_c$ . Cette aimantation dans le cas d'échantillons superparamagnétiques ne décrit pas un cycle d'hystérésis comme pour les matériaux massif mais une fonction de Langevin. C'est cette fonction qui est recherchée quand des particules superparamagnétiques sont étudiées.

En appliquant un champ magnétique sur des nanoparticules superparamagnétiques, les macrospins  $\mu$  des nanoparticules faisant un angle faible avec la direction du champ appliqué vont s'orienter dans la direction de ce dernier jusqu'à atteindre une valeur dite d'aimantation à saturation (les macrospins des nanoparticules sont tous orientés dans la même direction). Une fois le champ appliqué annulé, les macrospins reprennent leur axe de facile aimantation et l'aimantation s'annule à nouveau ( $M_r=0$ ). La courbe ainsi obtenue (Figure 135-a)) décrit une fonction de Langevin et est caractéristique des particules superparamagnétiques. A l'inverse, les particules dans un état bloqué vont décrire un cycle d'hystérésis (Figure 135-b)). En appliquant un champ magnétique et si l'énergie fournie est supérieure à

l'énergie d'anisotropie du système alors les macrospins vont s'aligner dans la même direction. Après avoir stoppé le champ magnétique appliqué et contrairement au cas où les particules se trouvaient dans l'état superparamagnétique, les macrospins restent dans la même direction que celle obtenue à saturation car l'énergie fournie par le champ magnétique n'existe plus pour dépasser la barrière d'anisotropie. Il reste alors une aimantation rémanente. Il faut donc réappliquer un champ magnétique de direction opposé pour changer la direction des macrospins. Les cycles d'hystérésis décrivent alors une aire. Plus l'aire est faible, plus le matériau est qualifié de « doux ». A l'inverse, il sera qualifié de dur.

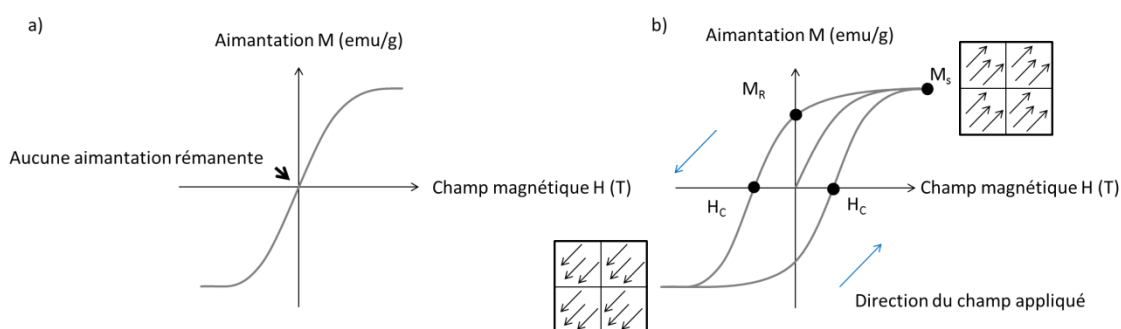


Figure 135 : Courbes d'aimantation de nanoparticules a) dans un état superparamagnétique, b) dans un état bloqué

Des modèles tels que le modèle de Stoner-Wohlfarth ou encore le modèle proposé par Kachkachi *et al.*<sup>159</sup> plus précis ont été proposés pour décrire les nanoparticules magnétiques, leur direction d'aimantation et la direction du champ appliqué. Ils peuvent prendre en compte ou non selon leur complexité et conditions initiales les interactions magnétiques *etc.* De nombreux travaux de recherche sont menés dans l'objectif de développer des modèles pouvant expliquer les résultats expérimentaux obtenus entre différents échantillons (taille, nature, anisotropie...). Des interactions entre particules et une distribution en taille peuvent expliquer, par exemple, des différences entre la simulation et la partie expérimentale.<sup>159, 340</sup> De même, des interactions dipolaires peuvent jouer un rôle sur le champ coercitif<sup>341</sup>. En effet, celles-ci diminuent la rémanence et le champ coercitif en fonction de la température menant à la persistance du comportement ferromagnétique au-delà de  $T_B$ . Mais ces effets sur le comportement magnétiques sont très complexes. Il est très difficile de développer de manière générale de tels modèles à cause des coexistences des particules bloquées et non bloquées à une température donnée, de leurs interactions entre elles.

Ces techniques peuvent mettre aussi en évidence l'état d'oxydation des nanoparticules. En effet, en comparant les cycles d'aimantation (hystérésis), avant et après ZFC et si les nanoparticules sont oxydées, alors un shift du cycle d'hystérésis est observé après ZFC.<sup>342</sup>



## Annexe 5 : DLS (Diffusion Light Scattering) ou diffusion dynamique de la lumière

La DLS est couramment employée et possède plusieurs avantages pour déterminer la taille hydrodynamique des particules magnétiques de fer en suspension. En plus d'être très populaire, elle est rapide, automatisée et peu chère. Au cours des mesures, l'échantillon peut être réutilisé car cette méthode de mesure est non-invasive (très utile dans l'utilisation de ligands chers comme des protéines).

### Appareil et conditions de mesure

La magnétite ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) est choisie comme matériau de référence pour les mesures DLS. Son indice de réfraction est de 2,420 et son coefficient d'absorption est de 0,029. Les mesures sont réalisées selon un angle de rétrodiffusion de  $173^\circ$ . Pour chaque échantillon, trois mesures successives sont réalisées afin de déterminer la reproductibilité des mesures et l'écart-type. Les courbes DLS sont données en intensité et le Z-average (diamètre moyen pondéré en taille) est calculé.

L'appareil utilisé est un Malvern Zetasizer Nano ZS. Le logiciel de traitement des données est le logiciel DTS Nano V4.2. Les mesures DLS sont réalisées selon les analyses dans du PBS (Phosphate Buffer Saline 1X ou 0,1X) dans de l'eau à pH physiologique à  $10^{-2}\text{M}$  en NaCl et du MEM (Minimum Essential Medium). Les échantillons sont préalablement filtrés (filtre de  $0,45\ \mu\text{m}$ ) pour éliminer les éventuels polluants. Avant chaque mesure, les échantillons sont passés aux ultrasons (branson sonifier 450 instrument durant 30s à 100%).

### Principe

Au cours des analyses DLS, les suspensions de nanoparticules sont exposées à un faisceau lumineux monochromatique (laser). Lors de l'interaction entre les nanoparticules et le faisceau lumineux, la direction et l'intensité du faisceau sont modifiées : c'est le processus de diffusion. C'est l'intensité de ce faisceau diffusé qui est reçu et analysé. L'énergie cinétique des nanoparticules implique un mouvement aléatoire des nanoparticules en suspension qui modifient alors l'intensité du signal (Figure 136). A partir des données reçues générées par les mouvements des nanoparticules, il est possible de déterminer le coefficient de diffusion des nanoparticules :

$$D_f = \frac{k_B T}{6\pi\eta R_H}$$

*avec  $k_B$  la constante de Boltzmann,  $T$  la température de la suspension en K,  $\eta$  la viscosité du milieu et  $R_H$  le rayon hydrodynamique de la particule.*

La technique DLS fournit, à partir de  $D_f$ , le diamètre hydrodynamique moyen des nanoparticules en suspension défini comme étant le diamètre d'une boule ayant le même coefficient de diffusion dans le milieu considéré que la particule analysée. Cette technique d'analyse est très utile pour détecter la formation de petits agglomérats car l'intensité diffusée est directement proportionnelle au rayon de la nanoparticule à la puissance 6. Ce diamètre est calculé à partir d'un ensemble de mesure. Comparée au

MET (quelques centaines de particules comptées), cette technique analyse un échantillon large. Elle est donc très représentative de l'échantillon comparée à d'autres techniques

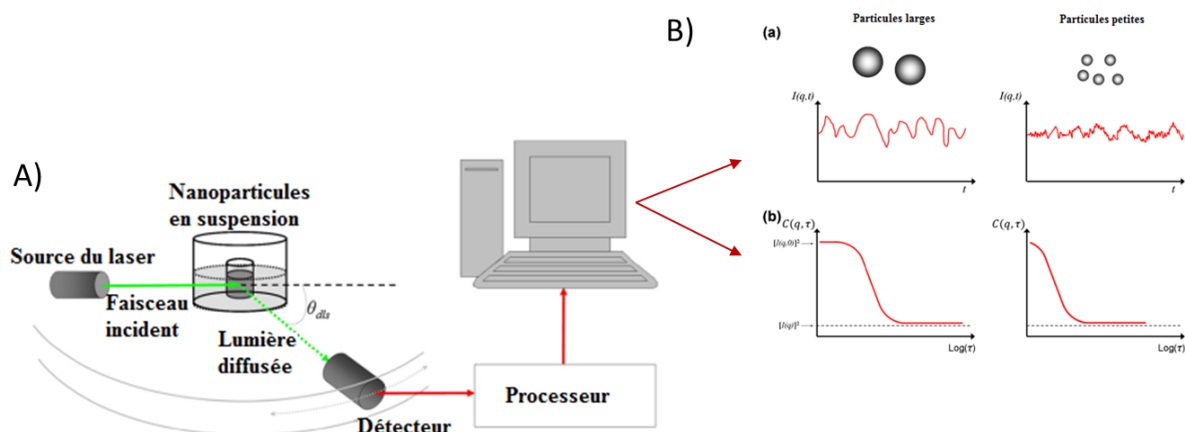


Figure 136 : A) Schéma du principe de mesure DLS et B) a) illustration de l'intensité mesurée pour des particules de grande taille et de petite taille avec b) la fonction d'autocorrélation correspondante<sup>343</sup>

## Fonctions mathématiques permettant de connaître le diamètre hydrodynamique

Pour connaître cette valeur, de nombreuses mesures sur un temps donné  $t_k$  espacées d'un temps  $\Delta t$  de l'intensité sont réalisées. L'intensité mesurée ponctuellement  $I(q, t)$  à un temps entre deux points sera différente à cause des mouvements Browniens des nanoparticules en suspension. L'intensité moyenne  $[I(q)]$  mesurée sur le temps  $t_k$  est alors donnée par la formule suivante :

$$[I(q)] = \lim_{t_k \rightarrow \infty} 1/t_k \int_0^{t_k} I(q, t) \cdot dt \approx \lim_{K \rightarrow \infty} \frac{1}{K} \sum_{i=1}^K I(q, i \cdot \Delta t)$$

avec  $q$  le vecteur d'onde de diffusion défini par :

$$q = \frac{4\pi n}{\lambda} \sin \frac{\theta_{DLS}}{2}$$

avec  $\theta_{DLS}$  l'angle formé entre le faisceau incident et le faisceau diffusé. Les particules de faibles tailles induisent une variation rapide de l'intensité mesurée (Figure 136-B-a)). En effet en raison de leur faible taille, elles sont fortement influencées par les forces extérieures qui sont appliquées sur elles.

Les variations d'intensité au cours du temps à un angle donné sont caractérisées par la fonction d'autocorrélation :

$$C(q, \tau) = \lim_{t_k \rightarrow \infty} 1/t_k \int_0^{t_k} I(q, t) \cdot I(q, t + \tau) \cdot dt \approx \lim_{K \rightarrow \infty} \frac{1}{K} \sum_{j=0}^k I(q, i \cdot \Delta t) \cdot I(q, (i + j) \cdot \Delta t)$$

avec  $\tau = i\Delta t$  le temps entre deux signaux  $I(q, i \cdot \Delta t)$  et  $I(q, (i + j)\Delta t)$ . Cette fonction de corrélation  $c(q, \tau)$  représente la corrélation entre deux intensités mesurées et séparées par un temps  $\tau$ . Tout comme la fonction intensité, la fonction d'autocorrélation est différente selon la taille des nanoparticules. Des

particules de faible taille tendent à faire décroître rapidement la courbe relative à la fonction de corrélation (Figure 136-B-b)) jusqu'à atteindre une valeur limite pour  $[I(q)]^2$ . La fonction  $C(q,t)$  s'écrit alors :

$$C(q, \tau) / [I(q)]^2 = g^{(2)}(q, \tau) = 1 + \varepsilon |g^{(1)}(q, \tau)|^2$$

avec  $\varepsilon$  la constante instrumentale et  $g^{(1)}(q, \tau)$  la fonction de corrélation du champ électrique normalisé. Pour des particules monodispersées et sphériques,  $g^{(1)}(\tau)$  s'écrit :

$$g^{(1)}(q, \tau) = e^{-D_f q^2 \tau}$$

A partir de  $D_f$  et l'équation de Stokes-Einstein, le diamètre hydrodynamique peut être déterminé. Cependant, cette fonction de corrélation ne s'exprime pas selon une simple fonction exponentielle décroissante mais plutôt comme selon la forme suivante :

$$g^{(1)}(q, \tau) = \int_0^\infty G(\Gamma) e^{-\Gamma \tau} d\Gamma$$

avec  $G(\Gamma)$  la distribution des taux de décroissance  $\Gamma$ . Pour une distribution  $G(\Gamma)$  étroite, la méthode des cumulants (introduit par Koppel en 1972) permet d'écrire le logarithme de la fonction de corrélation de champ électrique en une somme de polynômes. Ecrite sous cette forme, le fit d'un polynôme par la méthode des moindres carrés se révèle donc plus facile.

$$\ln(g^{(1)}(q, \tau)) = -\langle \Gamma \rangle \tau + \frac{\mu_2}{2} \tau^2$$

avec  $\mu^2 = \langle \Gamma^2 \rangle - \langle \Gamma \rangle^2$  est la variance de la distribution du taux de décroissance et  $\langle \Gamma \rangle$  la moyenne du taux de décroissance définie comme :

$$\langle \Gamma \rangle = \int_0^\infty G(\Gamma) \Gamma d\Gamma$$

L'indice de polydispersité (PDI) est défini par la relation suivante :  $PDI = \mu_2 / \langle \Gamma \rangle^2$ .

Ainsi le diamètre hydrodynamique moyen est obtenu à partir du taux de décroissance moyen  $\langle \Gamma \rangle$  selon la relation suivante

$$R_H = \frac{k_B T}{6\pi\eta \langle \Gamma \rangle} q^2$$

Cependant la méthode des cumulants ne permet pas une détermination indépendante de la ligne de base sur un temps long de la fonction de corrélation de l'intensité et peut conduire à des résultats incohérents. Une modification des méthodes de calculs peut être appliquée.<sup>344</sup>

## Z-average

Le terme de Z-average est souvent employé dans les résultats DLS. Il est déterminé à partir de la méthode des cumulants. Issu d'un modèle de calcul complexe, il représente la taille moyenne harmonique pondérée. Utiliser ce terme et le comparer à d'autres techniques de mesures n'est possible que lorsque la suspension est monomodale (un seul pic), les particules de forme sphérique et monodispersées.<sup>345</sup> Le Z-average est déterminé à partir de la mesure de l'intensité.

## Les angles de mesure

Pour des nanoparticules, des protéines et peptides dont la taille réelle est inférieure à 50 nm, un angle de rétrodiffusion de 173° est choisi afin d'avoir de bons rapports signal/bruit et une bonne reproductibilité des mesures. Une mesure « dual angle » peut être appliquée pour détecter des agglomérats de petites tailles.

## Autres paramètres clés en DLS

### a) Indice de polydispersité

Nombre sans dimension, il caractérise l'état de dispersion de l'échantillon. Il représente la distribution gaussienne en taille de l'échantillon analysé. Il varie entre 0 et 1. En dessous de 0,1, le pic le plus intense sera très proche du Z-average. L'échantillon est considéré comme monodisperse. Au-dessus de 0,1, plusieurs pics distincts sont susceptibles d'apparaître et d'induire des distributions multimodales. Dans ce cas ou si le PDI est supérieur à 0,7, le Z-average n'a plus aucun sens.<sup>343, 345</sup> Généralement, les mesures DLS montrent des PDI inférieurs à 0,3 avec des variations de taille comprises entre 100 et 300 nm.<sup>346</sup>

### b) Intercept ou Y-Intercept

Il fait référence à l'intersection de la courbe de corrélation avec l'axe Y du corrélogramme. Il évalue le rapport signal sur bruit. Il juge donc de la qualité des données de mesures. Il doit être supérieur à 0,6. Il est habituellement compris entre 0,6 et 0,9.<sup>345</sup>

### c) Mesures en intensité, volume et nombre

Les mesures en intensité sont les plus couramment utilisées et représentées en DLS dans les différents travaux de recherche. Elles sont très pertinentes car elles mesurent « directement » l'intensité diffusée du laser. Elles donnent rapidement accès aux données brutes que l'appareil peut mesurer. La distribution en intensité est pondérée selon la lumière diffusée par chacune des particules analysées. Elle met en évidence la formation de petits agglomérats ou la présence de particules de taille(s) importante(s). En effet, l'intensité est fortement dépendante de la taille des nanoparticules (puissance 6).

Les mesures en volume donnent accès au volume des nanoparticules à l'aide de la formule  $V=4/3\pi r^3$ . Pour donner des mesures en volume, la distribution en intensité ne doit comporter aucune erreur, les propriétés optiques du matériau doivent être parfaitement connues et les particules doivent

être sphériques et homogènes. Une puissance d'ordre 3 entre le rayon et le volume implique que la distribution en volume sera fortement influencée par les particules larges et volumineuses.<sup>345,346</sup>

Les mesures en nombres représentent le nombre de particules selon différentes classes de taille. Obtenue à l'aide de fonctions mathématiques, elles ont pour objectif de trouver une similitude avec les mesures de comptage classique telles que le MET. Les tailles moyennes diminuent selon la nature des mesures : intensité>volume>nombre.

### **Les paramètres influençant les valeurs du Z-average**

De nombreux paramètres influencent le comportement des nanoparticules en suspension.

#### **a) Concentration de l'échantillon**

La concentration de l'échantillon joue un rôle essentiel. En effet, si celui-ci est trop dilué, les phénomènes de diffusion sont trop faibles et la mesure est biaisée. De même, si l'échantillon est trop concentré, la diffusion sera trop importante. Elle réduit aussi les mouvements libres des particules dans la solution. Ces mouvements browniens sont aléatoires, reliés à la taille, la température et la viscosité. En considérant des particules magnétiques, les interactions magnétiques dipôle-dipôle favorisent la formation d'agglomérats. Le processus d'agglomération est directement relié à la concentration en particules. Finalement, une concentration importante tend à augmenter la taille hydrodynamique mesurée en DLS.<sup>343</sup> Pour cette étude, une concentration d'environ  $15\mu\text{g.mL}^{-1}$  de nanoparticules en suspension est utilisée.

#### **b) Taille des nanoparticules**

Lorsque la taille des particules élémentaires mesurée en MET augmente, la taille mesurée en DLS suit la même tendance. Cependant une augmentation de taille en MET peut induire une augmentation plus importante en DLS par rapport à des particules de plus petite taille. Une augmentation du « vrai diamètre » des nanoparticules (MET) conduit à l'augmentation de l'erreur de taille mesurée en DLS.<sup>343</sup>

#### **c) Modification de surface des particules**

En modifiant l'état de surface des nanoparticules (avec des PEG), il est possible d'appliquer un effet stérique entre les nanoparticules réduisant les phénomènes d'agglomérations provoqués par les forces de van der Waals.<sup>343</sup>

#### **d) Forme des nanoparticules**

Il est possible aussi à l'aide de la DLS d'étudier des formes non sphériques en modifiant les formules du taux de décroissance par exemple.

## Annexe 6 : Microscopie électronique en transmission

La microscopie électronique en transmission (MET) est une technique de microscopie où un faisceau d'électrons incident passe à travers un échantillon. Contrairement à la microscopie optique, il a une meilleure résolution spatiale suivant la relation :

$$D = \frac{0,61\lambda}{n \sin \theta}$$

*Avec  $n$  l'indice du milieu entre l'objectif et l'objet,  $\theta$  l'angle d'ouverture de la lentille ( $^{\circ}$ ) et  $\lambda$  la longueur d'onde du rayonnement (nm).*

Pour un faisceau incident de 200kV, il est possible d'avoir une résolution théorique de 0,0025 nm. Cependant, à cause des aberrations de la lentille objectif par exemple ou chromatique de charges d'espaces, la résolution spatiale n'est que de 0,19 nm.

Un canon à électrons va générer un faisceau d'électrons focalisé par des lentilles magnétiques et électrostatiques. Une fois que les électrons ont rencontré l'échantillon, ces derniers sont transmis et/ou diffractés (Figure 137). Grâce à un écran phosphorescent et d'un capteur CCD (Charge-Coupled Device), une image est reconstruite.

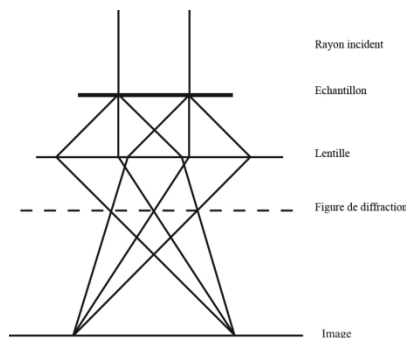


Figure 137 : Mode de fonctionnement image et diffraction d'un microscope électronique en transmission<sup>347</sup>

Plusieurs mode de fonctionnement sont utilisables en MET :

### a) Mode image

Si le détecteur est placé dans le plan image, une image par transparence de la zone observée est obtenue. Selon l'épaisseur, la densité, la nature chimique de l'échantillon ou de défauts cristallins des contrastes dans le plan image sont générés (Figure 137).

### b) Mode champ clair

L'écran est placé dans le plan image. Un diaphragme d'objectif est positionné dans le plan focal afin d'avoir uniquement le faisceau transmis en ligne droite par l'échantillon. Ces zones, qui ne diffractent pas, apparaissent clair et celles qui diffractent apparaissent sombres (Figure 138).

### c) Mode champ sombre

Toujours en se plaçant dans le plan image et en positionnant un diaphragme dans le plan focal, les électrons diffractés selon un angle donné sont sélectionnés cette fois-ci. Ils apparaissent clairs alors que les zones de l'image qui diffractent à d'autres angles sont sombres (Figure 138).

### d) Microscopie à haute résolution

Ce mode est très intéressant car la visualisation de l'échantillon à l'échelle atomique est possible (Figure 138). Les colonnes atomiques sont visibles. Les dislocations, les parties amorphes ou cristallines du matériau sont mis en avant à l'aide de ce mode. Il résulte de l'interférence entre le faisceau transmis en ligne droite et le faisceau diffracté. Cependant pour déterminer un défaut cristallin, il faut comparer les images simulées à partir d'un modèle atomique aux images expérimentales.

### e) Mode diffraction

En se basant sur le comportement ondulatoire des électrons et si un échantillon est cristallisé alors, les électrons vont diffracter. Plusieurs petits faisceaux se forment. Ils sont recombinaés pour former l'image, grâce aux lentilles magnétiques (Figure 137).

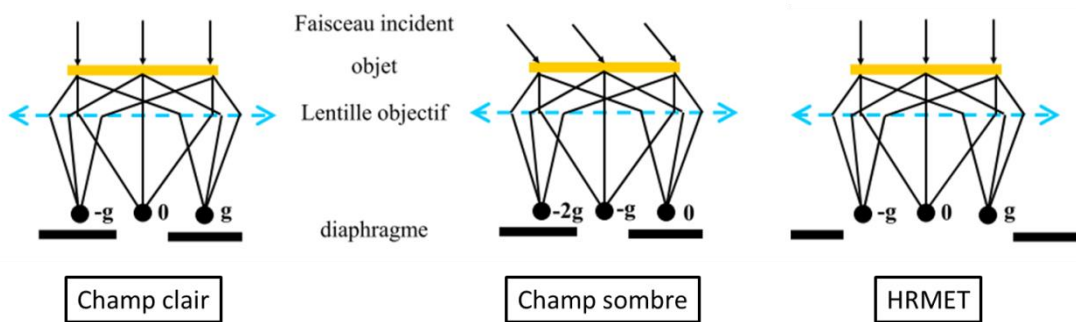


Figure 138 : Différents modes de fonctionnement : champ clair, champ sombre et METHR<sup>348</sup>

Il est possible de travailler aussi sur l'analyse dispersive en énergie pour connaître la nature chimique de l'échantillon ou encore en STEM (Scanning Transmission Electron Microscopy) en procédant au balayage du faisceau électronique préalablement focalisé en une sonde électronique très petite.

### Préparation des échantillons et appareil utilisé :

Les suspensions de nanoparticules sont déposées sur une grille MET en cuivre recouverte de carbone et séchées à l'air libre dans un environnement protégé de la poussière.

L'appareil de mesure utilisé est un microscope de type JEOL JEM 2100F opérant à 200 kV (résolution of 0,19 nm). 100 nanoparticules sont comptées pour chaque échantillon. Les courbes de distribution des échantillons sont calculées selon un modèle Gaussien. Le logiciel Digital Micrograph v3.10.1 est utilisé pour traiter les données.

## Annexe 7 : XPS (X-ray Photoelectron Spectrometry) spectrométrie photoélectronique X

### Principe

L'échantillon est soumis à une source de rayon X monochromatique d'énergie  $h\nu$  ( $h$  : constante de Planck en J.s et  $\nu$  la fréquence de radiation en  $s^{-1}$ ) supérieure à l'énergie de liaison  $E_L$  (J). Par effet photoélectrique, le processus d'ionisation des atomes est généré et des photoélectrons sont émis du matériau. Leur énergie cinétique  $E_C$  (J) et leur intensité respective sont mesurées afin d'obtenir le spectre.

$$E_L = h\nu - E_C$$

Les électrons de cœur ou de valence dont l'énergie de liaison est inférieure à  $h\nu$  peuvent être éjectés. Cette énergie est caractéristique des niveaux énergétiques atomiques. Un ultravide de l'ordre de  $10^{-9}$ - $10^{-10}$  mbar est nécessaire pour éviter les pollutions et la diffusion des électrons par les molécules présentes dans l'atmosphère.

A l'aide de cette technique, il est possible de réaliser de l'analyse élémentaire. C'est une analyse chimique. Tous les éléments sauf l'hydrogène et l'hélium sont détectables *via* cette méthode d'analyse. Les matériaux isolants et conducteurs peuvent être analysés. Pour les échantillons isolants, une neutralisation est nécessaire pour éviter l'accumulation de charge durant l'acquisition en combinant des électrons de faible énergie et des ions d'Argon de faible énergie. La profondeur d'analyse est de l'ordre de quelques couches atomiques (2-10 nm). Cette profondeur dépend du libre parcours moyen des photoélectrons dans la matière et par conséquent de leur énergie cinétique. Cette technique est donc très intéressante quand il s'agit de mettre en évidence la présence d'un nouvel élément à la surface de l'échantillon.

De même, des analyses quantitatives sont envisageables. L'intensité  $I$  d'une raie de photoélectrons est liée à la concentration atomique de l'élément  $N$  en question.

$$I = KN\sigma \left[ 1 - e^{\left(\frac{-z}{\lambda \sin \theta}\right)} \right]$$

avec  $K$  la constante qui dépend de l'appareillage (fonction de transmission de l'appareil connue selon la gamme d'énergie utilisée),  $\sigma$  la section efficace de photoionisation (probabilité d'ionisation du niveau de cœur considéré, facteur limitant de la technique),  $\lambda$  le libre parcours moyen du photoélectron,  $z$  la profondeur d'analyse et  $\theta$  l'angle d'analyse. Seuls des concentrations relatives entre éléments atomiques sont exprimées à l'aide de cette technique. Il est impossible de déterminer des concentrations absolues. A l'aide de ce type d'analyse, il est possible de mettre en avant des changements de concentration atomique (en %) quand une molécule organique est greffée par exemple sur la surface d'un échantillon.

Enfin, l'environnement chimique de l'atome peut être analysé. Les énergies de liaison des niveaux de cœurs sont sensibles à cet environnement. Les variations de degré d'oxydation, la nature des liaisons chimiques ou encore les changements d'état électronique sont détectés par des variations de l'énergie de liaison. Ce déplacement en énergie est de l'ordre de quelques dixièmes à quelques eV.



La spectrométrie Auger XPS est souvent utilisée. Un électron Auger n'a pas d'énergie de liaison et son énergie est propre à lui-même. Elle représente une transition issue entre deux orbitales d'une désexcitation. La composition chimique d'une surface est généralement déterminée à partir de cette spectrométrie.

### **Préparations des échantillons :**

Les poudres sont déposées sur une feuille d'indium pour immobiliser les nanoparticules durant l'analyse XPS.

Un processus de neutralisation est appliqué sur les échantillons isolant afin d'éviter leur dégradation. Ce processus résulte de la combinaison d'électrons à faible énergie et d'ions argon à faible énergie afin d'éviter l'accumulation de charge durant les acquisitions.

L'instrument utilisé est un PHI 5000 Versaprobe. La source d'énergie de rayon X est issue d'une radiation monochromatique Al K $\alpha$  ( $E_{K\alpha}(\text{Al})=1486,7$  eV avec un spot de 200  $\mu\text{m}$  de diamètre). Les données sont collectées et analysées *via* les logiciels CasaXPS et MultiPak. Un profil Gauss (70%) - Lorentz (30%) est appliqué sur les désommatations. Le fond continu est retiré par le logiciel selon la méthode de Shirley non linéaire. Les électrons qui ont subi des chocs inélastiques avant de sortir de l'échantillon sont retirés. Les largeurs à mi-hauteur varient habituellement entre 1.3 et 2.3 eV.

Le carbone de contamination est utilisé pour calibrer les spectres XPS de chacun des échantillons. Son énergie de liaison est fixée à 284,5 eV et est utilisé pour calibrer tous les autres pics d'un spectre afin de pouvoir les comparer.

## Annexe 8 : Spectroscopie infrarouge, ATR et Raman

### a) Spectroscopie infrarouge et ATR

La spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR pour Fourier Transform InfraRed spectroscopy) est une technique d'analyse couramment employée dans de nombreuses études pour acquérir le spectre d'absorption, d'émission ou la diffusion Raman dans l'infrarouge d'un échantillon sur une large gamme spectrale (habituellement 4 000 à 400  $\text{cm}^{-1}$ ). Elle concerne la région infrarouge du spectre électromagnétique. Un composé chimique est identifiable *via* cette technique d'analyse.

#### Principe

Un échantillon de nature solide ou gazeuse est soumis à une source lumineuse monochromatique et l'absorption du faisceau par ce dernier est collectée. Plusieurs fréquences lumineuses sont appliquées et pour chacune des fréquences, l'absorption est mesurée.

La spectroscopie par transformée de Fourier est donc basée comme son nom l'indique sur la transformation de Fourier qui est une opération mathématique consistant à transformer une fonction intégrable sur l'ensemble réel en une nouvelle fonction mathématique qui représente le spectre fréquentiel de celle-ci.

A l'aide d'un traitement informatique, le spectre de l'échantillon représentant l'absorbance ou la transmission en fonction de longueur d'onde est tracé. Sa résolution spectrale est élevée, les mesures sont reproductibles, rapides et très sensibles. Elle est principalement qualitative.

#### Vibrations des molécules

Les molécules sont capables d'avoir des mouvements variés dans l'espace : étirements symétriques et asymétriques, cisaillements, bascules, agitations et torsion. Ces fréquences spécifiques ne sont possibles qu'à certains niveaux d'énergies dits discrets. Elles dépendent par exemple de la masse atomique. Une vibration apparaît donc quand elle est en mesure d'absorber une quantité d'énergie  $E$  à une fréquence  $\nu$  selon la relation suivante  $E=h\nu$  ( $h$  : constante de Planck)

#### Préparation des échantillons

2 mg de poudre de nanoparticules sont mélangés avec 200 mg de KBr sec. Le KBr constitue une matrice pour réaliser les mesures. Il absorbe l'eau à température ambiante. Un mélange homogène est réalisé dans un mortier, puis une pastille est créée pour les mesures en infrarouge.

#### Problèmes

L'utilisation du KBr dans certains cas peut poser problème. En effet, par exemple, des interactions entre des composés organiques polaires et les ions  $\text{K}^+$  ou  $\text{Br}^-$  induisent des modifications spectrales (intensité et position). Des produits très sensibles à la lumière sous l'action combinée de l'eau

et du KBr subissent des modifications chimiques le rendant optiquement inactif (racémisation). Des produits chimiques nouveaux apparaissent.

Par ailleurs, le pastillage s'avère dans certains cas être un synonyme de dégradation pour l'échantillon. La pression appliquée, la température générée par l'échauffement entraînent des dégradations sur les molécules fragiles (sucres) ou encore des changements polymorphiques de réseaux cristallins. Une mauvaise homogénéisation de l'échantillon lors du pastillage conduit à une modification du spectre. D'autres modifications liées au broyage peuvent intervenir. Il est recommandé d'appliquer un broyage efficace sinon les grains de grosse taille absorbent toute l'énergie incidente et seule la périphérie des grains participe à la détermination du spectre de l'échantillon analysé.

### **ATR (Attenuated Total Reflection) ou réflexion totale atténuée**

Le mode de mesure infrarouge ATR (Attenuated Total Reflection) permet d'analyser directement l'échantillon (liquide ou solide) sans avoir recours à du KBr.

Sur ce dispositif, le faisceau subit plusieurs réflexions à l'interface située entre un cristal (transparent à l'infrarouge (diamant, ZnSe...)) mais d'indice de réfraction  $n_2$  élevé et supérieur à celui de l'échantillon ( $n_1$ ) et l'échantillon (Figure 139).

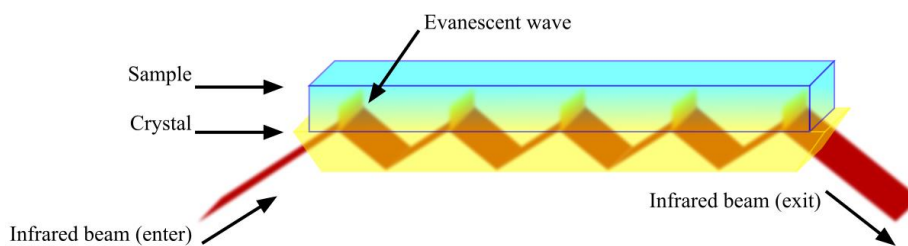


Figure 139 : Principe de la réflexion totale atténuée (ATR)<sup>349</sup>

Au lieu d'être réfléchi totalement selon la loi de Descartes, une onde progressive dite évanescente est générée à cette interface. C'est cette onde qui est mesurée *via* cette technique IR. Elle pénètre l'échantillon sur une profondeur de l'ordre de quelques micromètres (0,5 à 2  $\mu\text{m}$ ). Une partie de l'énergie est absorbée et la réflexion totale est atténuée. Le nombre de réflexion varie en fonction de l'angle d'incidence du faisceau lumineux. La réflectance est mesurée telle que  $R=I_R/I_0$  avec  $I_R$  l'intensité de la lumière réfléchie et  $I_0$  l'intensité réfléchie d'un matériau pris comme référence.

Cette technique est généralement employée sur des échantillons épais ou très absorbants (plastiques, peintures...). La préparation de l'échantillon est simple et rapide. L'échantillon ne subit aucune transformation pour être analysé. Il est analysé dans son état naturel.

### **Spectroscopie lointain, moyen et proche infrarouge**

La partie infrarouge se compose de trois régions : l'infrarouge lointain (400 à 10  $\text{cm}^{-1}$ ), l'infrarouge moyen (4 000 à 400  $\text{cm}^{-1}$ ) et enfin le proche infrarouge (14 000 à 4 000  $\text{cm}^{-1}$ ). La première

région est souvent utilisée pour la spectroscopie rotationnelle de molécule, la deuxième concerne l'étude des vibrations fondamentales des molécules et la dernière se destine à étudier les vibrations harmoniques. Selon la spectroscopie, la source lumineuse sont différentes. Des filaments de globalar (carbure de silicium) ou encore des lampes à vapeur de mercure sont utilisés.

### **Appareil utilisé et préparation des échantillons**

Les mesures de spectroscopie en infrarouge FTIR sont réalisées sur un équipement de type Bruker Equinox 55 équipé d'un détecteur DTGS et une source Globalar. 2mg de poudre de nanoparticules sont mélangés avec 200 mg de KBr. Le tout est pressé pour former une pastille. 40 scans avec un pas de  $2\text{ cm}^{-1}$  sont collectés sur une région allant de  $4\ 000\text{-}400\text{cm}^{-1}$ .

Pour les mesures en ATR-FTIR, l'équipement utilisé est un Thermofisher Iz10. 10 scans avec une résolution de  $4\text{cm}^{-1}$  sont collectés pour chaque échantillon ( $4\ 000\text{-}525\text{ cm}^{-1}$ ).

#### **b) Spectroscopie Raman**

Cette technique de spectroscopie est basée sur l'étude de transitions vibrationnelles grâce aux processus de diffusion inélastique de la lumière. Les photons absorbés résultant de l'interaction molécule-lumière génère deux types de photons : les photons élastiques (même énergie que les photons incidents selon la diffusion de Rayleigh) et les photons inélastiques (perte d'énergie). Moins nombreux que les premiers photons (1 sur 10 000), les photons inélastiques (1 sur 100 000) correspondent à une transition vibrationnelle. Une source lumineuse intense est donc nécessaire pour mettre en évidence ce processus.

Cette technique est complémentaire à l'infrarouge et elle repose sur le même principe qu'est la vibration des liaisons atomiques constituant une molécule grâce à l'absorption d'énergie provenant d'un faisceau monochromatique engendrant des transitions entre différents niveaux d'énergie vibrationnelle. Cependant, certaines vibrations ne sont visibles que par effet Raman et d'autres seulement en infrarouge. Ainsi si les deux techniques sont employées, il est possible d'avoir le spectre vibrationnel complet de la molécule étudiée.

Cette technique est non destructive selon la puissance du laser, la préparation est simple et rapide et il est possible d'analyser des liquides, des poudres sous très haute pression par exemple. Principalement qualitative, elle est très utile pour indiquer des changements de polarisation de squelettes homo et hétéronucléaires. Chaque molécule possède une polarisabilité  $\alpha$  ( $P=\alpha E$ ) qui sous l'action d'un champ électrique  $E$  (V/m) induit un dipôle  $P$  (m/V). La polarisabilité est associée à la facilité qu'a le nuage électronique à se distordre sous l'effet d'un champ électrique appliqué. L'effet Raman existe quand la dérivée de la polarisabilité par rapport à  $q$  (coordonnées caractérisant le déplacement des atomes les uns par rapport aux autres pendant une vibration) est différente de la valeur nulle. Il est possible de connaître la structure chimique d'une molécule, les configurations cis ou trans, les forces intra ou intermoléculaires.

Cependant sa sensibilité est inférieure à l'infrarouge et les données sont encore peu nombreuses. Les échantillons fluorescents constituent un obstacle car l'effet Raman peut être masqué.

Au cours des mesures Raman sur des échantillons ferromagnétiques, des excitations magnétiques peuvent se produire : ce sont les magnons (ondes de spin). Les moments magnétiques des atomes subissent des rotations périodiques autour de la direction d'aimantation. Ce sont des modes d'excitations de basse énergie. Ces magnons induisent des modifications de la chaleur spécifique et une réduction de l'aimantation.

### **Préparation d'échantillon et appareil utilisé :**

Une poudre sèche de nanoparticules est déposée sur une lame mince en verre et est soumise à un faisceau lumineux monochromatique (laser) He/Ne ( $\lambda=632,8$  nm) avec une puissance de  $12\mu\text{W}$  provenant d'un instrument inVia Renichaw. Une correction de la ligne de base est appliquée sur certains échantillons.

## Annexe 9 : Zétamétrie

La zétamétrie est une technique d'analyse ayant pour but de caractériser le comportement des particules en suspension. Ce comportement est relié par les interactions de surface mises en jeu, la chimie de surface et la taille même des particules. Des charges de surface liée à la chimie de surface et à l'environnement (milieu liquide) sont présentes à proximité de la surface des particules. Ce sont ces charges (ions qui entourent la particule en solution) et plus précisément un potentiel, dit potentiel  $\zeta$ , qui est mesuré par le biais de cette technique d'analyse.

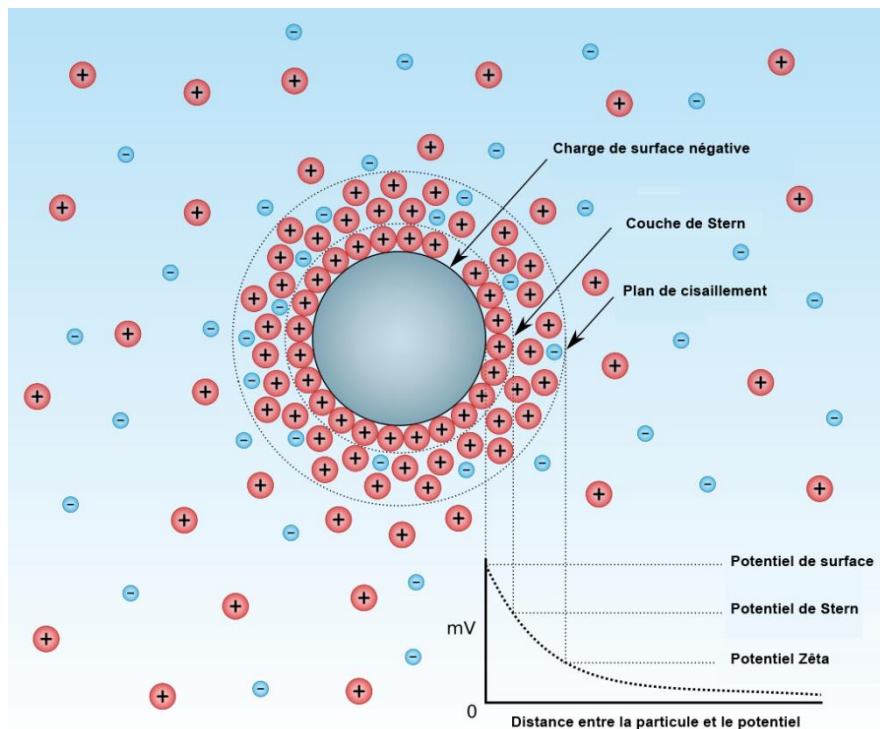
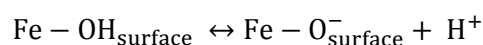
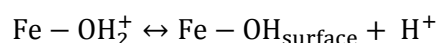


Figure 140 : Représentation schématique des différents potentiels présents à proximité de la surface de la particule<sup>350</sup>

### Les différentes couches situées au niveau de la surface de la nanoparticule dans un liquide

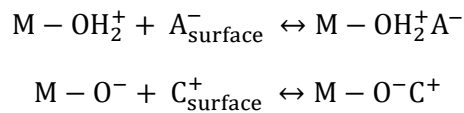
Les surfaces des particules d'oxydes de fer peuvent être considérées comme un défaut cristallin dans le sens où la structure périodique du réseau prend fin. Privés de leurs proches voisins et dans un état instable, les atomes tentent de remédier à ce problème en complétant leur coordinence par des réactions avec des molécules d'eau : c'est l'hydratation de surface. Des groupements hydroxyles se forment et possèdent des propriétés acido-basiques à l'origine de la charge de surface des particules d'oxydes de fer.



Les cations (A et C) se situant au niveau de l'interface solide/liquide entre les particules et le milieu environnant vont compléter leur charge avec les molécules d'eau à proximité. Une première couche

chimisorbée se forme à la surface des particules par la formation de groupements hydroxyles (Figure 140). Le potentiel se situant au niveau de cette couche est le plus fort.

Une seconde couche située plus loin du centre de la nanoparticule se forme. Son potentiel est plus faible que celui de la première couche. Celle-ci est appelée couche de Stern. Elle est en partie constituée de molécules d'eau physisorbées et accompagnent la particule dans son mouvement. Cette couche de Stern se décompose en une double couche : la première se compose d'ions ayant une très forte affinité avec la surface de la particule. Ils sont en effet situés très proche de cette dernière afin de conserver l'ordre local du milieu. Si la charge de la surface de la particule est négative, alors des cations positifs s'adsorbent sur la surface. A l'inverse, si cette dernière est négative alors des cations négatifs sont adsorbés. Un plan interne de Helmholtz (IHP) (distance de l'ordre de l'Angström) est défini et caractérise la distance séparant ces ions de la surface (Figure 141). Au-delà de ce plan se situe la deuxième partie de la couche de Stern. Elle s'étend jusqu'à le plan externe de Helmholtz (OHP) aussi appelé plan de cisaillement (Figure 141).



Elle représente une couche de diffusion qui suit le mouvement de la particule dans son milieu. C'est au niveau de ce plan qu'est mesuré le potentiel zêta. Une différence de potentiel entre le plan de cisaillement et l'électrolyte. C'est le potentiel le plus faible des trois (Figure 140). L'épaisseur de cette couche est définie selon l'équation suivante :

$$K^{-1} = \sqrt{\frac{\delta \cdot R \cdot T}{2000 \cdot I \cdot e^2 N}}$$

avec  $K^{-1}$  la longueur de Debye,  $\delta$  la permittivité relative,  $R$  la constante des gaz parfaits,  $T$  la température absolue en Kelvin,  $N$  le nombre d'Avogadro,  $e$  la charge électrique en C et  $I$  la force ionique définit selon l'équation suivante :

$$I = \frac{1}{2} \sum C_i z_i^2$$

avec  $z_i$  la charge de l'espèce et  $C_i$  sa concentration.

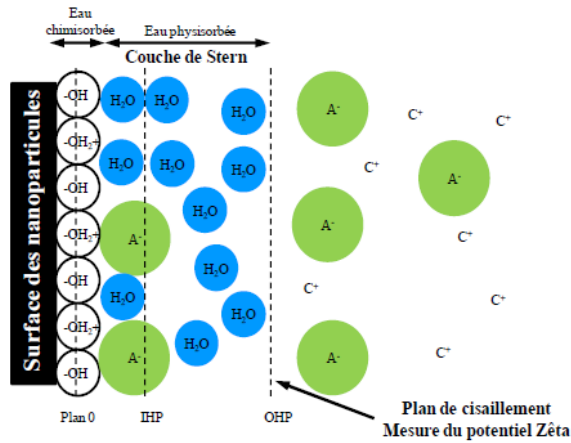


Figure 141 : Schéma représentant les différentes couches ou plan sur une surface d'oxyde de fer. A<sup>-</sup> représentent les anions et C<sup>+</sup> les cations en solution. IHP : plan interne de Helmholtz et OHP : plan externe de Helmholtz<sup>71</sup>

Cette couche de Stern influence la taille hydrodynamique des particules qui est différente de la vraie taille mesurée en MET par exemple. De plus selon la concentration en sel, l'épaisseur de cette couche varie. Une force ionique élevée en présence d'une forte concentration en sel induit une diminution de l'épaisseur de cette couche diffuse. A l'inverse, si la force ionique est faible (faible concentration en sel), la taille hydrodynamique augmentera. C'est pour cette raison qu'une concentration en sel (NaCl) de  $10^{-2}M$  est établie afin d'augmenter cette force ionique et d'avoir une épaisseur de couche diffuse faible.

### Mesure du potentiel zêta en mV

Généralement, le potentiel zêta est mesuré en fonction du pH (autotitration). Au-delà de |30| mV, une zone de stabilité est définie (Figure 142). Les particules sont susceptibles d'avoir une bonne stabilité en suspension à partir de cette valeur.<sup>351</sup> Le potentiel zêta est un indicateur de la stabilité colloïdale *via* les interactions électrostatiques. A un certain pH, le potentiel passe par une valeur nulle : c'est le point isoélectrique (PIE). La floculation des particules est maximale à cette valeur. Il caractérise la compensation des charges. Ce point est différent du point de charge nulle (PCN) qui caractérise l'absence de charge.

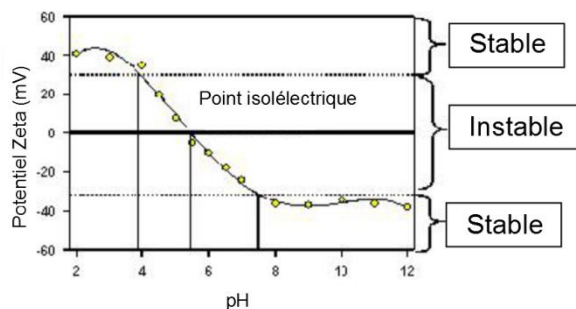


Figure 142 : Courbe type de la mesure du potentiel zêta en fonction du pH (inspirée de Talero *et al.*)<sup>352</sup>

La mesure du potentiel zêta est réalisée en utilisant le principe de la diffusion dynamique de la lumière de particules en mouvement sous l'action d'un champ électrique. A partir de la mobilité des particules (vitesse des particules) et un modèle mathématique comme le modèle de Smoluchowski, il est



possible de remonter au potentiel zêta. La constante diélectrique, l'indice de réfraction et la viscosité du milieu dans lequel sont les particules devront être connues. L'intensité du faisceau est adaptée selon la concentration par l'instrument de mesure. Il optimise le rapport signal sur bruit.

Sous l'action d'un champ électrique  $E$  (V/m), la particule acquiert une vitesse  $V$ (m/s) et sa mobilité électrophorétique  $\mu_e$  ( $m^2.V^{-1}.s^{-1}$ ) est reliée à ces deux grandeurs par la formule suivante :

$$\mu_e = \frac{V}{E}$$

A partir du modèle mathématique, le potentiel zêta est relié à la mobilité électrophorétique par la formule suivante :<sup>353</sup>

$$\mu_e = \frac{\epsilon_r \epsilon_0 \zeta}{\eta(T)}$$

avec  $\epsilon_r$  la constante de perméabilité relative ou constante diélectrique,  $\epsilon_0$  la constante de perméabilité du vide,  $\zeta$  le potentiel zêta (mV) et  $\eta$  la viscosité du milieu qui dépend de la température  $T$ .

### **Préparation des échantillons et appareil utilisé :**

Les mesures zétamétrique sont effectuées sur un Malvern Zetasizer Nano ZS. Le modèle de Smoluchowski est utilisé. De la poudre (~1mg) est mise en solution dans 12 mL d'eau déionisée avec une concentration molaire en NaCl de  $10^{-2}$ M. Les titrations sont réalisées à partir de solution préalablement préparées de HCl (0,1 M), NaOH (0,1 M) ou NaOH (0,01 M).

## Annexe 10 : BET

### Principe :

Cette technique de mesure permet de connaître la surface spécifique  $S_{\text{BET}}$  ( $\text{m}^2/\text{g}$ ) d'une poudre. Un gaz inerte d'azote (argon, krypton ou dioxyde de carbone selon le matériau) s'adsorbe à la surface des particules. La formation d'une monocouche moléculaire est utilisée pour connaître la surface spécifique BET. Pour déterminer le volume des pores et la distribution de la taille des pores, la condensation capillaire est appliquée si besoin est. Lors de la mesure, les molécules de la dernière couche adsorbée doivent être en équilibre avec la vapeur environnante.

L'isotherme est tracé en fonction de  $P/P_0$  (avec  $P_0$  la pression de saturation et  $P$  la pression partielle du gaz adsorbé en équilibre avec la surface). La droite résultante donne accès à la constante  $C$  et  $N_m$  à partir de la pente et l'ordonnée à l'origine. Cette constante évolue selon les interactions entre la surface et l'adsorbat. Un  $C$  élevé caractérise des interactions fortes. Si ce dernier est négatif, le domaine d'applicabilité est mal défini. Le domaine de travail  $P/P_0$  est souvent réalisé entre 0,05 et 0,35 car selon la théorie, les énergies d'adsorption des couches situées au-dessus de la première sont identiques et égales à l'énergie de liquéfaction. En dehors de ce domaine de pression, les hypothèses ne sont pas applicables.

A partir de cette valeur, le diamètre apparent des nanoparticules peut être déterminé en connaissant la masse volumique  $\rho$  ( $5,2 \text{ g/cm}^3$  pour la magnétite) :

$$S_{\text{BET}} = \frac{6}{\rho d}$$

### Préparation des échantillons :

Les échantillons sont dégazés durant 24 heures à  $100^\circ\text{C}$ . Les mesures sont réalisées sous azote. Les mesures de surface BET ont été réalisées sur un appareil de type Micromeritics Tristar II et le vide appliqué est de 20 mtorr.

## Annexe 11 : ATG

### Appareil utilisé :

Un instrument de type Discovery TGA-TA sous flux d'azote à 25mL/min est employé pour faire les mesures ATG. Une rampe en température de 5°C/min allant de 25°C à 800°C est appliquée durant les mesures.

Pour remonter au nombre de molécule par nm<sup>2</sup> à partir de la surface BET, la formule suivante est utilisée :

$$n = \frac{\Delta m}{100 \cdot N_a \cdot S_{BET} \cdot M \cdot 10^{18}}$$

avec  $n$  le nombre de molécule par nm<sup>2</sup>,  $\Delta m$  la différence de masse entre les deux échantillons analysés en %,  $N_a$  le nombre d'Avogadro,  $S_{BET}$  la surface spécifique en m<sup>2</sup>/g et  $M$  la masse molaire de la molécule dégradée en g/mol.

## Annexe 12 : DRX

### *Tiré du cours « Méthodes d'analyses et de caractérisations des solides » du Prof. N. Millot, Université de Bourgogne mai 2010*

A l'aide d'un D5000 Siemens, équipé d'un monochromateur avant en Germanium, qui émet un rayonnement monochromatique de longueur d'onde correspondante  $\lambda_{K\beta_{Cu}}=1,39222 \text{ \AA}$ , il est possible à partir des diffractogrammes acquis de remonter aux paramètres de maille, à la taille moyenne des cristallites et la nature de la phase cristalline synthétisée par la position des raies. Les mesures ont été réalisées sur une durée de 48 heures sur  $20$  à  $59^\circ$  en  $2\theta$ . Un pas de  $0,03^\circ$  et un temps de mesure par pas de 150s sont appliqués. Les données sont extraites par l'intermédiaire du logiciel Diffract-AT et de l'équation de Halder & Wagner (les profils de diffraction sont de types Voigt). Avant de traiter toutes données, il est nécessaire et important de connaître le profil vrai d'une raie d'un diffractogramme. Le profil expérimental du profil instrumental doit être désommé. La courbe de résolution instrumentale est tracée afin de quantifier les élargissements provoqués par l'appareil (divergence du faisceau, dispersion en longueur d'onde de la source, bruit électronique du détecteur, diffusion de l'air, environnement échantillon et la planéité de l'échantillon). Un matériau de référence supposé parfait (ne présentant aucune microdistorsion) est enregistré pour remonter à cette courbe: il s'agit de quartz.

Les profils sont de type Voigt et l'approximation de Wagner est utilisée :

$$\beta_{\text{vrai}} = \sqrt{\beta_{\text{exp}}^2 - \beta_{\text{exp}} * \beta_{\text{inst}}}$$

avec  $\beta$  la largeur intégrale expérimentale et  $\beta$  la largeur intégrale instrumentale.

Si les profils des raies de diffraction sont de type Voigt alors, la méthode Halder & Wagner est la plus appropriée. Si le profil des raies de diffraction avait été de type lorentzien, alors la méthode de Williamson & Hall aurait été la plus appropriée. La méthode Scherrer très utilisée encore aujourd'hui ne tient pas compte de ces nombreux paramètres (nature du profil des raies de diffraction).

Les profils de raies en DRX présentent aussi des élargissements liés au matériau. Si le matériau est de faible taille (cristaux nanométriques) alors un élargissement apparaît car l'échantillon analysé ne satisfait pas l'hypothèse du cristal infini. De même, un matériau présentant des défauts cristallins (mâcles, dislocations...) à participe à ce phénomène.

### **Méthode Halder & Wagner**

Pour obtenir l'élargissement des profils de raies dû au matériau, la formule suivante est utilisée :

$$\left(\frac{\beta_{\text{vrai}}^*}{d^*}\right)^2 = \frac{1}{\varepsilon} \frac{\beta_{\text{vrai}}^*}{d^{*2}} + \left(\frac{\eta}{2}\right)^2$$

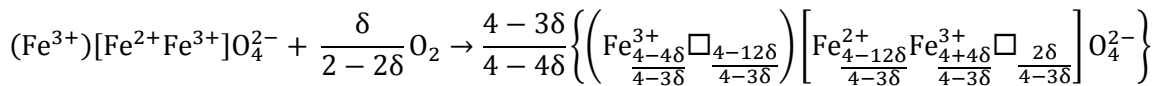
avec  $\varepsilon$  le paramètre lié à la taille ou à la forme de la particule, et  $\eta$  le paramètre lié aux contraintes.  $\beta^* = \beta \cos(\theta) / \lambda$  et  $d^* = 2 \sin(\theta) / \lambda$  sont les coordonnées réduites dépendant de l'angle de diffraction  $\theta$  et de la

longueur d'onde du rayonnement  $\lambda$ . La taille apparente des domaines cohérents de diffraction  $\varepsilon$  (où la taille des cristallites est égale à  $4/3$  si les grains sont sphériques et le taux de défauts de structure ( $\eta/5$ ) sont déduit des diagrammes d'Halder & Wagner.

Suite à une panne appareil, d'autres mesures ont été effectuées sur un appareil de type D8 Advance qui émet un rayonnement de longueur d'onde correspondante  $\lambda_{K\alpha 1,2}$  ( $\lambda\alpha 1 = 1.540598 \text{ \AA}$  et  $\lambda\alpha 2 = 1.544426 \text{ \AA}$ ). Les mesures sont réalisées sur une gamme en  $2\theta$  ( $25-65^\circ$ ) avec un pas de  $0,026^\circ$  et un temps de 52s par  $0,03^\circ$ . L'analyse des données ont été réalisée à partir du logiciel Topas®. La méthode de Le Bail est utilisée pour déterminée la taille moyenne des grains.

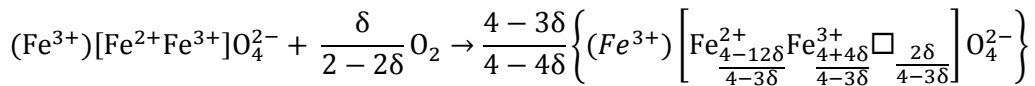
### Déterminer la déviation par rapport à la stœchiométrie en oxygène ( $\delta$ ) à l'aide de la méthode de Poix

$\delta$  représente la déviation par rapport à la stœchiométrie en oxygène. Cette donnée aux taux de cations de  $Fe^{2+}/Fe^{3+}$  est déterminée à partir de la méthode de Poix. L'oxydation de la magnétite ( $Fe_3O_4$ ) se note sous la forme d'une fixation d'oxygène et de création de nouvelle entité.



avec  $\square$  représentant une lacune,  $()$  les sites tétraédriques et  $[\ ]$  les sites octaédriques,  $\frac{4-3\delta}{4-4\delta}$  le nombre d'unités de structures présentes à un état d'oxydation donné.

Or les cations  $Fe^{3+}$  des sites octaédriques migrent vers les sites tétraédriques afin que les lacunes cationiques disparaissent des sites tétraédriques. La réaction globale d'oxydation devient alors :



La déviation  $\delta$  est déterminée à partir du paramètre de maille connu.

Une distance tétraédrique moyenne  $d_4$  et une distance octaédrique moyenne  $d_6$  sont définies de la manière suivante :

$$d_4 = \sum x_i d_{Ai} - O$$

$$d_6 = \sum x_i d_{Bi} - O$$

avec  $x_i$  est la teneur en cation  $i$  dans le site considéré,  $d_{Ai}-O$  la distance du cation  $i$ -oxygène et  $d_{Bi}-O$  la distance du cation  $i$ -oxygène. Ces distances cations-anions sont utilisées pour remonter au paramètre de maille d'une structure spinelle selon la formule suivante (Poix 1965) :

$$a = \frac{40}{11\sqrt{3}} d_4 + \sqrt{\frac{64}{11} d_6^2 - \frac{512}{363} d_4^2}$$

Ces distances sont regroupées dans le tableau suivant. Elles sont uniques et définies selon l'état de valence et de coordination du cation.

Cations	Distance cation-anion (nm)
Fe <sup>3+</sup> tétraédrique	0,18580
Fe <sup>3+</sup> octaédrique	0,20200
Fe <sup>2+</sup> octaédrique	0,21320
□	0,22394

Tableau 22 : Distance cation-anion (nm) selon la nature du cation

En connaissant les distances  $d_4$  et  $d_6$  il est possible à partir du paramètre de maille de Fe<sub>3(1-δ)</sub>O<sub>4</sub> de remonter à  $\delta$ .

$$d_4 = 0,18580$$

$$d_6 = \frac{0,8304 - 0,6403\delta}{4 - 3\delta}$$

$\delta$  varie entre 0 (magnétite pure) et 0,111 (maghémite).

## Annexe 13 : IRM

### Appareil utilisé

Les mesures du temps de relaxation transverse  $T_2$  à 3.0 T ont été effectuées à  $298 \pm 1$  K sur un appareil de type siemens Magnetom Trio TIM. La détermination du temps  $T_2$  s'est faite à l'aide d'une séquence écho de spin multi-échocs (ce type de séquences assure l'obtention de plusieurs images sur un même niveau de coupe sans augmenter le temps d'acquisition global) (Figure 143 et Figure 144). Un temps de répétition (durée au bout de laquelle on reproduit la séquence)  $T_R$  de 5000 ms est appliqué. Différents paramètres sont donnés tels que la matrice =  $256 \times 204$ , FOV (*field of view ou champ de vue en français*) est la dimension du champ d'acquisition =  $100 \times 80$  mm et épaisseur de coupe = 5 mm). Les images sont collectées sur 32 temps d'échos allant de  $T_E = 7,9$  ms à 252,8 ms avec un pas de 7,9 ms. Un temps d'écho important induira un contraste négatif important (Figure 145).

Les données de mesures sont traitées à l'aide du logiciel ImageJ. Le bruit de fond (zone en dehors des tubes) est déterminé sur les images afin de le prendre en compte dans les mesures des niveaux de gris. A chaque temps d'écho, la région d'intérêt de la zone concerné est mesurée.  $T_2$  est calculé en extrapolant l'intensité du signal mesuré *via* ImageJ comme une fonction de  $T_E$  selon l'équation suivante :

$$S(T_E) = S_0 e^{\frac{-T_E}{T_2}}$$

avec  $S_0$  l'intensité du signal à  $T_E$  (en ms),  $T_2$  le temps de relaxation (en ms).

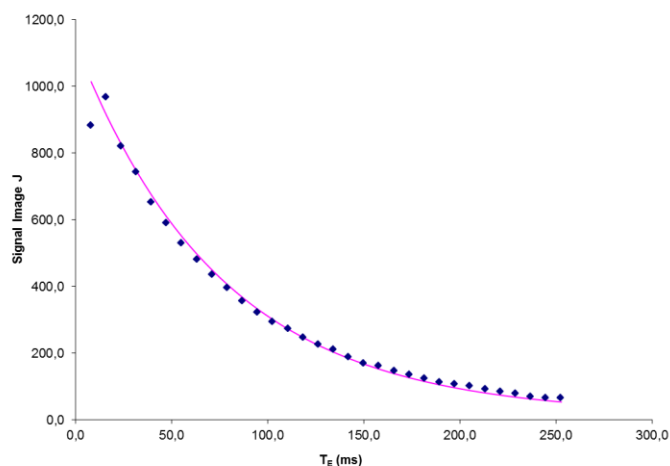


Figure 143 : Courbe  $S(T_E)$  déterminé à partir du signal ImageJ en fonction de  $T_E$  en ms

Enfin la relaxivité  $r_2$  ( $L \cdot mmol^{-1} \cdot s^{-1}$ ) est déterminée en extrapolant le taux de relaxation  $R_2$  ( $1/T_2$ ) en fonction de la concentration en fer selon la formule suivante :

$$R_2 = r_2 \times C + R_2^0$$

avec  $R_2^0$  le taux de relaxation sans la présence des agents superparamagnétiques

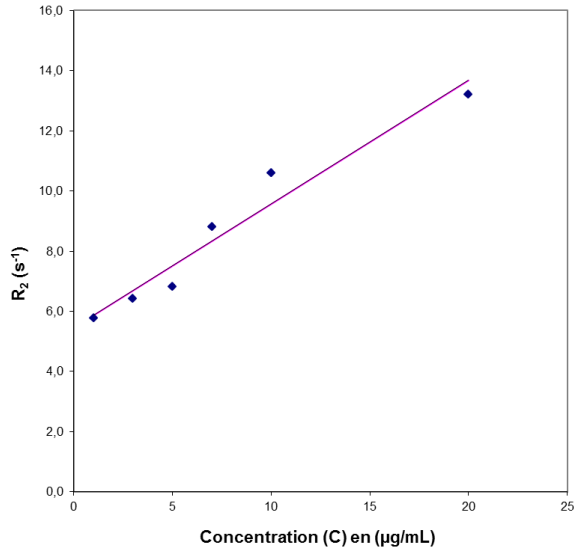


Figure 144 : Evolution du taux de relaxation  $R_2$  ( $s^{-1}$ ), en fonction de la concentration  $C$  en fer ( $\mu g \cdot mL^{-1}$ )

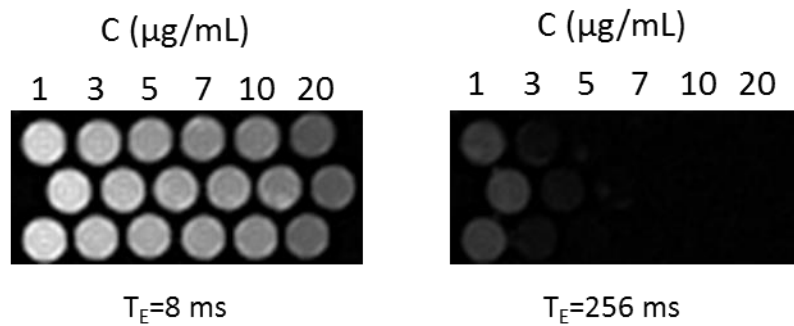


Figure 145 : Cartographie  $T_2$  de gels contenant des USPIO à différentes concentrations  $T_E=7,9$  ms (à gauche) et  $T_E=252,8$  (à droite)

En ce qui concerne la relaxivité  $r_1$  ( $L \cdot mmol^{-1} \cdot s^{-1}$ ), elle est déterminée en extrapolant le taux de relaxation  $R_1$  ( $1/T_1$ ) en fonction de la concentration en fer selon la formule suivante :

$$R_1 = r_1 \times C + R_1^0$$

avec  $R_1^0$  le taux de relaxation sans la présence des agents superparamagnétiques

$T_1$  est calculé en extrapolant l'intensité du signal mesuré via ImageJ comme une fonction de TI à partir de l'équation suivante :

$$M_C = \left| A * \left( 1 - \theta e^{\frac{-TI}{T_1}} \right) \right|$$

avec  $M_C$  l'intensité du signal obtenu à TI, A l'intensité du signal être obtenu à partir d'un échantillon se trouvant dans un état complètement relaxé,  $T_1$  le temps de relaxation longitudinale en ms et TI le temps d'inversion en ms

L'évolution du signal ImageJ est représentée sur la Figure 146.



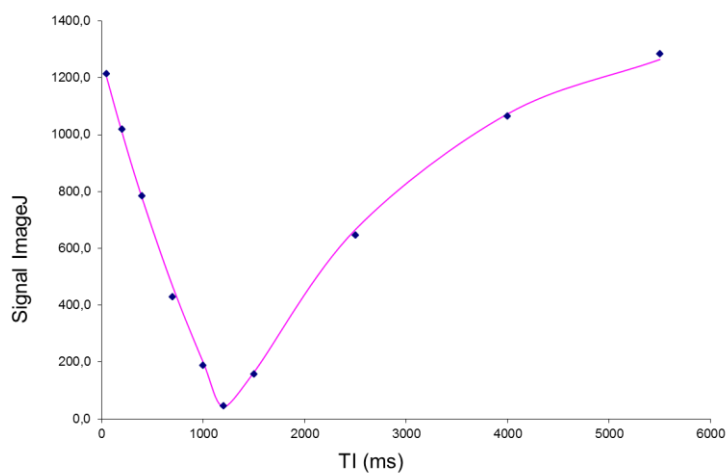


Figure 146 : Courbe de  $M_c$  en fonction de TI en ms

### Préparation des échantillons

Une gamme de concentration en oxyde de fer est préparée de la manière suivante : 1, 3, 5, 7, 10, 20  $\mu\text{g/mL}$ . 3 tubes IRM par concentration d'un même échantillon sont préparés. La suspension initiale d'oxyde de fer est mise au bain à ultrasons afin d'homogénéiser celle-ci. Une solution de d'acrylamide 30%, de TEMED (Tétraméthyléthylènediamine) (15 $\mu\text{L}$ ), APS (Ammonium persulfate) 10% massique (20  $\mu\text{L}$ ) est préparée. Puis la solution (volume adapté) de particules d'oxydes de fer est ajoutée. Le tout est complété par de l'eau pour atteindre un volume total de 9 mL. Les tubes préparés sont mis au bain marie à 60°C pendant 10 à 15 minutes.

## Annexe 14 : Tests de cytotoxicité et génotoxicité

### Cell culture:

The human hepatocellular carcinoma cell line HepG2 was obtained from ECACC (European collection of cell cultures) Routine monitoring has shown the HepG2 cells to be mycoplasma free (MycoAlert PLUS detection kit from Lonza). The cells were grown in monolayer culture in Minimal Essential Medium (MEM) supplemented with 1% of stable glutamine (PAA), 1% non-essential amino acids (PAA) and 10% fetal bovine serum (v/v) (FBS from PAA), in a humidified atmosphere at 37°C containing 5% CO<sub>2</sub>. Continuous cultures were maintained by subculturing flasks every 7 days at 2.10<sup>6</sup> cells/75 cm<sup>2</sup> by trypsination.

### Test plate preparation:

After washing with sterile phosphate buffer saline (PBS), cells were detached by trypsinization (0.05% trypsin/EDTA Gibco. 24 h before exposure HepG2 cells were seeded into 96-well plates (Dutscher,France) in 200 µL of complete culture medium at a final concentration of 5.10<sup>4</sup> cells/well for the kinetics of RNA synthesis, Alamar blue™ (AB) and comet assay.

### Treatments of HepG2 cells:

The cultures of HepG2 cells were grown at 37°C for 24 h then the cells were exposed to varying concentrations of SPIONs between 0.1 µg/mL<sup>-1</sup> to 100 µg.mL<sup>-1</sup>. The cytotoxicity and genotoxicity endpoints were checked at two time points, 4 and 24 h. Cell morphology was checked after this cell line was exposed to SPIONs for 4 or 24 h using phase-contrast microscopy (Olympus, CK40).

### IC50 value determination:

GraphPad Prism® 4.0 software was used to calculate the concentrations associated with 50% inhibition of measured parameter, percentage of cell viability here (IC<sub>50</sub> value), using a Hill function non-linear regression analysis. The IC<sub>50</sub> were transformed in log values for the assay. Linear regression analysis was used for that purpose.

### Transmission electron microscopy (TEM) on cells:

TEM observations of cells were realized on a HITACHI H-7500 operating at 80 kV. The HepG2 cells were seeded on 6 well plates and incubated at 37°C in the culture medium for 24 h before being treated with SPIONs. After 4 h of incubation with SPIONs (100 µg.mL<sup>-1</sup>) media was removed, cells were washed with PBS and samples were fixed in 4% paraformaldehyde and 1.4% of glutaraldehyde in Sorensen phosphate buffer (0.1 mMol.L<sup>-1</sup>, pH 7.4). After fixation, the samples were washed at least five times by Sorensen phosphate buffer and finally kept in this buffer overnight at 4°C. The post-fixation treatment was realized with 1% osmium tetroxide at room temperature for 1 h. Dehydration was done by washing with increasing degrees of ethyl alcohol (viz. 30°, 50°, 70° and 95°, each for 15 min) and finally three times with absolute alcohol for 15 min at room temperature. Then, the samples were washed two

times with 1:1 absolute ethanol:epoxy resin mixture at room temperature. Resin impregnation was done overnight at room temperature. The resin used for substitution and impregnation was EMBED-812 (Epoxy resin) with a mixture of DDSA, NMA and BDMA (DDSA: dodecenylsuccinic anhydride; NMA: Methyl-5-Norbornene-2,3 Dicarboxylic Anhydride ; BDMA : N-Benzyl-N,N-Dimethylamine).

The resin solution was finally filled in gelatin capsule and put in cell culture wells. The polymerization was started at 37°C and kept for one night and finally a 60°C temperature was maintained for 48 h. The polymer block thus obtained was cut with an ultramicrotome. The ultrafine slices with a thickness of 80–90 nm were deposited on copper and palladium grid of 200 mesh size. After drying, the samples were treated with uranyl acetate for contrast improvement (Papa, 2012).

### **Toxicity assays:**

Cell viability was determined through the kinetics of RNA synthesis and Alamar Blue™ uptake assays and a significant decrease in cell viability was considered as an indicator of cytotoxicity.

### **H<sup>3</sup>-uridine uptake kinetics:**

The original assay was first described by Fauris *et al.* (1985), adapted to HepG2 cells by Valentin (2001) and finally automated by Valentin-Severin (2002). The latest assay was used here. Briefly, RNA labeling was initiated by the addition of 30 µL tritiated uridine (0.8 M and 0.3 µCi per well) to each well containing HepG2 cells and 50 µL of culture medium. Uridine incorporation was stopped by adding 3% (w/v) SDS (30 µl) to each well after 5, 10, 15, 20, 25, and 30 min. The RNA synthesis rate was determined by calculating the slope of the straight regression line corresponding to the experimental values. This rate was then plotted against that obtained for the non-toxic blank, arbitrarily fixed to 100%. The results are expressed as a percentage of RNA synthesis in relation to the blank (control).

### **Alamar blue assay:**

The cell viability was performed using Alamar Blue™ assay (AB). AB is taken up in cells by passive diffusion and reduced in mitochondria. Continued growth maintains a reduced environment and causes the redox indicator to change from oxidized form (Resazurin: non-fluorescent, blue) to reduced form (Resofurin: fluorescent, red). HepG2 cells were seeded into 96-well plate (Dutscher, France) in 200 µL of complete culture medium with 10% FBS, at a final concentration of 5.10<sup>4</sup> cells/well. Twenty-four hours after seeding, medium was removed and cells were exposed to SPIONs in complete medium with 0.5% of FBS. Plates were then returned to incubator for 24 h. Medium was removed and replaced with 100 µL AB/well, dissolved in MEM 1X without phenol red, yielding a final concentration of 10% AB. Plates were then placed to incubator for 2 h and the absorbance was read on a plate reader (MRX Dynex) at 540 nm and 590 nm. The percent viability was expressed as fluorescence emitted by treated cells compared to control (medium or vehicle only) (Jondeau, 2006).

### **Comet assay:**

The comet assay, also known as the alkaline single-cell gel electrophoresis (SCGE) assay, is a very sensitive assay. The underlying principle is the ability of denatured DNA fragments to migrate during electrophoresis. Electrophoresis can be carried out under highly alkaline conditions (pH > 12.6) in order to detect single and double-strand breaks and alkali-labile lesions. Oxidative DNA damage was also determined, by adding a treatment with the DNA repair enzyme FPG (formamidopyrimidine DNA glycosylase, which converts oxidized purines, including the major purine oxidation product 8-oxoguanine, into single-strand breaks (therefore detectable by the Comet assay) through base-excision (Collins, 2009). The Comet assay was carried out according to Collins (2004), with slight modifications and following the general recommendations by (Tice, 2000). Twenty-four hours before exposure HepG2 cells were cultured in 96-well plates at a density of  $5 \cdot 10^4$  cells/well. Cells were then exposed for 24 h to different concentrations of SPIONs diluted in treatment medium (0.1, 0.5, 1, 5, 10, 15, 25, 50, 100  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ). The positive control consisted of cells grown in treatment medium for 24 h and exposed to 25  $\mu\text{M}$  methanesulfonate of methyl  $\text{C}_2\text{H}_6\text{O}_3\text{S}$  for the last 30 min. After exposure, the treatment medium was removed ; cells were washed with PBS, detached by trypsinization using trypsin-EDTA and centrifuged for 5 min at 1000 rpm, 4 °C. The recovered cell suspensions were embedded in 50  $\mu\text{L}$  of 0.5% LMP agarose and spread onto glass microscope slides previously coated with NMP agarose (1%), as two microgel replicates. After gel solidification, the cells were immersed for two hour in cold lysis solution (2.5M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris, 1% N-laurylsarcosine, pH 10) to which were added 10% DMSO and 1% Triton X-100 before use. Slides were then washed (3  $\times$  5 min) with enzyme buffer (40 mM HEPES, 100 mM KCl, 0.5 mM EDTA, 0.2 mg/mL BSA, pH 8) and the microgels were treated with 50  $\mu\text{L}$  of FPG (in enzyme buffer) or enzyme buffer only for 30min, in a humidified atmosphere at 37°C containing 5%  $\text{CO}_2$ . The slides were afterwards placed in cold electrophoresis buffer (100M NaOH, 200mM EDTA, pH 13) for 20 min to allow DNA unwinding and enhance expression of alkali-labile sites. Electrophoresis was run for 20 min at 25 V, 300 mA. Slides were neutralized in 0.4 M Tris-HCl buffer (pH 7.5) and allowed to dry at room temperature before staining with ethidium bromide (0.125  $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ ). For each treatment, 100 randomly selected nucleoids (50 from each microgel) were analyzed using an Imaging epifluorescence microscope equipped with a high resolution camera (Eclipse E600, NIKON). Scoring was done according to the number of cells present in each class (Pinto, 2014).

The percentage of DNA in the tail of the nucleoids was recorded as a measure of total DNA strand breakage. For each experimental condition three independent experiments were carried out with two replicate microgels. A statistical significant difference ( $p < 0.05$ ) between the treatment and the control group was considered a positive response.

### **Statistical analysis:**

Data for mean and standard deviation were generated from three independent experiments. Alamar Blue™ data were analyzed for significance by one-way analysis of variance (ANOVA) using GraphPad version 4.0. All analyzes were one-tailed, and  $p < 0.05$  was used to identify statistically significant differences.

### **Measurement of reactive oxygen species production with dihydroethidium:**

Overproduction of superoxide anion ( $O_2^-$ ) and hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) were detected with dihydroethidium (DHE; Life Technologies). DHE (also called hydroethidine) diffuses through cell membranes, and is rapidly oxidized in ethidium under the action of reactive oxygen species, mainly  $O_2^-$ . DHE (1.6 mM) was prepared in dimethyl sulfoxide, and used at 2  $\mu$ M. After 15 min at 37 °C, the fluorescent signals of DHE stained cells were collected through a 590/20 nm band pass filter, on a logarithmic scale on a GALAXY flow cytometer (Partec); 10,000 cells were acquired; data were analyzed with Flomax (Partec) or FlowJo (Tree Star Inc.) softwares.

## Annexe 15 : Valorisation des travaux de thèse

### Publications :

- *One-step continuous synthesis of functionalized magnetite nanoflowers*, G. Thomas, F. Demoisson, R. Chassagnon, E. Popova and N. Millot, **Nanotechnology**, resoumise le 27 novembre 2015 après corrections
- *Functionalized Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles: influence of ligand addition sequence and pH during their continuous hydrothermal synthesis*, G. Thomas, F. Demoisson, O. Heintz, N. Geoffroy, L. Saviot and N. Millot, **RSC Adv.**, *RSC Adv.* **5**, 78614 – 78624 (2015)

### Communications orales :

- *New versatile theranostic platforms based on SPIONs and titanate nanotubes*, **UCL French Embassy Science and Technology Workshops : Nanomaterials for Biomedical Application, 9-10 janvier 2014**, N. Millot et al., Londres, Angleterre, conférence invitée
- *Development of novel versatile theranostic platforms: from SPIONs to titanate nanotubes*, N. Millot et al., **4th Zing Bionanomaterials Conference, 6-9 avril 2014**, Narja, Espagne, conférence invitée
- *DOTA-functionalized magnetite nanoparticles as contrast agents for MRI/PET double imaging*, G. Thomas, F. Demoisson, J. Boudon, J. Paris, N. Millot, **Nano 2014, 13-18 juillet 2014**, Moscou, Russie, conférence invitée
- *Synthesis of SPIONs functionalized by DHCA, L-DOPA or citric acid under continuous hydrothermal conditions*, G. Thomas, F. Demoisson, N. Millot, **ISHA 2014, 26-29 juillet 2014**, Bordeaux, France, conférence
- *De nouvelles sondes nanoparticulaires pour l'imagerie médicale multimodale*, J. Boudon, G. Thomas, L. Maurizi, J. Paris, M. Moreau, Y. Bernhard, F. Demoisson, F. Bouyer, R. Decréau, N. Millot, **Matériaux 2014, 24-28 novembre 2014**, Montpellier, France, keynote
- *Nanoparticules de magnétite fonctionnalisées pour l'imagerie bimodale IRM/TEP*, G. Thomas, T. Courant, J. Boudon, M. Moreau, F. Demoisson et N. Millot, **JED 2015, 21-22 mai 2015**, Dijon, France
- *Multimodal imaging Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles labelled by DOTA and NODAGA for MRI/PET double imaging applications*, G. Thomas, T. Courant, J. Boudon, M. Moreau, P. Walker, F. Demoisson, N. Millot, MRS Fall Meeting, 29 novembre-4 décembre 2015, Boston (USA)

### Communications par affiche :

- *Synthèse hydrothermale en continu de nanoparticules superparamagnétiques fonctionnelles pour des applications biologiques*, G. Thomas, R. Chassagnon, O. Heintz, L. Saviot, F. Demoisson, N. Millot, **JED 2013, 30-31 mai 2013**, Dijon, France
- *Multimodal imaging magnetite nanoparticles labelled by NODAGA for MRI/PET double imaging applications*, G. Thomas, T. Courant, J. Boudon, M. Moreau, F. Demoisson and N. Millot, **Agents d'imagerie pour les applications en oncologie, FLI, 15-16 avril 2015**, Dijon, France
- *Multimodal imaging Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles produced by a one - pot full aqueous protocol for MRI/PET double imaging applications*, T. Courant, G. Thomas, J. Boudon, M. Moreau, P.

Walker, A. Oudot, B. Collin, F Brunotte, N. Millot, European Nanomedicine Meeting, 8-9 décembre 2015, Grenoble

Prix :

- Lauréat 2015 du Prix communication orale de l'Union des industries chimiques Bourgogne/Franche-Comté

Enseignements :

- 128 heures TD/TP : TP chimie Licence 2<sup>ème</sup> année SVTE, TD en 1<sup>ère</sup> année IUT GMP Dijon, TD et TP 1<sup>ère</sup> année SVTE, TP Master 1<sup>ère</sup> année CDM

## Bibliographie

1. A. K. Gupta and M. Gupta, *Biomaterials*, 2005, **26**, 3995-4021.
2. W.-Y. Huang and J. J. Davis, *Dalton Transactions*, 2011, **40**, 6087-6103.
3. S. K. Murthy, *International journal of nanomedicine*, 2007, **2**, 129-141.
4. K. E. Sapsford, W. R. Algar, L. Berti, K. B. Gemmill, B. J. Casey, E. Oh, M. H. Stewart and I. L. Medintz, *Chemical Reviews*, 2013, **113**, 1904-2074.
5. B. L. Cushing, V. L. Kolesnichenko and C. J. O'Connor, *Chemical Reviews*, 2004, **104**, 3893-3946.
6. D. E. Lee, H. Koo, I. C. Sun, J. H. Ryu, K. Kim and I. C. Kwon, *Chemical Society Reviews*, 2012, **41**, 2656-2672.
7. R. E. Rosensweig, *Cambridge University Press*, 1985.
8. U. Jeong, X. Teng, Y. Wang, H. Yang and Y. Xia, *Advanced Materials*, 2007, **19**, 33-60.
9. A. Masoudi, H. R. Madaah Hosseini, M. A. Shokrgozar, R. Ahmadi and M. A. Oghabian, *International Journal of Pharmaceutics*, 2012, **433**, 129-141.
10. J. Xie, K. Chen, J. Huang, S. Lee, J. Wang, J. Gao, X. Li and X. Chen, *Biomaterials*, 2010, **31**, 3016-3022.
11. Z. R. Stephen, F. M. Kievit and M. Q. Zhang, *Materials Today*, 2011, **14**, 330-338.
12. L. Maurizi, F. Bouyer, J. Paris, F. Demoisson, L. Saviot and N. Millot, *Chem. Commun.*, 2011, **47**, 11706-11708.
13. A. K. Gupta and S. Wells, *NanoBioscience, IEEE Transactions on*, 2004, **3**, 66-73.
14. K. H. Bae, Y. B. Kim, Y. Lee, J. Hwang, H. Park and T. G. Park, *Bioconjugate Chemistry*, 2010, **21**, 505-512.
15. S. K. Yen, P. Padmanabhan and S. T. Selvan, *Theranostics*, 2013, **3**, 975-992.
16. L. Zhang, W. F. Dong and H. B. Sun, *Nanoscale*, 2013, **5**, 7664-7684.
17. D. Patel, A. Kell, B. Simard, B. Xiang, H. Y. Lin and G. Tian, *Biomaterials*, 2011, **32**, 1167-1176.
18. L. Maurizi, A.-L. Papa, L. Dumont, F. Bouyer, P. Walker, D. Vandroux and N. Millot, *Journal of Biomedical Nanotechnology*, 2015, **11**, 126-136.
19. R. T. M. de Rosales, *Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals*, 2014, **57**, 298-303.
20. H. Bin Na, G. Palui, J. T. Rosenberg, X. Ji, S. C. Grant and H. Mattoussi, *Acs Nano*, 2012, **6**, 389-399.
21. Y. Xing, J. Zhao, P. S. Conti and K. Chen, 2014.
22. R. M. Cornell and U. Schwertmann, *The iron oxides: structure, properties, reactions, occurrences and uses*, Wiley. com, 2003.
23. S. Laurent, D. Forge, M. Port, A. Roch, C. Robic, L. Vander Elst and R. N. Muller, *Chemical Reviews*, 2009, **110**, 2574-2574.
24. T. D. Schladt, K. Schneider, H. Schild and W. Tremel, *Dalton Transactions*, 2011, **40**, 6315-6343.
25. A. S. Teja and P.-Y. Koh, *Progress in Crystal Growth and Characterization of Materials*, 2009, **55**, 22-45.
26. Y. Cudennec and A. Lecerf, *J. Solid State Chem.*, 2006, **179**, 716-722.
27. I. f. E. M. u. G. d. Elektrotechnik, Wüstite, [http://www.emg.tu-bs.de/forschung/material/wuestite\\_e.html](http://www.emg.tu-bs.de/forschung/material/wuestite_e.html), (accessed 2015).
28. S. Das, M. J. Hendry and J. Essilfie-Dughan, *Environmental Science & Technology*, 2011, **45**, 268-275.
29. M. Daschner de Tercero, *Near-critical and supercritical hydrothermal flow synthesis of metal oxide nanoparticles and hybrid metal oxide nanoparticles presenting clickable anchors*, Karlsruhe Institut für Technologie, 2014.



30. W. Bragg, *Nature*, 1915, **95**, 561.
31. A. Bee, R. Massart and S. Neveu, *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 1995, **149**, 6-9.
32. S. Sun and H. Zeng, *J. Am. Chem. Soc.*, 2002, **124**, 8204-8205.
33. C. Albornoz and S. E. Jacobo, *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 2006, **305**, 12-15.
34. A. B. Chin and I. I. Yaacob, *Journal of Materials Processing Technology*, 2007, **191**, 235-237.
35. A.-H. Lu, E. L. Salabas and F. Schüth, *Angewandte Chemie International Edition*, 2007, **46**, 1222-1244.
36. T. Arita, H. Hitaka, K. Minami, T. Naka and T. Adschiri, *The Journal of Supercritical Fluids*, 2011, **57**, 183-189.
37. T. Guillaume, Master 2<sup>ème</sup> année nanobiosciences, Université de Bourgogne, 2012.
38. N. R. Jana, Y. Chen and X. Peng, *Chemistry of Materials*, 2004, **16**, 3931-3935.
39. C. Cannas, D. Gatteschi, A. Musinu, G. Piccaluga and C. Sangregorio, *The Journal of Physical Chemistry B*, 1998, **102**, 7721-7726.
40. G. Zhang, Y. Liao and I. Baker, *Materials Science & Engineering C-Materials for Biological Applications*, 2010, **30**, 92-97.
41. W. Wu, Q. He and C. Jiang, *Nanoscale Res Lett*, 2008, **3**, 397-415.
42. S. Nigam, K. C. Barick and D. Bahadur, *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 2011, **323**, 237-243.
43. R. Y. Hong, B. Feng, L. L. Chen, G. H. Liu, H. Z. Li, Y. Zheng and D. G. Wei, *Biochemical Engineering Journal*, 2008, **42**, 290-300.
44. E. Karaoğlu, A. Baykal, H. Erdemi, L. Alpsoy and H. Sozeri, *Journal of Alloys and Compounds*, 2011, **509**, 9218-9225.
45. N. Mizutani, T. Iwasaki, S. Watano, T. Yanagida and T. Kawai, *Current Applied Physics*, 2010, **10**, 801-806.
46. H. Iida, K. Takayanagi, T. Nakanishi and T. Osaka, *Journal of Colloid and Interface Science*, 2007, **314**, 274-280.
47. D. Farrell, S. A. Majetich and J. P. Wilcoxon, *The Journal of Physical Chemistry B*, 2003, **107**, 11022-11030.
48. J. Rockenberger, E. C. Scher and A. P. Alivisatos, *J. Am. Chem. Soc.*, 1999, **121**, 11595-11596.
49. A. C. S. Samia, K. Hyzer, J. A. Schlueter, C.-J. Qin, J. S. Jiang, S. D. Bader and X.-M. Lin, *J. Am. Chem. Soc.*, 2005, **127**, 4126-4127.
50. G. Ennas, A. Musinu, G. Piccaluga, D. Zedda, D. Gatteschi, C. Sangregorio, J. L. Stanger, G. Concas and G. Spano, *Chemistry of Materials*, 1998, **10**, 495-502.
51. C. VIAZZI, PhD Science et Génie des Matériaux, Université de Toulouse, 2007.
52. Y. Lee, J. Lee, C. J. Bae, J. G. Park, H. J. Noh, J. H. Park and T. Hyeon, *Advanced Functional Materials*, 2005, **15**, 503-509.
53. T. J. Daou, G. Pourroy, S. Bégin-Colin, J. M. Grenèche, C. Ulhaq-Bouillet, P. Legaré, P. Bernhardt, C. Leuvrey and G. Rogez, *Chemistry of Materials*, 2006, **18**, 4399-4404.
54. Y. L. Hao and A. S. Teja, *Journal of Materials Research*, 2003, **18**, 415-422.
55. C. Xu and A. S. Teja, *The Journal of Supercritical Fluids*, 2008, **44**, 85-91.
56. C. Xu and A. S. Teja, *The Journal of Supercritical Fluids*, 2006, **39**, 135-141.
57. K. Byrappa and T. Adschiri, *Progress in Crystal Growth and Characterization of Materials*, 2007, **53**, 117-166.
58. K. Byrappa, S. Ohara and T. Adschiri, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2008, **60**, 299-327.
59. S. Takami, T. Sato, T. Mousavand, S. Ohara, M. Umetsu and T. Adschiri, *Materials Letters*, 2007, **61**, 4769-4772.
60. T. Togashi, S. Takami, K. Kawakami, H. Yamamoto, T. Naka, K. Sato, K. Abe and T. Adschiri, *Journal of Materials Chemistry*, 2012, **22**, 9041-9045.
61. T. Togashi, M. Umetsu, T. Naka, S. Ohara, Y. Hatakeyama and T. Adschiri, *J Nanopart Res*, 2011, **13**, 3991-3999.

62. M. D. de Tercero, C. Röder, U. Fehrenbacher, U. Teipel and M. Türk, *J Nanopart Res*, 2014, **16:2350**, 1-27.
63. M. Daschner de Tercero, I. Gonzáles Martínez, M. Herrmann, M. Bruns, C. Kübel, S. Jennewein, U. Fehrenbacher, L. Barner and M. Türk, *The Journal of Supercritical Fluids*, 2013, **82**, 83-95.
64. M. D. de Tercero, M. Bruns, I. G. Martínez, M. Türk, U. Fehrenbacher, S. Jennewein and L. Barner, *Particle & Particle Systems Characterization*, 2013, **30**, 229-234.
65. T. Togashi, T. Naka, S. Asahina, K. Sato, S. Takami and T. Adschiri, *Dalton Transactions*, 2011, **40**, 1073-1078.
66. D. Aymes, M. Ariane, F. Bernard, H. Muhr and F. Demoisson, *WO*, 2011, **2011010056**, A1.
67. F. Demoisson, M. Ariane, R. Piolet and F. Bernard, *Advanced Engineering Materials*, 2011, **13**, 487-493.
68. F. Demoisson, R. Piolet and F. Bernard, *The Journal of Supercritical Fluids*, 2015, **97**, 268-274.
69. A. Delattre, Thèse, Université Joseph-Fourier-Grenoble I, 2010.
70. V. K. LaMer and R. H. Dinegar, *J. Am. Chem. Soc.*, 1950, **72**, 4847-4854.
71. L. Maurizi, Thèse, Université de Bourgogne, 2010.
72. J.-P. Jolivet, M. Henry and J. Livage, *Metal oxide chemistry and synthesis: from solution to solid state*, Wiley-Blackwell, 2000.
73. J.-P. Jolivet and E. Tronc, *Journal of Colloid and Interface Science*, 1988, **125**, 688-701.
74. K. Byrappa and M. Yoshimura, in *Handbook of Hydrothermal Technology (Second Edition)*, eds. K. Byrappa and M. Yoshimura, William Andrew Publishing, Oxford, 2013, pp. 615-762.
75. T. Mousavand, S. Ohara, M. Umetsu, J. Zhang, S. Takami, T. Naka and T. Adschiri, *The Journal of Supercritical Fluids*, 2007, **40**, 397-401.
76. T. Mousavand, S. Takami, M. Umetsu, S. Ohara and T. Adschiri, *Journal of Materials Science*, 2006, **41**, 1445-1448.
77. D. W. Matson, J. C. Linehan and R. M. Bean, *Materials Letters*, 1992, **14**, 222-226.
78. R. Ahmadi, A. Masoudi, H. R. Madaah Hosseini and N. Gu, *Ceramics International*, 2013, **39**, 4999-5005.
79. A. Cabañas and M. Poliakoff, *Journal of Materials Chemistry*, 2001, **11**, 1408-1416.
80. J. Liang, L. Li, M. Luo, J. Fang and Y. Hu, *Solid State Sciences*, 2010, **12**, 1422-1425.
81. M.-T. Liang, S.-H. Wang, Y.-L. Chang, H.-I. Hsiang, H.-J. Huang, M.-H. Tsai, W.-C. Juan and S.-F. Lu, *Ceramics International*, 2010, **36**, 1131-1135.
82. K. Sue, M. Aoki, T. Sato, D. Nishio-Hamane, S.-i. Kawasaki, Y. Hakuta, Y. Takebayashi, S. Yoda, T. Furuya, T. Sato and T. Hiaki, *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 2011, **50**, 9625-9631.
83. K. Sue, T. Sato, S.-i. Kawasaki, Y. Takebayashi, S. Yoda, T. Furuya and T. Hiaki, *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 2010, **49**, 8841-8846.
84. M. Willard, L. Kurihara, E. Carpenter, S. Calvin and V. Harris, *International Materials Reviews*, 2004, **49**, 125-170.
85. B. Xin, Thèse, Université de Bourgogne, 2005.
86. D. Chen and R. Xu, *Materials Research Bulletin*, 1998, **33**, 1015-1021.
87. F. Ozel, H. Kockar and O. Karaagac, *Journal of Superconductivity and Novel Magnetism*, 2014, **28**, 823-829.
88. N. Mizutani, T. Iwasaki, S. Watano, T. Yanagida, H. Tanaka and T. Kawai, *Bull Mater Sci*, 2008, **31**, 713-717.
89. H. Zhu, C. Hou, Y. J. Li, G. H. Zhao, X. Liu, K. Hou and Y. F. Li, *Chem.-Asian J.*, 2013, **8**, 1447-1454.
90. J. Niu, F. Wang, X. Zhu, J. Zhao and J. Ma, *RSC Advances*, 2014, **4**, 37761-37766.
91. C. Han, D. Zhao, C. Deng and K. Hu, *Materials Letters*, 2012, **70**, 70-72.
92. B. Mao, Z. Kang, E. Wang, S. Lian, L. Gao, C. Tian and C. Wang, *Materials Research Bulletin*, 2006, **41**, 2226-2231.

93. J. Santoyo Salazar, L. Perez, O. de Abril, L. Truong Phuoc, D. Ihiawakrim, M. Vazquez, J.-M. Greneche, S. Begin-Colin and G. Pourroy, *Chemistry of Materials*, 2011, **23**, 1379-1386.
94. O. Horner, S. Neveu, S. Montredon, J.-M. Siaugue and V. Cabuil, *J Nanopart Res*, 2009, **11**, 1247-1250.
95. E. Lester, P. Blood, J. Denyer, D. Giddings, B. Azzopardi and M. Poliakoff, *The Journal of Supercritical Fluids*, 2006, **37**, 209-214.
96. T. Adschiri, K. Kanazawa and K. Arai, *Journal of the American Ceramic Society*, 1992, **75**, 1019-1022.
97. F. Demoisson, M. Ariane, A. Leybros, H. Muhr and F. Bernard, *The Journal of Supercritical Fluids*, 2011, **58**, 371-377.
98. S. I. Kawasaki, K. Sue, R. Ookawara, Y. Wakashima, A. Suzuki, Y. Hakuta and K. Arai, *J. Supercrit. Fluids*, 2010, **54**, 96-102.
99. K. Sue, S.-i. Kawasaki, M. Suzuki, Y. Hakuta, H. Hayashi, K. Arai, Y. Takebayashi, S. Yoda and T. Furuya, *Chemical Engineering Journal*, 2011, **166**, 947-953.
100. R. Piolet, Thèse, Université de Bourgogne, 2014.
101. T. Sato, K. Sue, W. Suzuki, M. Suzuki, K. Matsui, Y. Hakuta, H. Hayashi, K. Arai, S.-i. Kawasaki, A. Kawai-Nakamura and T. Hiaki, *Industrial & Engineering Chemistry Research* 2008, **47**.
102. B. C. Kriedemann, Cape Peninsula University of Technology, 2014.
103. C. Aymonier, A. Loppinet-Serani, H. Reverón, Y. Garrabos and F. Cansell, *The Journal of Supercritical Fluids*, 2006, **38**, 242-251.
104. J. L. Yu and P. E. Savage, *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 1998, **37**, 2-10.
105. T. Fujii, R. Hayashi, S.-i. Kawasaki, A. Suzuki and Y. Oshima, *The Journal of Supercritical Fluids*, 2012, **71**, 114-119.
106. L. Maurizi, F. Bouyer, M. Ariane, R. Chassagnon and N. Millot, *RSC Advances*, 2014, **4**, 45673-45678.
107. S. Ohara, T. Mousavand, T. Sasaki, M. Umetsu, T. Naka and T. Adschiri, *Journal of Materials Science*, 2008, **43**, 2393-2396.
108. B. Veriansyah, M.-S. Chun and J. Kim, *Chemical Engineering Journal*, 2011, **168**, 1346-1351.
109. K. J. Ziegler, R. C. Doty, K. P. Johnston and B. A. Korgel, *J. Am. Chem. Soc.*, 2001, **123**, 7797-7803.
110. J. Lu, K. Minami, S. Takami, M. Shibata, Y. Kaneko and T. Adschiri, *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2012, **4**, 351-354.
111. M. Daschner de Tercero, C. Röder, U. Fehrenbacher, U. Teipel and M. Türk, *Journal of Nanoparticle Research*, 2014, **16**, 1-27.
112. M. Răcuciu, D. E. Creangă and A. Airinei, *Eur. Phys. J. E*, 2006, **21**, 117-121.
113. B. Behdadfar, A. Kermanpur, H. Sadeghi-Aliabadi, M. d. P. Morales and M. Mozaffari, *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 2012, **324**, 2211-2217.
114. M. E. de Sousa, M. B. Fernández van Raap, P. C. Rivas, P. Mendoza Zélis, P. Girardin, G. A. Pasquevich, J. L. Alessandrini, D. Muraca and F. H. Sánchez, *The Journal of Physical Chemistry C*, 2013, **117**, 5436-5445.
115. E. Cheraghipour, A. M. Tamaddon, S. Javadpour and I. J. Bruce, *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 2013, **328**, 91-95.
116. G. Liu, J. Gao, H. Ai and X. Chen, *Small*, 2013, **9**, 1533-1545.
117. H. Lee, E. Lee, D. K. Kim, N. K. Jang, Y. Y. Jeong and S. Jon, *J. Am. Chem. Soc.*, 2006, **128**, 7383-7389.
118. F.-Y. Cheng, C.-H. Su, Y.-S. Yang, C.-S. Yeh, C.-Y. Tsai, C.-L. Wu, M.-T. Wu and D.-B. Shieh, *Biomaterials*, 2005, **26**, 729-738.
119. I. J. Bruce and T. Sen, *Langmuir*, 2005, **21**, 7029-7035.
120. M. Rutnakornpituk, N. Puangsin, P. Theamdee, B. Rutnakornpituk and U. Wichai, *Polymer*, 2011, **52**, 987-995.
121. J. H. Gao, H. W. Gu and B. Xu, *Accounts of Chemical Research*, 2009, **42**, 1097-1107.

122. E. Amstad, T. Gillich, I. Bilecka, M. Textor and E. Reimhult, *Nano Letters*, 2009, **9**, 4042-4048.
123. E. Amstad, S. Zurcher, A. Mashaghi, J. Y. Wong, M. Textor and E. Reimhult, *Small*, 2009, **5**, 1334-1342.
124. H. C. Kolb, M. G. Finn and K. B. Sharpless, *Angewandte Chemie International Edition*, 2001, **40**, 2004-2021.
125. T. Belin, N. Millot, N. Bovet and M. Gailhanou, *J. Solid State Chem.*, 2007, **180**, 2377-2385.
126. B. V. Neamțu, Thèse, Université Joseph-Fourier-Grenoble I, 2010.
127. L.-M. Lacroix, Thèse, Université de Toulouse, 2008.
128. D. Dunlop and O. Özdemir, *Cambridge Studies in Magnetism*, Cambridge University Press, Cambridge, 573pp.
129. H. Zijlstra and E. Wohlfarth, *Vol. 3 North-Holland, Amsterdam*, 1982, 55.
130. T. J. Daou, Thèse, Université Louis Pasteur, Strasbourg I, 2007.
131. E.-D. Ciuculescu, Thèse, Université Toulouse III-Paul Sabatier 2007.
132. B. Issa, I. M. Obaidat, B. A. Albiss and Y. Haik, *International Journal of Molecular Sciences*, 2013, **14**, 21266-21305.
133. S. Linderoth, P. V. Hendriksen, F. Bo/dker, S. Wells, K. Davies, S. W. Charles and S. Mo/rup, *J. Appl. Phys.*, 1994, **75**, 6583-6585.
134. C. de Montferrand, L. Hu, I. Milosevic, V. Russier, D. Bonnin, L. Motte, A. Brioude and Y. Lalatonne, *Acta Biomaterialia*, 2013, **9**, 6150-6157.
135. M. P. Morales, S. Veintemillas-Verdaguer, M. I. Montero, C. J. Serna, A. Roig, L. Casas, B. Martínez and F. Sandiumenge, *Chemistry of Materials*, 1999, **11**, 3058-3064.
136. S. Mørup, E. Brok and C. Frandsen, *Journal of Nanomaterials*, 2013, **2013**.
137. W. Baaziz, B. P. Pichon, S. Fleutot, Y. Liu, C. Lefevre, J.-M. Greneche, M. Toumi, T. Mhiri and S. Begin-Colin, *The Journal of Physical Chemistry C*, 2014, **118**, 3795-3810.
138. H. Basti, L. Ben Tahar, L. S. Smiri, F. Herbst, M. J. Vaulay, F. Chau, S. Ammar and S. Benderbous, *Journal of Colloid and Interface Science*, 2010, **341**, 248-254.
139. T. J. Daou, J. M. Greneche, G. Pourroy, S. Buathong, A. Derory, C. Ulhaq-Bouillet, B. Donnio, D. Guillon and S. Begin-Colin, *Chemistry of Materials*, 2008, **20**, 5869-5875.
140. D. Peddis, C. Cannas, G. Piccaluga, E. Agostinelli and D. Fiorani, *Nanotechnology*, 2010, **21**, 125705.
141. B. Martinez, X. Obradors, L. Balcells, A. Rouanet and C. Monty, *Physical Review Letters*, 1998, **80**, 181.
142. Macfenchel, Spin canting, [http://en.wikipedia.org/wiki/Spin\\_canting](http://en.wikipedia.org/wiki/Spin_canting), (accessed 2015).
143. Zureks, Verre de spin, [http://fr.wikipedia.org/wiki/Verre\\_de\\_spin](http://fr.wikipedia.org/wiki/Verre_de_spin), (accessed 2015).
144. A. Mitra, J. Mohapatra, S. S. Meena, C. V. Tomy and M. Aslam, *The Journal of Physical Chemistry C*, 2014, **118**, 19356-19362.
145. D. Caruntu, G. Caruntu and C. J. O'Connor, *Journal of physics D: Applied physics*, 2007, **40**, 5801.
146. K. Mandel, F. Hutter, C. Gellermann and G. Sextl, *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 2013, **331**, 269-275.
147. A. K. L. Yuen, G. A. Hutton, A. F. Masters and T. Maschmeyer, *Dalton Transactions*, 2012, **41**, 2545-2559.
148. P. Guardia, B. Batlle-Brugal, A. G. Roca, O. Iglesias, M. P. Morales, C. J. Serna, A. Labarta and X. Batlle, *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 2007, **316**, E756-E759.
149. D. K. Nagesha, B. D. Plouffe, M. Phan, L. H. Lewis, S. Sridhar and S. K. Murthy, *J. Appl. Phys.*, 2009, **105**.
150. C.-C. Huang, K.-Y. Chuang, C.-P. Chou, M.-T. Wu, H.-S. Sheu, D.-B. Shieh, C.-Y. Tsai, C.-H. Su, H.-Y. Lei and C.-S. Yeh, *Journal of Materials Chemistry*, 2011, **21**, 7472-7479.
151. Y. Tian, B. Yu, X. Li and K. Li, *Journal of Materials Chemistry*, 2011, **21**, 2476-2481.
152. G. Kataby, Y. Kolytyn, A. Ulman, I. Felner and A. Gedanken, *Applied Surface Science*, 2002, **201**, 191-195.
153. T. J. Daou, S. Begin-Colin, J. M. Grenèche, F. Thomas, A. Derory, P. Bernhardt, P. Legaré and G. Pourroy, *Chemistry of Materials*, 2007, **19**, 4494-4505.

154. N. T. Thanh, *Magnetic Nanoparticles: From Fabrication to Clinical Applications*, CRC Press, 2012.
155. W. C. Nunes, W. S. D. Folly, J. P. Sinnecker and M. A. Novak, *Phys. Rev. B*, 2004, **70**, 014419.
156. D. J. Dunlop, *Journal of Geophysical Research: Solid Earth*, 1982, **87**, 1121-1126.
157. D. Maggioni, P. Arosio, F. Orsini, A. M. Ferretti, T. Orlando, A. Manfredi, E. Ranucci, P. Ferruti, G. D'Alfonso and A. Lascialfari, *Dalton Transactions*, 2014, **43**, 1172-1183.
158. J. L. Dormann, D. Fiorani and E. Tronc, in *Advances in Chemical Physics*, John Wiley & Sons, Inc., 2007, pp. 283-494.
159. M. Azeggagh and H. Kachkachi, *Phys. Rev. B*, 2007, **75**.
160. D. Kavich, S. Hasan, S. Mahajan, J.-H. Park and J. Dickerson, *Nanoscale Res Lett*, 2010, **5**, 1540-1545.
161. M. A. McAteer, J. E. Schneider, Z. A. Ali, N. Warrick, C. A. Bursill, C. von zur Muhlen, D. R. Greaves, S. Neubauer, K. M. Channon and R. P. Choudhury, *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 2008, **28**, 77-83.
162. R. Qiao, C. Yang and M. Gao, *Journal of Materials Chemistry*, 2009, **19**, 6274-6293.
163. M. A. Brown and R. C. Semelka, *MRI: basic principles and applications*, Wiley. com, 2011.
164. M. Port, Principe de l'IRM - Les agents de contrastes, <http://culturesciences.chimie.ens.fr/content/principe-de-lirm-les-agentes-de-contraste-759>, (accessed 2015).
165. G. J. Stasiuk and N. J. Long, *Chem. Commun.*, 2013, **49**, 2732-2746.
166. A. Figuerola, R. Di Corato, L. Manna and T. Pellegrino, *Pharmacological Research*, 2010, **62**, 126-143.
167. J. F. Berret, N. Schonbeck, F. Gazeau, D. El Kharrat, O. Sandre, A. Vacher and M. Airiau, *J. Am. Chem. Soc.*, 2006, **128**, 1755-1761.
168. J. M. Perez, L. Josephson, T. O'Loughlin, D. Hogemann and R. Weissleder, *Nat Biotech*, 2002, **20**, 816-820.
169. Y. Gossuin, P. Gillis, A. Hocq, Q. L. Vuong and A. Roch, *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology*, 2009, **1**, 299-310.
170. J.-F. Morfin, J.-C. Beloeil and E. Toth, *Techniques de l'ingénieur*, 2014.
171. J.-M. Idée, C. Berthommier, V. Goulas, C. Corot, R. Santus, C. Hermine, M. Schaefer and B. Bonnemain, *Biometals*, 1998, **11**, 113-123.
172. N. Krasnow, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1972, **282**, 187-194.
173. A. Eggenpiller, Thèse, Université de Bourgogne, 2012.
174. M. A. Sieber, T. Steger-Hartmann, P. Lengsfeld and H. Pietsch, *Journal of Magnetic Resonance Imaging*, 2009, **30**, 1268-1276.
175. C. D. Wiginton, B. Kelly, A. Oto, M. Jesse, P. Aristimuno, R. Ernst and G. Chaljub, *American Journal of Roentgenology*, 2008, **190**, 1060-1068.
176. B. Drahos, I. Lukes and E. Toth, *European Journal of Inorganic Chemistry*, 2012, 1975-1986.
177. H. Kobayashi, R. Watanabe and P. L. Choyke, *Theranostics*, 2014, **4**, 81.
178. X. Yang, H. Hong, J. J. Grailer, I. J. Rowland, A. Javadi, S. A. Hurley, Y. Xiao, Y. Yang, Y. Zhang, R. J. Nickles, W. Cai, D. A. Steeber and S. Gong, *Biomaterials*, 2011, **32**, 4151-4160.
179. W. Semmler and M. Schwaiger, *Molecular Imaging I*, Springer Berlin Heidelberg, 2008.
180. P. Reimer and B. Tombach, *European radiology*, 1998, **8**, 1198-1204.
181. L. Meng Meng, K. Do-Kyung, A. J. El Haj and J. Dobson, *NanoBioscience, IEEE Transactions on*, 2008, **7**, 298-305.
182. I. Raynal, P. Prigent, S. Peyramaure, A. Najid, C. Rebuzzi and C. Corot, *Investigative radiology*, 2004, **39**, 56-63.
183. M. Di Marco, C. Sadun, M. Port, I. Guilbert, P. Couvreur and C. Dubernet, *International journal of nanomedicine*, 2007, **2**, 609.
184. H. Ittrich, K. Peldschus, N. Raabe, M. Kaul and G. Adam, *Rofo-Fortschritte Auf Dem Gebiet Der Rontgenstrahlen Und Der Bildgebenden Verfahren*, 2013, **185**, 1149-1166.
185. E. M. Shapiro, S. Skrtic and A. P. Koretsky, *Magnetic Resonance in Medicine*, 2005, **53**, 329-338.

186. L. H. Deddens, G. A. van Tilborg, A. van der Toorn, H. E. de Vries and R. M. Dijkhuizen, *Contrast Media & Molecular Imaging*, 2013, **8**, 393-401.
187. H. Kobayashi and M. W. Brechbiel, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2005, **57**, 2271-2286.
188. U. Sakulku, M. Mahmoudi, L. Maurizi, J. Salaklang and H. Hofmann, *Sci. Rep.*, 2014, **4**.
189. N. Singh, G. J. Jenkins, R. Asadi and S. H. Doak, *Nano reviews*, 2010, **1**.
190. K. H. Bae, M. Park, M. J. Do, N. Lee, J. H. Ryu, G. W. Kim, C. Kim, T. G. Park and T. Hyeon, *Acs Nano*, 2012, **6**, 5266-5273.
191. Q. A. Pankhurst, J. Connolly, S. Jones and J. Dobson, *Journal of physics D: Applied physics*, 2003, **36**, R167.
192. F. Q. Hu, L. Wei, Z. Zhou, Y. L. Ran, Z. Li and M. Y. Gao, *Advanced Materials*, 2006, **18**, 2553-2556.
193. C. Sun, O. Veiseh, J. Gunn, C. Fang, S. Hansen, D. Lee, R. Sze, R. G. Ellenbogen, J. Olson and M. Zhang, *Small*, 2008, **4**, 372-379.
194. K. L. Hultman, A. J. Raffo, A. L. Grzenda, P. E. Harris, T. R. Brown and S. O'Brien, *Acs Nano*, 2008, **2**, 477-484.
195. J. W. Bulte, M. de Cuyper, D. Despres and J. A. Frank, *Journal of Magnetic Resonance Imaging*, 1999, **9**, 329-335.
196. J.-H. Lee, Y.-M. Huh, Y.-w. Jun, J.-w. Seo, J.-t. Jang, H.-T. Song, S. Kim, E.-J. Cho, H.-G. Yoon, J.-S. Suh and J. Cheon, *Nat Med*, 2007, **13**, 95-99.
197. A. A. Gilad, P. Walczak, M. T. McMahon, H. B. Na, J. H. Lee, K. An, T. Hyeon, P. C. M. van Zijl and J. W. M. Bulte, *Magnetic Resonance in Medicine*, 2008, **60**, 1-7.
198. A. Annapragada, *Annual Review of Medicine*, 2015, **66**, 177-193.
199. M. Mahmoudi, I. Lynch, M. R. Ejtehadi, M. P. Monopoli, F. B. Bombelli and S. Laurent, *Chemical Reviews*, 2011, **111**, 5610-5637.
200. M. Rahman, S. Laurent, N. Tawil, L. H. Yahia and M. Mahmoudi, *Protein-Nanoparticle Interactions: The Bio-Nano Interface*, Springer, 2013.
201. P. d. Pino, B. Pelaz, Q. Zhang, P. Maffre, G. U. Nienhaus and W. J. Parak, *Materials Horizons*, 2014, **1**, 301-313.
202. H. J. Chung, H. Lee, K. H. Bae, Y. Lee, J. Park, S.-W. Cho, J. Y. Hwang, H. Park, R. Langer, D. Anderson and T. G. Park, *Acs Nano*, 2011, **5**, 4329-4336.
203. A. S. Karakoti, S. Das, S. Thevuthasan and S. Seal, *Angewandte Chemie International Edition*, 2011, **50**, 1980-1994.
204. J. V. Jokerst, T. Lobovkina, R. N. Zare and S. S. Gambhir, *Nanomedicine (London, England)*, 2011, **6**, 715-728.
205. T. Gillich, C. Acikgöz, L. Isa, A. D. Schlüter, N. D. Spencer and M. Textor, *Acs Nano*, 2013, **7**, 316-329.
206. C. Cruje and D. Chithrani, *J Nanomed Res*, 2014, **1**, 00006.
207. D. Pozzi, V. Colapicchioni, G. Caracciolo, S. Piovesana, A. L. Capriotti, S. Palchetti, S. De Grossi, A. Riccioli, H. Amenitsch and A. Lagana, *Nanoscale*, 2014, **6**, 2782-2792.
208. B. Feng, R. Y. Hong, L. S. Wang, L. Guo, H. Z. Li, J. Ding, Y. Zheng and D. G. Wei, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 2008, **328**, 52-59.
209. F. Alexis, E. Pridgen, L. K. Molnar and O. C. Farokhzad, *Molecular Pharmaceutics*, 2008, **5**, 505-515.
210. B. Wang, X. He, Z. Zhang, Y. Zhao and W. Feng, *Accounts of Chemical Research*, 2013, **46**, 761-769.
211. D. C. Drummond, O. Meyer, K. L. Hong, D. B. Kirpotin and D. Papahadjopoulos, *Pharmacological Reviews*, 1999, **51**, 691-743.
212. J. Liu, M. Yu, C. Zhou and J. Zheng, *Materials Today*, 2013, **16**, 477-486.
213. M. Longmire, P. L. Choyke and H. Kobayashi, *Nanomedicine*, 2008, **3**, 703-717.
214. S. Laurent, S. Boutry, I. Mahieu, L. Elst and R. Muller, *Current medicinal chemistry*, 2009, **16**, 4712-4727.
215. Y. C. Park, J. B. Smith, T. Pham, R. D. Whitaker, C. A. Sucato, J. A. Hamilton, E. Bartolak-Suki and J. Y. Wong, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2014, **119**, 106-114.



216. L. Sandiford, A. Phinikaridou, A. Protti, L. K. Meszaros, X. Cui, Y. Yan, G. Frodsham, P. A. Williamson, N. Gaddum, R. M. Botnar, P. J. Blower, M. A. Green and R. T. M. de Rosales, *Acs Nano*, 2013, **7**, 500-512.
217. H. Jadvar and P. M. Colletti, *European Journal of Radiology*, 2014, **83**, 84-94.
218. Nanocyclotep, <http://nancyclotep.inist.fr>, (accessed 2015).
219. A. Rahmim and H. Zaidi, *Nuclear medicine communications*, 2008, **29**, 193-207.
220. S. L. Pimlott and A. Sutherland, *Chemical Society Reviews*, 2011, **40**, 149-162.
221. R. Thomas, I.-K. Park and Y. Jeong, *International Journal of Molecular Sciences*, 2013, **14**, 15910-15930.
222. T. Koyama, M. Shimura, Y. Minemoto, S. Nohara, S. Shibata, Y. Iida, S. Iwashita, M. Hasegawa, T. Kurabayashi, H. Hamada, K. Kono, E. Honda, I. Aoki and Y. Ishizaka, *Journal of Controlled Release*, 2012, **159**, 413-418.
223. J. S. Choi, J. C. Park, H. Nah, S. Woo, J. Oh, K. M. Kim, G. J. Cheon, Y. Chang, J. Yoo and J. Cheon, *Angewandte Chemie-International Edition*, 2008, **47**, 6259-6262.
224. H.-Y. Lee, Z. Li, K. Chen, A. R. Hsu, C. Xu, J. Xie, S. Sun and X. Chen, *Journal of Nuclear Medicine*, 2008, **49**, 1371-1379.
225. R. T. M. de Rosales, R. Tavaré, R. L. Paul, M. Jauregui-Osoro, A. Protti, A. Glaria, G. Varma, I. Szanda and P. J. Blower, *Angewandte Chemie International Edition*, 2011, **50**, 5509-5513.
226. R. T. M. de Rosales, R. Tavaré, A. Glaria, G. Varma, A. Protti and P. J. Blower, *Bioconjugate Chemistry*, 2011, **22**, 455-465.
227. J. Zhu, Y. Lu, Y. Li, J. Jiang, L. Cheng, Z. Liu, L. Guo, Y. Pan and H. Gu, *Nanoscale*, 2014, **6**, 199-202.
228. A. Hagit, B. Soenke, B. Johannes and M. Shlomo, *Biomacromolecules*, 2010, **11**, 1600-1607.
229. Z. Liu, T. Lammers, J. Ehling, S. Fokong, J. Bornemann, F. Kiessling and J. Gätjens, *Biomaterials*, 2011, **32**, 6155-6163.
230. Y. Sun, Y. Zheng, H. Ran, Y. Zhou, H. Shen, Y. Chen, H. Chen, T. M. Krupka, A. Li and P. Li, *Biomaterials*, 2012, **33**, 5854-5864.
231. E. W. Price and C. Orvig, *Chemical Society Reviews*, 2014, **43**, 260-290.
232. C. A. Boswell, X. Sun, W. Niu, G. R. Weisman, E. H. Wong, A. L. Rheingold and C. J. Anderson, *Journal of Medicinal Chemistry*, 2004, **47**, 1465-1474.
233. K. Chen, X. Sun, G. Niu, Y. Ma, L.-P. Yap, X. Hui, K. Wu, D. Fan, P. Conti and X. Chen, *Mol Imaging Biol*, 2012, **14**, 96-105.
234. R. A. Dumont, F. Deininger, R. Haubner, H. R. Maecke, W. A. Weber and M. Fani, *Journal of Nuclear Medicine*, 2011, **52**, 1276-1284.
235. J. Oxboel, C. Schjoeth-Eskesen, H. H. El-Ali, J. Madsen and A. Kjaer, *International Journal of Molecular Imaging*, 2012, **2012**, 11.
236. D. E. Reichert, J. S. Lewis and C. J. Anderson, *Coordination Chemistry Reviews*, 1999, **184**, 3-66.
237. S. Roosenburg, P. Laverman, L. Joosten, M. S. Cooper, P. K. Kolenc-Peitzl, J. M. Foster, C. Hudson, J. Leyton, J. Burnet, W. J. G. Oyen, P. J. Blower, S. J. Mather, O. C. Boerman and J. K. Sosabowski, *Molecular Pharmaceutics*, 2014, **11**, 3930-3937.
238. S. H. Hausner, D. L. Kukis, M. K. J. Gagnon, C. E. Stanecki, R. Ferdani, J. F. Marshall, C. J. Anderson and J. L. Sutcliffe, *Molecular imaging*, 2009, **8**, 111-121.
239. Y.-S. Kim, C.-T. Yang, J. Wang, L. Wang, Z.-B. Li, X. Chen and S. Liu, *Journal of Medicinal Chemistry*, 2008, **51**, 2971-2984.
240. C. J. Anderson, T. J. Wadas, E. H. Wong and G. R. Weisman, *Q. J. Nucl. Med. Mol. Imag.*, 2008, **52**, 185-192.
241. C. L. Ferreira, D. T. Yapp, E. Lamsa, M. Gleave, C. Bensimon, P. Jurek and G. E. Kiefer, *Nuclear Medicine and Biology*, 2008, **35**, 875-882.
242. Z. Wu, S. Liu, I. Nair, K. Omori, S. Scott, I. Todorov, J. E. Shively, P. S. Conti, Z. Li and F. Kandeel, 2013.

243. S. Liu, D. Li, C.-W. Huang, L.-P. Yap, R. Park, H. Shan, Z. Li and P. S. Conti, *Theranostics*, 2012, **2**, 589.
244. C. V. Esteves, J. Madureira, L. M. P. Lima, P. Mateus, I. Bento and R. Delgado, *Inorg. Chem.*, 2014, **53**, 4371-4386.
245. S. C. Ghosh, K. L. Pinkston, H. Robinson, B. R. Harvey, N. Wilganowski, K. Gore, E. M. Sevick-Muraca and A. Azhdarinia, *Nuclear Medicine and Biology*, 2015, **42**, 177-183.
246. J. Oxboel, M. Brandt-Larsen, C. Schjoeth-Eskesen, R. Myschetzky, H. H. El-Ali, J. Madsen and A. Kjaer, *Nuclear Medicine and Biology*, 2014, **41**, 259-267.
247. S. Liu, *Bioconjugate Chemistry*, 2009, **20**, 2199-2213.
248. P. Désogère, Y. Rousselin, S. Poty, C. Bernhard, C. Goze, F. Boschetti and F. Denat, *European Journal of Organic Chemistry*, 2014, **2014**, 7831-7838.
249. R. Misri, D. Meier, A. C. Yung, P. Kozlowski and U. O. Häfeli, *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 2012, **8**, 1007-1016.
250. K. Hayashi, M. Nakamura, W. Sakamoto, T. Yogo, H. Miki, S. Ozaki, M. Abe, T. Matsumoto and K. Ishimura, *Theranostics*, 2013, **3**, 366.
251. J. C. Li, Y. Hu, J. Yang, P. Wei, W. J. Sun, M. W. Shen, G. X. Zhang and X. Y. Shi, *Biomaterials*, 2015, **38**, 10-21.
252. N. J. Parham, F. J. Picard, R. Peytavi, M. Gagnon, G. Seyrig, P.-A. Gagné, M. Boissinot and M. G. Bergeron, *Clinical chemistry*, 2007, **53**, 1570-1576.
253. H. L. Grossman, W. R. Myers, V. J. Vreeland, R. Bruehl, M. D. Alper, C. R. Bertozzi and J. Clarke, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2004, **101**, 129-134.
254. K. El-Boubbou, C. Gruden and X. Huang, *J. Am. Chem. Soc.*, 2007, **129**, 13392-13393.
255. A. Tsourkas, V. R. Shinde-Patil, K. A. Kelly, P. Patel, A. Wolley, J. R. Allport and R. Weissleder, *Bioconjugate Chemistry*, 2005, **16**, 576-581.
256. S. R. Ahmed, J. H. Dong, M. Yui, T. Kato, J. Lee and E. Y. Park, *J. Nanobiotechnol.*, 2013, **11**.
257. X. Zhu, J. Zhou, M. Chen, M. Shi, W. Feng and F. Li, *Biomaterials*, 2012, **33**, 4618-4627.
258. R. Tietze, S. Lyer, S. Dürr and C. Alexiou, *Nanomedicine*, 2012, **7**, 447-457.
259. S. Laurent, S. Dutz, U. O. Häfeli and M. Mahmoudi, *Advances in Colloid and Interface Science*, 2011, **166**, 8-23.
260. Q. Zhao, L. Wang, R. Cheng, L. Mao, R. D. Arnold, E. W. Howerth, Z. G. Chen and S. Platt, *Theranostics*, 2012, **2**, 113.
261. I. Tsiapa, E. K. Efthimiadou, E. Fragogeorgi, G. Loudos, A. D. Varvarigou, P. Bouziotis, G. C. Kordas, D. Mihailidis, G. C. Nikiforidis, S. Xanthopoulos, D. Psimadas, M. Paravatou-Petsotas, L. Palamaris, J. D. Hazle and G. C. Kagadis, *Journal of Colloid and Interface Science*, 2014, **433**, 163-175.
262. F. Gao, Y. Cai, J. Zhou, X. Xie, W. Ouyang, Y. Zhang, X. Wang, X. Zhang, X. Wang, L. Zhao and J. Tang, *Nano Res.*, 2010, **3**, 23-31.
263. M. Shinkai, B. Le, H. Honda, K. Yoshikawa, K. Shimizu, S. Saga, T. Wakabayashi, J. Yoshida and T. Kobayashi, *Japanese Journal of Cancer Research*, 2001, **92**, 1138-1145.
264. T. Kobayashi, *Biotechnology journal*, 2011, **6**, 1342-1347.
265. H. Mok, O. Veiseh, C. Fang, F. M. Kievit, F. Y. Wang, J. O. Park and M. Zhang, *Molecular Pharmaceutics*, 2010, **7**, 1930-1939.
266. C. Xu, B. Wang and S. Sun, *J. Am. Chem. Soc.*, 2009, **131**, 4216-4217.
267. D. E. Fullenkamp, D. G. Barrett, D. R. Miller, J. W. Kurutz and P. Messersmith, *RSC Advances*, 2014, **4**, 25127-25134.
268. T. Belin, N. Guigue-Millot, T. Caillot, D. Aymes and J. C. Niepce, *J. Solid State Chem.*, 2002, **163**, 459-465.
269. S. S. Pati and J. Philip, *J. Appl. Phys.*, 2013, **113**, 044314.
270. T. Ninjbadgar, S. Yamamoto and M. Takano, *Solid State Sciences*, 2005, **7**, 33-36.
271. S. Ayyappan, G. Panneerselvam, M. P. Antony, N. V. Rama Rao, N. Thirumurugan, A. Bharathi and J. Philip, *J. Appl. Phys.*, 2011, **109**, 084303.
272. E. Amstad, A. U. Gehring, H. Fischer, V. V. Nagaiyanallur, G. Hahner, M. Textor and E. Reimhult, *Journal of Physical Chemistry C*, 2011, **115**, 683-691.



273. N. Millot, D. Aymes, F. Bernard, J. C. Niepce, A. Traverse, F. Bourée, B. L. Cheng and P. Perriat, *The Journal of Physical Chemistry B*, 2003, **107**, 5740-5750.
274. A. M. Jubb and H. C. Allen, *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2010, **2**, 2804-2812.
275. S. J. Hurst, H. C. Fry, D. J. Gosztola and T. Rajh, *The Journal of Physical Chemistry C*, 2010, **115**, 620-630.
276. M. L. McGlashen, K. L. Davis and M. D. Morris, *AIP Conference Proceedings*, 1989, **191**, 707-712.
277. D. W. Mayo, F. A. Miller and R. W. Hannah, *Wiley Online Library*, 2004.
278. L. C. Bichara, H. E. Lanús, E. G. Ferrer, M. B. Gramajo and S. A. Brandán, *Advances in Physical Chemistry*, 2011, **2011**.
279. N. Lee, D. R. Hummer, D. A. Sverjensky, T. Rajh, R. M. Hazen, A. Steele and G. D. Cody, *Langmuir*, 2012, **28**, 17322-17330.
280. W. J. Barreto, S. Ponzoni and P. Sassi, *Spectrochimica Acta Part a-Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 1999, **55**, 65-72.
281. S. Bahri, C. M. Jonsson, C. L. Jonsson, D. Azzolini, D. A. Sverjensky and R. M. Hazen, *Environmental Science & Technology*, 2011, **45**, 3959-3966.
282. E. Herlinger, R. F. Jameson and W. Linert, *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2*, 1995, 259-263.
283. L. Lartigue, K. Oumzil, Y. Guari, J. Larionova, C. Guérin, J.-L. Montero, V. Barragan-Montero, C. Sangregorio, A. Caneschi, C. Innocenti, T. Kalaivani, P. Arosio and A. Lascialfari, *Organic Letters*, 2009, **11**, 2992-2995.
284. N. Karapinar, E. Hoffmann and H. H. Hahn, *Water Research*, 2006, **40**, 1210-1216.
285. Y. Lalatonne, C. Paris, J. M. Serfaty, P. Weinmann, M. Lecouvey and L. Motte, *Chem. Commun.*, 2008, DOI: 10.1039/b801911h, 2553-2555.
286. R. Chitrakar, S. Tezuka, A. Sonoda, K. Sakane, K. Ooi and T. Hirotsu, *Journal of Colloid and Interface Science*, 2006, **298**, 602-608.
287. J. Antelo, M. Avena, S. Fiol, R. López and F. Arce, *Journal of Colloid and Interface Science*, 2005, **285**, 476-486.
288. D. K. Wang, S. Varanasi, P. M. Fredericks, D. J. T. Hill, A. L. Symons, A. K. Whittaker and F. Rasoul, *Journal of Polymer Science Part a-Polymer Chemistry*, 2013, **51**, 5163-5176.
289. G. Socrates, *Infrared and Raman Characteristic Group Frequencies: Tables and Charts*, Wiley, 2001.
290. I. Concina, M. M. Natile, A. Braga, A. Vomiero, V. Morandi, L. Ortolani, M. Ferroni and G. Sberveglieri, *Journal of Physics: Conference Series*, 2010, **245**, 012067.
291. A. Adra, Thèse, Université Pierre et Marie Curie-Paris VI, 2014.
292. B. C. Barja, M. I. Tejedor-Tejedor and M. A. Anderson, *Langmuir*, 1999, **15**, 2316-2321.
293. Y. Arai and D. L. Sparks, *Journal of Colloid and Interface Science*, 2001, **241**, 317-326.
294. T. Muthukumaran and J. Philip, *J. Appl. Phys.*, 2014, **115**, 224304.
295. General Protein Coupling Protocol with EDC and Sulfo-NHS, *Covachem Technical Bulletin*, 2014.
296. NHS and Sulfo-NHS, *Pierce Biotechnology Thermo Scientific*, 2014.
297. J. Coates, *Encyclopedia of analytical chemistry*, 2000.
298. Y. Wang, B. Li, Y. Zhou, D. Jia and Y. Song, *Polymers for Advanced Technologies*, 2011, **22**, 1681-1684.
299. M. Weinhold, S. Soubatch, R. Temirov, M. Rohlfling, B. Jastorff, F. S. Tautz and C. Doose, *Journal of Physical Chemistry B*, 2006, **110**, 23756-23769.
300. T. Kotsokechagia, N. M. Zaki, K. Syres, P. de Leonardis, A. Thomas, F. Cellesi and N. Tirelli, *Langmuir*, 2012, **28**, 11490-11501.
301. M. Jiang and P. Hu, *Journal of Applied Polymer Science*, 2006, **101**, 1273-1282.
302. L. Li, W. Jiang, K. Luo, H. Song, F. Lan, Y. Wu and Z. Gu, *Theranostics*, 2013, **3**, 595-615.
303. G. Wang, X. Zhang, A. Skallberg, Y. Liu, Z. Hu, X. Mei and K. Uvdal, *Nanoscale*, 2014, **6**, 2953-2963.
304. R. Tian, O. Seitz, M. Li, W. Hu, Y. J. Chabal and J. Gao, *Langmuir*, 2010, **26**, 4563-4566.

305. P. I. Pontón, J. R. M. d'Almeida, B. A. Marinkovic, S. M. Savić, L. Mancic, N. A. Rey, E. Morgado Jr and F. C. Rizzo, *Applied Surface Science*, 2014, **301**, 315-322.
306. N. Poirier, S. P. Sohi, J. L. Gaunt, N. Mahieu, E. W. Randall, D. S. Powlson and R. P. Evershed, *Organic Geochemistry*, 2005, **36**, 1174-1189.
307. L. Komsta, M. Waksmundzka-Hajnos and J. Sherma, *Thin Layer Chromatography in Drug Analysis*, CRC Press, 2013.
308. A. Pasha, G. Tircsó, E. T. Benyó, E. Brücher and A. D. Sherry, *European Journal of Inorganic Chemistry*, 2007, **2007**, 4340-4349.
309. R. De Palma, S. Peeters, M. J. Van Bael, H. Van den Rul, K. Bonroy, W. Laureyn, J. Mullens, G. Borghs and G. Maes, *Chemistry of Materials*, 2007, **19**, 1821-1831.
310. C. Zhang, B. Wängler, B. Morgenstern, H. Zentgraf, M. Eisenhut, H. Untenecker, R. Krüger, R. Huss, C. Seliger, W. Semmler and F. Kiessling, *Langmuir*, 2006, **23**, 1427-1434.
311. S. Čampelj, D. Makovec and M. Drofenik, *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 2009, **321**, 1346-1350.
312. H. Lee, M. K. Yu, S. Park, S. Moon, J. J. Min, Y. Y. Jeong, H.-W. Kang and S. Jon, *J. Am. Chem. Soc.*, 2007, **129**, 12739-12745.
313. M. Tajabadi, M. E. Khosroshahi and S. Bonakdar, *Colloids and Surfaces a-Physicochemical and Engineering Aspects*, 2013, **431**, 18-26.
314. E. Karaoğlu, M. Summak, A. Baykal, H. Sözeri and M. S. Toprak, *Journal of Inorganic and Organometallic Polymers and Materials*, 2013, **23**, 409-417.
315. S. Mornet, Thèse, Université Sciences et Technologies-Bordeaux I, 2002.
316. L. White and C. Tripp, *Journal of Colloid and Interface Science*, 2000, **232**, 400-407.
317. Y. Liu, Y. Li, X.-M. Li and T. He, *Langmuir*, 2013, **29**, 15275-15282.
318. S. Mornet, J. Portier and E. Duguet, *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 2005, **293**, 127-134.
319. R. A. Bini, R. F. C. Marques, F. J. Santos, J. A. Chaker and M. Jafellicci Jr, *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 2012, **324**, 534-539.
320. R. Khodadust, G. Unsoy, S. Yalcın, G. Gunduz and U. Gunduz, *J Nanopart Res*, 2013, **15**, 1-13.
321. P. Roonasi, X. Yang and A. Holmgren, *Journal of Colloid and Interface Science*, 2010, **343**, 546-552.
322. M. Yamaura, R. L. Camilo, L. C. Sampaio, M. A. Macêdo, M. Nakamura and H. E. Toma, *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 2004, **279**, 210-217.
323. X. C. Shen, X. Z. Fang, Y. H. Zhou and H. Liang, *Chemistry Letters*, 2004, **33**, 1468-1469.
324. E. T. Vandenberg, L. Bertilsson, B. Liedberg, K. Uvdal, R. Erlandsson, H. Elwing and I. Lundström, *Journal of Colloid and Interface Science*, 1991, **147**, 103-118.
325. M. R. Turner, E. Duguet and C. Labrugere, *Surface and Interface Analysis*, 1997, **25**, 917-923.
326. S. M. Glasauer, P. Hug, P. G. Weidler and A. U. Gehring, *clays and clay minerals*, 2000, **48**, 51-56.
327. A. Schiffrin, A. Riemann, W. Auwarter, Y. Pennec, A. Weber-Bargioni, D. Cvetko, A. Cossaro, A. Morgante and J. V. Barth, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2007, **104**, 5279-5284.
328. G. Leterme, Master Recherche (M2-R) en Neurosciences, Université Claude Bernard Lyon 1 2015.
329. Inductiveload, Anatomy of Human Ear with Cochlear Frequency Mapping, [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Anatomy\\_of\\_Human\\_Ear\\_with\\_Cochlear\\_Frequency\\_Mapping.svg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Anatomy_of_Human_Ear_with_Cochlear_Frequency_Mapping.svg), (accessed 2015).
330. Fluorescein isothiocyanate (FITC) Product Information, *Sigma Aldrich*, 2015.
331. D. Zhang, K. Vangala, D. Jiang, S. Zou and T. Pechan, *Applied spectroscopy*, 2010, **64**, 1078-1085.
332. C. Wang, J. Ouyang, D.-K. Ye, J.-J. Xu, H.-Y. Chen and X.-H. Xia, *Lab on a Chip*, 2012, **12**, 2664-2671.

333. Fluorophores FITC, <http://www.fluorophores.tugraz.at/substance/252>, (accessed 2015).
334. S. K. Ghosh, M. Ali and H. Chatterjee, *Chemical Physics Letters*, 2013, **561-562**, 147-152.
335. L. Chen, J. Li, S. Wang, W. Lu, A. Wu, J. Choo and L. Chen, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2014, **193**, 857-863.
336. S. D. Gardner, C. S. K. Singamsetty, G. L. Booth, G.-R. He and C. U. Pittman Jr, *Carbon*, 1995, **33**, 587-595.
337. P. G. Rouxhet and M. J. Genet, *Surface and Interface Analysis*, 2011, **43**, 1453-1470.
338. A. K. Patlolla, C. Barnes, D. Hackett and P. B. Tchounwou, *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 2009, **6**, 643-653.
339. I. Valentin, M. Philippe, J.-C. Lhuguenot and M.-C. Chagnon, *Toxicology*, 2001, **158**, 127-139.
340. X. Batlle, M. G. Delmuro, J. Tejada, H. Pfeiffer, P. Gornert and E. Sinn, *J. Appl. Phys.*, 1993, **74**, 3333-3340.
341. D. Kechrakos and K. N. Trohidou, *Phys. Rev. B*, 1998, **58**, 12169-12177.
342. A. E. Berkowitz and K. Takano, *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 1999, **200**, 552-570.
343. J. Lim, S. P. Yeap, H. X. Che and S. C. Low, *Nanoscale Res Lett*, 2013, **8**, 1-14.
344. B. J. Frisken, *Applied Optics*, 2001, **40**, 4087-4091.
345. Dynamic light scattering common terms defined, *Malvern*, 2011.
346. Nanocomposix's Guide To Dynamic Light Scattering Measurement And Analysis, *Nanocomposix*, 2015.
347. Oysteinp, TEM Beam, <http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Simple-TEM-beam-path-fr.png?uselang=fr>, (accessed 2015).
348. CNRS, Microscopie Electronique en Transmission, [www.crhea.cnrs.fr/crhea/cours/met.pdf](http://www.crhea.cnrs.fr/crhea/cours/met.pdf), (accessed 2015).
349. Fulvio314, ATR, [http://commons.wikimedia.org/wiki/File:ATR\\_path-en.svg](http://commons.wikimedia.org/wiki/File:ATR_path-en.svg), (accessed 2015).
350. Mjones1984, Diagram of zeta potential and slipping plane, [http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Diagram\\_of\\_zeta\\_potential\\_and\\_slipping\\_plane\\_V2.svg](http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Diagram_of_zeta_potential_and_slipping_plane_V2.svg), (accessed 2015).
351. S. Honary and F. Zahir, *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 2013, **12**, 265-273.
352. R. Talero, C. Pedrajas and V. Rahhal, ed. INTECH, 2013.
353. A. Sze, D. Erickson, L. Ren and D. Li, *Journal of Colloid and Interface Science*, 2003, **261**, 402-410.

## Nanoparticules de magnétite fonctionnalisées pour l'imagerie bimodale IRM/TEP

Les nanoparticules d'oxydes de fer superparamagnétiques (SPIONs en anglais) font l'objet de recherches intenses dans le domaine biomédical, notamment comme nanomédicament et agent de contraste T<sub>2</sub> en imagerie par résonance magnétique (IRM). Au cours de cette étude, des nanoparticules de magnétite (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>) à destination de l'imagerie IRM/TEP (Tomographie par Emission de Positons) ont été développées. Dans un premier temps, des SPIONs modifiées en surface, stables et superparamagnétiques ont été synthétisées *via* un dispositif hydrothermal en continu. A leur surface ont été greffées, durant la synthèse, des molécules hydrophiles : l'acide citrique, la LDOPA, le DHCA et le PHA. La fonctionnalisation des nanoparticules a été optimisée en modifiant des paramètres de synthèse tels que la température et le lieu de mélange, occasionnant des modifications de morphologie, taille et phase. Dans un second temps, pour améliorer leur stabilité et furtivité, des polymères de type PolyEthylène Glycol (PEG) ont été greffés à leur surface, deux longueurs de chaîne ont été évaluées. Pour une application en TEP, des macrocycles, complexant le radionucléide <sup>64</sup>Cu, tels que le MANOTA, le NODAGA et le DOTA ont été couplés à ces SPIONs. Les essais de radiomarquage sont concluants. Ces nanohybrides, pleinement caractérisés (MET, XPS, IR, DLS, potentiels zêta, ATG, Raman) sont très prometteurs pour le diagnostic *via* l'imagerie bimodale IRM/TEM, notamment le composé Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-LDOPA-NODAGA ( $\varnothing_{DLS} = 85 \pm 1$  nm,  $r_2 = 197 \pm 7$  mM.s<sup>-1</sup>, 87% <sup>64</sup>Cu). Des études préliminaires de cytotoxicité et génotoxicité de SPIONs modifiés par de l'APTES ont également été réalisées *via* des biotests très sensibles et novateurs.

**Mot clés :** Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, SPIONs, hydrothermal continu, catéchols, fonctionnalisation, greffage, macrocycles, PEG, IRM, TEP

### Functionalized magnetite nanoparticles for bimodal MRI/PET imaging

SuperParamagnetic Iron Oxide Nanoparticles (SPIONs) have been widely studied in the biomedical field due to their promising application as nanodrugs and MRI (Magnetic Resonance Imaging) contrast agents (T<sub>2</sub>). In this study, magnetite (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>) nanoparticles have been developed for use as contrast agents for MRI/PET (Positron emission tomography) double imaging. First, functionalized stable superparamagnetic SPIONs have been synthesized in a continuous hydrothermal reactor. During the synthesis, hydrophilic agents (citric acid, LDOPA, DHCA and PHA) have been grafted on the surface of the nanoparticles. The functionalization of the nanoparticles has been optimized by modifying various synthesis parameters such as the temperature and the addition sequence of the organic molecules. The morphology, the size and the structure of the nanoparticles have been shown to depend on these different parameters. Then PolyEthylene Glycol (PEG) polymers have been grafted on their surface to make them stealth and biocompatible. Two different lengths have been considered. For PET imagery, macrocycles which are chelating agents of the <sup>64</sup>Cu radionuclide such as MANOTA, NODAGA and DOTA have been grafted on these SPIONs. The radiochemical purities are very conclusive. These nanohybrids have been extensively characterized (TEM, XPS, IR, DLS,  $\zeta$ -potential, TGA, Raman) and are very promising as a diagnostic tool for bimodal imaging MRI/PET in particular the Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-LDOPA-NODAGA nanoplatfrom ( $\varnothing_{DLS} = 85 \pm 1$  nm,  $r_2 = 197 \pm 7$  mM.s<sup>-1</sup>, 87% <sup>64</sup>Cu). Preliminary cytotoxicity and genotoxicity studies on SPIONs modified by APTES have also been performed *via* very sensitive and innovative biotests.

**Keywords:** Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, SPIONs, hydrothermal continuous synthesis, catechols, functionalization, grafting, macrocycles, PEG, MRI, PET