



**HAL**  
open science

# Ingénierie des nanomatériaux magnétiques : de la synthèse biomimétique aux applications nanotechnologiques.

Sendos Darwish

► **To cite this version:**

Sendos Darwish. Ingénierie des nanomatériaux magnétiques : de la synthèse biomimétique aux applications nanotechnologiques.. Chimie. Université Paris Cité, 2023. Français. NNT : 2023UNIP7199 . tel-04682544

**HAL Id: tel-04682544**

**<https://theses.hal.science/tel-04682544>**

Submitted on 30 Aug 2024

**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.

**Ecole Doctorale de Chimie Physique et Chimie Analytique de Paris-Centre  
(ED 388)**

**Laboratoire ITODYS**

---

**Ingénierie des nanomatériaux magnétiques : de la synthèse  
biomimétique aux applications nanotechnologiques.**

---

**Par Sendos Darwish**

Thèse de doctorat

Spécialité : Nanosciences, Matériaux, Surfaces

Dirigée par Nguyêt-Thanh HA-DUONG

Présentée et soutenue publiquement le 14 décembre 2023 devant un jury composé de :

Thanh Ha-Duong	MCF, HDR	Université Paris cité	Directrice de thèse
Tayssir Hamieh	Professeur	Université Libanaise	Co-directeur de thèse
Sylvie Bégin-Colin	Professeur	Université de Strasbourg	Rapportrice
Alex Fabiano Cortez Campos	Prof. associé	Université de Brésil	Rapporteur
Rachel Méallet- Renault	Professeur	Univ. Paris Saclay	Examinatrice
Olivier Sandre	Professeur	Université de Bordeaux	Examinateur
Souad Ammar	Professeur	Université Paris Cité	Membre invitée





## Remerciements

Durant mon doctorat, j'ai eu l'opportunité de travailler au laboratoire ITODYS (Interfaces, Traitements, Organisation et Dynamique des Systèmes) de l'Université Paris Cité.

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude à ma directrice de thèse, Dr. Nguyet-Thanh HA-DUONG, pour son inspiration, sa patience et son soutien constant. Elle m'a guidé depuis mon arrivée à Paris, et son accompagnement a été essentiel dans mes recherches et la rédaction de ma thèse. Elle a également joué un rôle maternel en France, veillant sur mon bien-être et mon avenir professionnel.

Je suis reconnaissante envers Souad Ammar, notre chef d'équipe dynamique, dont l'enthousiasme et la positivité m'ont constamment inspirée. Sa capacité à trouver des solutions a été un modèle d'excellence. Tayssir Hamieh mérite aussi mes remerciements pour m'avoir introduite dans cette aventure académique et m'avoir aidée à réaliser mes rêves.

Je remercie les membres du jury, Prof. Alex Fabiano Cortez Campos, Prof. Rachel Méallet-Renault, Prof. Sylvie Bégin-Colin et Prof. Olivier Sandre pour leur évaluation de mon travail. Mes remerciements spéciaux vont également à mes collègues, notamment à Prof. Isabelle Jupin et Christophe Brugidou pour leur contribution avec les virus nécessaires à mes expériences.

Je suis également reconnaissante envers Dr. Sophie Nowak pour ses conseils en mesures de XDR, Prof. Olivier Sandre et Dr. Hoang-Nam Pham pour les tests hyperthermie magnétique et photothermiques, Dr. Phillipe Decorse pour les analyses XPS et Dr. Sarra Gam-Derouich pour son accompagnement lors des sections SEM.

Je remercie mes collègues du groupe IMM pour leur ambiance de travail agréable et les discussions enrichissantes.

Je tiens avant tout à exprimer ma profonde reconnaissance à Mahsa, qui n'est pas seulement ma meilleure amie, mais également une sœur de cœur. Les aventures inoubliables que nous avons partagées restent gravées dans ma mémoire. Son soutien constant, à chaque étape, a été un pilier essentiel dans ma vie. Je suis tout aussi reconnaissante envers Larissa, qui a toujours été à mes côtés, offrant une amitié précieuse et irremplaçable. Marie Charlotte, notre 'princesse d'équipe', a

égayé nos journées de doute avec son énergie positive et ses cafés réconfortants. Un merci tout particulier à ma chère amie Racha, dont le soutien, les rires partagés et l'accompagnement constant ont été un soutien inestimable tout au long de ce voyage.

Je dois également une fière chandelle à Dr. Ha Anh Nguyen, Rayan al Chabib, Dr. Yara Al-Chami, Dr. Cora Moreira da Silva, et Mr. Gauthier Roux. Leur attention, leurs encouragements, et les longues discussions et conversations que nous avons eues ont été cruciales pour surmonter le stress et les défis inhérents à mon parcours doctoral. Leur présence a été une source constante d'inspiration et de force.

Je suis également extrêmement reconnaissante envers mes amis et collègues des 4ème et 8ème étages. Les moments joyeux que nous avons partagés ont grandement contribué à rendre mon expérience doctorale unique et mémorable. Un remerciement spécial est adressé à Dr. Miryana Hémadi, dont l'attention et le soutien ont été inestimables.

Je remercie également l'Association de spécialisation et d'orientation scientifique du Liban pour m'avoir accordé une bourse de doctorat, une aide précieuse sans laquelle mon parcours aurait été bien différent.

Enfin, je veux rendre hommage à ma famille, et tout particulièrement à ma mère exceptionnelle. Votre soutien indéfectible a été le fondement de ma réussite. Votre force et votre amour ont été les vents porteurs qui m'ont aidée à naviguer à travers les défis de ce voyage.

Pour conclure, je tiens à adresser un merci tout spécial à mon ami, mon partenaire, mon mari Abed, et bientôt le père de mes enfants. Ta présence et ton soutien inconditionnel lors de ces moments difficiles ont été le roc sur lequel notre avenir commun est construit.

**Titre :**

Ingénierie des nanomatériaux magnétiques : de la synthèse biomimétique aux applications nanotechnologiques.

**Résumé :**

La nanotechnologie, un domaine de recherche à la convergence de disciplines variées telles que la biologie, la chimie, la physique et les sciences des matériaux, a ouvert la voie à la création de matériaux hybrides innovants. S'inspirant des structures complexes et ordonnées trouvées dans la nature – sucres, lipides, acides nucléiques et protéines – la nano-biotechnologie a repoussé les frontières de la science traditionnelle. Dans ce contexte, l'utilisation des capsides virales de plantes comme échafaudages a émergé comme une approche prometteuse, en raison de leur homogénéité, taille uniforme, robustesse, coût abordable et leur capacité unique à se désassembler et à se réassembler. Cette technique a permis de modifier les nano-objets en greffant des éléments fonctionnels tant sur leur surface externe qu'interne, ouvrant ainsi de nouvelles voies dans le domaine de la nanotechnologie.

Dans cette recherche, nous avons concentré nos efforts sur l'étude des interactions entre les virus et les nanoparticules d'oxyde de fer. Notre approche s'est distinguée par l'utilisation des nanoparticules d'oxyde de fer, en particulier la maghémite, contrairement à la tendance dominante qui privilégie les nanoparticules d'or. L'objectif était de développer de nouveaux nanobiohybrides magnétiques en utilisant des réactions d'amidation pour assembler des nanoparticules d'oxyde de fer avec des capsides virales spécifiques.

Dans un premier temps, des nanoparticules magnétiques d'oxyde de fer de trois tailles différentes (5, 10 et 15 nm) ont été synthétisées via la méthode du polyol. Malgré leur formation réussie, ces nanoparticules présentaient des défis de solubilité et de stabilité dans l'eau, un obstacle majeur pour des applications biomédicales. Pour surmonter cela, nous avons fonctionnalisé ces nanoparticules avec différents agents, dont le citrate s'est avéré être le plus efficace.

L'étape suivante a impliqué le greffage de ces nanoparticules fonctionnalisées sur des capsides de virus icosaédriques, en particulier le Turnip yellow mosaic virus (TYMV) et le Rice yellow mottle virus (RYMV). Ce processus a été minutieusement caractérisé, confirmant la réussite du greffage et la préservation de la symétrie icosaédrique des capsides. Les nanobiohybrides ainsi

formés ont été étudiés pour leurs propriétés magnétiques et leur potentiel en hyperthermie magnétique et photothermique, révélant une efficacité accrue par rapport aux nanoparticules non liées.

En conclusion, cette étude a permis de mettre en lumière l'avantage des nanoparticules d'oxyde de fer citratées assemblées sur les virus, notamment le RYMV, en termes de performances en hyperthermie magnétique. Ces découvertes prometteuses ouvrent la voie à de nouvelles applications en nanomédecine, en particulier pour l'optimisation des traitements par hyperthermie magnétique.

**Mots clés :** Nanotechnologie, nanoparticules d'oxyde de fer, nanobiohybrides magnétiques, méthode du polyol, applications biomédicales, hyperthermie magnétique, hyperthermie photothermique.

**Title:**

Magnetic nanomaterials engineering: from biomimetic synthesis to nanotechnological applications.

**Abstract:**

Nanotechnology, a research field at the convergence of diverse disciplines such as biology, chemistry, physics, and materials science, has paved the way for the creation of innovative hybrid materials. Drawing inspiration from the complex and ordered structures found in nature - made up of sugars, lipids, nucleic acids, and proteins - nano-biotechnology has pushed the boundaries of traditional science. In this context, the use of plant viral capsids as scaffolds has emerged as a promising approach, due to their homogeneity, uniform size, robustness, affordability, and their unique ability to disassemble and reassemble. This technique has enabled the modification of nano-objects by grafting functional elements on both their external and internal surfaces, thus opening new paths in the field of nanotechnology.

In this research, we focused our efforts on studying the interactions between viruses and iron oxide nanoparticles. Our approach was distinguished by the use of iron oxide nanoparticles, particularly maghemite, contrary to the prevailing trend which favors gold nanoparticles. The goal was to develop new magnetic nanobiohybrids using amidation reactions to assemble iron oxide nanoparticles with specific viral capsids.

Initially, magnetic iron oxide nanoparticles of three different sizes (5, 10, and 15 nm) were synthesized using the polyol method. Despite their successful formation, these nanoparticles presented challenges in solubility and stability in water, a major obstacle for biomedical applications. To overcome this, we functionalized the nanoparticles with various agents, among which citrate proved to be the most effective.

The next step involved grafting these functionalized nanoparticles onto icosahedral viral capsids, particularly the Turnip yellow mosaic virus (TYMV) and the Rice yellow mottle virus (RYMV). This process was thoroughly characterized, confirming the successful grafting and the preservation of the icosahedral symmetry of the capsids. The formed nanobiohybrids were then studied for their magnetic properties and their potential in magnetic and photothermal hyperthermia, revealing increased efficiency compared to unbound nanoparticles.

In conclusion, this study highlighted the advantage of citrated iron oxide nanoparticles assembled on viruses, especially RYMV, in terms of performance in magnetic hyperthermia. These promising findings pave the way for new applications in nanomedicine, particularly for optimizing treatments through magnetic hyperthermia.

**Keywords:** Nanotechnology, Iron Oxide Nanoparticles, Magnetic Nanobiohybrids, Polyol Method, Biomedical Applications, Magnetic Hyperthermia, Photothermal Hyperthermia.



## Table des matières

Chapitre I.....	16
<b>1. Magnétisme.....</b>	<b>17</b>
1.1. Classification de matériaux magnétiques.....	17
1.2. Ferromagnétisme et ferrimagnétisme.....	18
1.3. Antiferromagnétisme .....	20
1.4. Superparamagnétisme .....	21
1.5. Applications biomédicales .....	24
1.5.1. Délivrance de médicaments. ....	25
1.5.2. Agents de contraste pour l'imagerie par résonance magnétique (IRM).....	27
1.5.3. Hyperthermie magnétique.....	30
<b>2. Synthèse de nanoparticules d'oxyde de fer.....</b>	<b>33</b>
2.1. Différentes méthodes de synthèses .....	33
2.1.1. Sol-gel .....	34
2.1.2. Co-précipitation .....	35
2.1.3. Microémulsion .....	36
2.1.4. Décomposition thermique .....	37
2.1.5. Hydrothermale .....	37
2.1.6. Résumé (tableau récapitulatif) .....	39
2.2. Fonctionnalisation de la surface des nanoparticules .....	40
2.2.1. Intérêt de la fonctionnalisation des nanoparticules .....	40
2.2.2. Fonctionnalisation de la surface des nanoparticules par le citrate .....	41
2.2.3. Fonctionnalisation de la surface des nanoparticules par Dopamine .....	42
2.2.4. Fonctionnalisation de la surface des nanoparticules par APPA.....	42
<b>3. Assemblages de nanoparticules magnétiques.....</b>	<b>43</b>
3.1. Stimuli externe.....	45
3.2. Echaffaudage chimique.....	47
3.3. Echafaudage biologique.....	49
<b>4. Objectives.....</b>	<b>52</b>
<b>5. Références.....</b>	<b>53</b>
Chapitre II .....	57
1. La méthode polyol .....	58
1.1. Propriété des polyols .....	59
1.2. Hydrolyse et réduction du précurseur métallique .....	61
1.3. Nucléation et croissance des nanoparticules .....	62

1.4. Contrôle de la taille des nanoparticules .....	65
1.4.1. Influence de la température.....	65
1.4.2. Influence du temps de réaction .....	66
1.4.3. Influence de la concentration de précurseurs .....	66
1.4.4. Influence de la nature du polyol.....	67
<b>2. Synthèse de nanoparticules d'oxyde de fer par la voie polyol.....</b>	<b>67</b>
2.1. Conditions expérimentales .....	67
2.2. Caractérisation des nanoparticules obtenues .....	69
2.2.1. Détermination de la phase cristalline .....	69
2.2.2. Détermination de la taille des nanoparticules synthétisées .....	74
<b>3. Fonctionnalisation des NPs et caractérisation.....</b>	<b>77</b>
3.1. Analyse de la surface des NPs après fonctionnalisation. ....	79
3.2. Taille des NPs fonctionnalisées. ....	86
3.2.1. NPs@APPA et NPs@Dopa .....	86
Stabilité.....	89
3.2.2. NPs@Citrate .....	90
3.3. Caractérisation des NPs@Citrate.....	91
3.3.1. Stabilité. ....	91
3.3.2. Structure cristalline .....	93
3.3.3. Spectroscopie Infrarouge à transformée de Fourier FT-IR : .....	95
3.3.4. Analyse thermogravimétrique (ATG) : .....	96
<b>4. Conclusions.....</b>	<b>99</b>
<b>5. Références.....</b>	<b>100</b>
Chapitre III .....	104
<b>1. Introduction.....</b>	<b>104</b>
1.1. Matériaux à base de virus.....	105
1.1.1. Capsides de virus de plantes et leur fonctionnalisation.....	105
1.1.2. Exemples pour la nanomédecine.....	107
1.1.2.1. Délivrance de molécules pour le traitement du cancer. ....	108
1.1.2.2. Théranostique.....	109
1.1.3. Nano-hybrides.....	109
1.1.3.1. À l'intérieur de la cavité.....	110
1.1.3.2. À l'extérieur de la capsid .....	111
1.2. Caractérisation de virus de plantes.....	113

1.2.2.	Rice yellow mottle virus (RYMV).....	115
1.2.2.1.	Structure.....	115
1.2.2.2.	Isolats .....	117
1.2.2.3.	Étude de la stabilité in-vitro de RYMV isolat Tz3.....	120
<b>2.</b>	<b>Assemblage des nanoparticules magnétiques sur différents échafaudages par Couplage EDC/NHS.....</b>	<b>124</b>
2.1.	TYMV.....	125
2.1.1.	Première stratégie.....	125
2.1.1.1.	NHS : présence ou absence à divers pH.....	126
2.1.1.2.	De la solution tampon à l'eau pure .....	128
2.1.1.3.	Ajustement du rapport NPs@Citrate/Virus.....	129
2.1.1.4.	Modification de la concentration d'EDC/NHS .....	130
2.1.2.	Deuxième stratégie.....	131
2.1.2.1.	Modification du rapport TYMV/ DOPA.....	131
2.1.2.2.	Modification la concentration de EDC/NHS .....	133
2.2.	RYMV.....	135
2.2.1.	Conditions de greffage identiques à celles du TYMV .....	135
2.2.2.	Ajustement de la durée d'incubation .....	136
2.2.3.	Ajustement du ratio Virus-Nanoparticule .....	137
2.2.4.	Modification du milieu réactionnel.....	138
<b>3.</b>	<b>Purification et caractérisation des nouveaux nano-bio-matériaux.....</b>	<b>140</b>
3.1.	Analyse des diamètres hydrodynamiques des nouveaux nano-bio-hybrides .....	141
3.2.	Analyse de la nature chimique des nouveaux nano-bio-hybrides .....	141
3.3.	Structure et stabilité des nouveaux nano-bio-hybrides après greffage.....	144
3.4.	Photothermie .....	145
3.4.1.	NPs@Citrate-TYMV .....	145
3.4.2.	NPs@Citrate- RYMV .....	151
<b>4.</b>	<b>Conclusion .....</b>	<b>154</b>
<b>5.</b>	<b>Références.....</b>	<b>155</b>
<b>Chapitre IV.....</b>		<b>160</b>
<b>1.</b>	<b>L'hyperthermie : Principes .....</b>	<b>161</b>
1.1.	Apoptose, thermoablation et autres effets.....	162
1.2.	Mécanismes à l'origine de la dissipation de chaleur.....	162
1.3.	Paramètres qui influencent l'hyperthermie magnétique .....	166
1.3.1.	La nature chimique des nanoparticules magnétiques et leur méthode de synthèse.....	166

1.3.2.	Effet de la taille .....	168
1.3.3.	Effet de forme .....	171
1.3.4.	Effet de l'assemblage (agrégats) .....	172
1.3.5.	Influence du champ appliqué .....	174
1.4.	Méthodes de mesure du SAR .....	177
1.4.1.	Analyse des cycles d'hystérésis .....	177
1.4.2.	Mesure calorimétrique .....	178
<b>2.</b>	<b>Résultats : Propriétés magnétiques et magnétocaloriques des nanoparticules d'oxyde de fer et de leurs assemblages autour des virus de plantes</b> .....	<b>179</b>
2.1.	Résultats des mesures de magnétométrie .....	180
2.2.	Résultats des mesures d'hyperthermie magnétique .....	192
2.2.1.	Cas des nanoparticules citratées libres .....	192
2.2.1.1.	Choix des concentrations de travail .....	192
2.2.1.2.	Choix de l'amplitude de champ magnétique alternatif appliqué.....	195
2.2.1.3.	Conclusion .....	203
2.2.2.	Cas des nanoparticules citratées assemblées sur le virus RYMV .....	203
<b>3.</b>	<b>Conclusion</b> .....	<b>214</b>
<b>4.</b>	<b>Références</b> .....	<b>215</b>
	Conclusions .....	224
	Partie Expérimentale .....	225
<b>1.</b>	<b>Produits</b> .....	<b>226</b>
1.1.	Produits chimiques .....	226
1.2.	Solutions Tampons .....	226
<b>2.</b>	<b>Préparation et caractérisation des virus de plantes</b> .....	<b>227</b>
2.1.	Extraction et préparation des virus de plantes .....	227
2.1.1.	TYMV .....	227
2.1.2.	RYMV .....	227
2.2.	Dosage des protéines .....	227
2.2.1.	Dosage spectrophotométrique par spectrophotométrie d'absorption UV-visible .....	227
2.2.2.	Dosage colorimétrique par la méthode de Bradford .....	228
<b>3.</b>	<b>Synthèse, fonctionnalisation et caractérisation des nanoparticules d'oxyde de fer</b> .....	<b>229</b>
3.1.	Synthèse des nanoparticules d'oxyde de fer de différentes tailles par voie polyol .....	229
3.1.1.	Synthèse des nanoparticules d'oxyde de fer de 5 nm .....	229
3.1.2.	Synthèse des nanoparticules d'oxyde de fer de 10 nm .....	230
3.1.3.	Synthèse des nanoparticules d'oxyde de fer de 15 nm .....	230

3.1.4.	Tableau récapitulatif .....	231
<b>3.2.</b>	<b>Stabilisation des nanoparticules synthétisés .....</b>	<b>231</b>
3.2.1	Stabilisation des nanoparticules synthétisés par citrate (NPs@citrate).....	231
3.2.2.	Stabilisation des nanoparticules synthétisés par Dopamine (NPs@Dopa) .....	232
3.2.3.	Stabilisation des nanoparticules synthétisés par acide 3-aminopropylphosphonique (NPs@APPA) .....	232
<b>4.</b>	<b>Greffage des nanoparticules synthétisés et fonctionnalisés sur la capsid de virus .....</b>	<b>233</b>
4.1.	Réaction de couplage EDC/NHS .....	233
4.1.1.	Greffage des NPs@Citrate sur TYMV .....	233
4.2.	Caractérisation par électrophorèse .....	234
4.2.1.	Electrophorèse sur gel d'agarose .....	234
4.2.2.	Coloration et décoloration du gel.....	235
4.2.3.	Séparation et purification. ....	236
<b>5.</b>	<b>Techniques de caractérisation .....</b>	<b>236</b>
5.1.	Diffraction des rayons X (DRX).....	236
5.2.	Diffusion dynamique de la lumière (DLS) .....	237
5.3.	Spectrométrie de photoélectrons X (XPS).....	239
5.4.	Microscopie électronique en transmission (MET).....	240
5.5.	Potentiel Zeta .....	242
5.6.	Analyse thermogravimétrique (ATG).....	243
5.6.	SQUID .....	243
5.7.	Magnétométrie à Échantillon Vibrant (VSM).....	245
5.8.	Hyperthermie .....	247
5.9.	Photothermie .....	248
5.10.	Spectroscopie de fluorescence X .....	250
<b>6.</b>	<b>Références .....</b>	<b>251</b>

---

# Chapitre I

---

## Introduction

Actuellement, une attention particulière est accordée aux systèmes colloïdaux incorporant des nanoparticules magnétiques en raison de leur potentiel significatif dans le domaine de la biotechnologie. Mon travail de thèse a impliqué la synthèse et la caractérisation d'assemblages de nanoparticules d'oxyde de fer pour des applications biomédicales, en particulier l'hyperthermie magnétique. Il est crucial que ces systèmes maintiennent leur stabilité dans des environnements aqueux et démontrent des propriétés magnétiques différentes des nanoparticules d'oxyde de fer nues. Le premier chapitre sert d'introduction au sujet. Ensuite, dans le deuxième chapitre, je détaillerai la synthèse de nanoparticules de maghémite, leur assemblage sur des capsides de virus de plantes et leur efficacité en photothermie (Chapitre 3), et enfin leurs propriétés magnétiques, y compris leur efficacité en hyperthermie magnétique (Chapitre 4).

Dans la première partie de ce chapitre, je discuterai des propriétés magnétiques en général et de la nécessité d'avoir des nanoparticules superparamagnétiques pour des applications biomédicales. La deuxième partie abordera diverses méthodes de synthèse couramment employées pour produire des nanoparticules magnétiques, en particulier la maghémite : les méthodes sol-gel, co-précipitation, microémulsion, décomposition thermique, et hydrothermale. La méthode du polyol, que nous avons employée, sera examinée en détail dans le chapitre 2. Enfin dans ce chapitre, je présenterai l'état de l'art sur les assemblages de nanoparticules d'oxyde de fer et les objectifs de ma thèse.

## 1. Magnétisme

### 1.1. Classification de matériaux magnétiques

Les matériaux peuvent être généralement classés selon leur réponse à un champ magnétique externe, notée  $\mathbf{H}$ . Ils présentent alors une aimantation induite, notée  $\mathbf{M}$ . Les composés paramagnétiques et diamagnétiques développent une aimantation  $\mathbf{M}$  positive et négative, respectivement, mais qui disparaît quand le champ est coupé. Les matériaux avec une aimantation totale non nulle en absence de champ magnétique sont des aimants permanents ou matériaux magnétiques, comme les composés ferromagnétiques, antiferromagnétiques et ferrimagnétiques (Figure 1.1).

La susceptibilité magnétique  $\chi$  (sans dimension) ou la susceptibilité magnétique molaire  $\chi_M$  (en  $\text{m}^3 \cdot \text{mol}^{-1}$ ) sont des grandeurs qui caractérisent la réponse d'un matériau au champ magnétique externe  $\mathbf{H}$ . Dans le cas des matériaux para- et diamagnétiques, la dépendance entre  $\mathbf{M}$  et  $\mathbf{H}$  est linéaire, avec  $\mathbf{M} = \chi \mathbf{H}$ , avec  $\chi$  indépendant de  $\mathbf{H}$  dans le cas de matériau linéaire, homogène et isotrope.

Un matériau paramagnétique peut être décrit comme un ensemble de dipôles magnétiques indépendants les uns des autres, qui prennent une orientation aléatoire en absence de champ magnétique, et qui s'alignent dans la même direction le champ magnétique externe.  $\mathbf{M}$  est alors dans le même sens que  $\mathbf{H}$ , et la susceptibilité molaire est positive avec des valeurs comprises entre  $+10^{-3}$  à  $+10^{-5} \text{ cm}^3 \cdot \text{mol}^{-1}$ . La susceptibilité dépend de la température, selon la loi de Curie :  $\chi = C/T$ ,  $C$  étant la constante de Curie. Un composé diamagnétique possède quant à lui une susceptibilité molaire négative faible (de  $-10^{-5}$  à  $-10^{-6} \text{ cm}^3 \cdot \text{mol}^{-1}$ ).

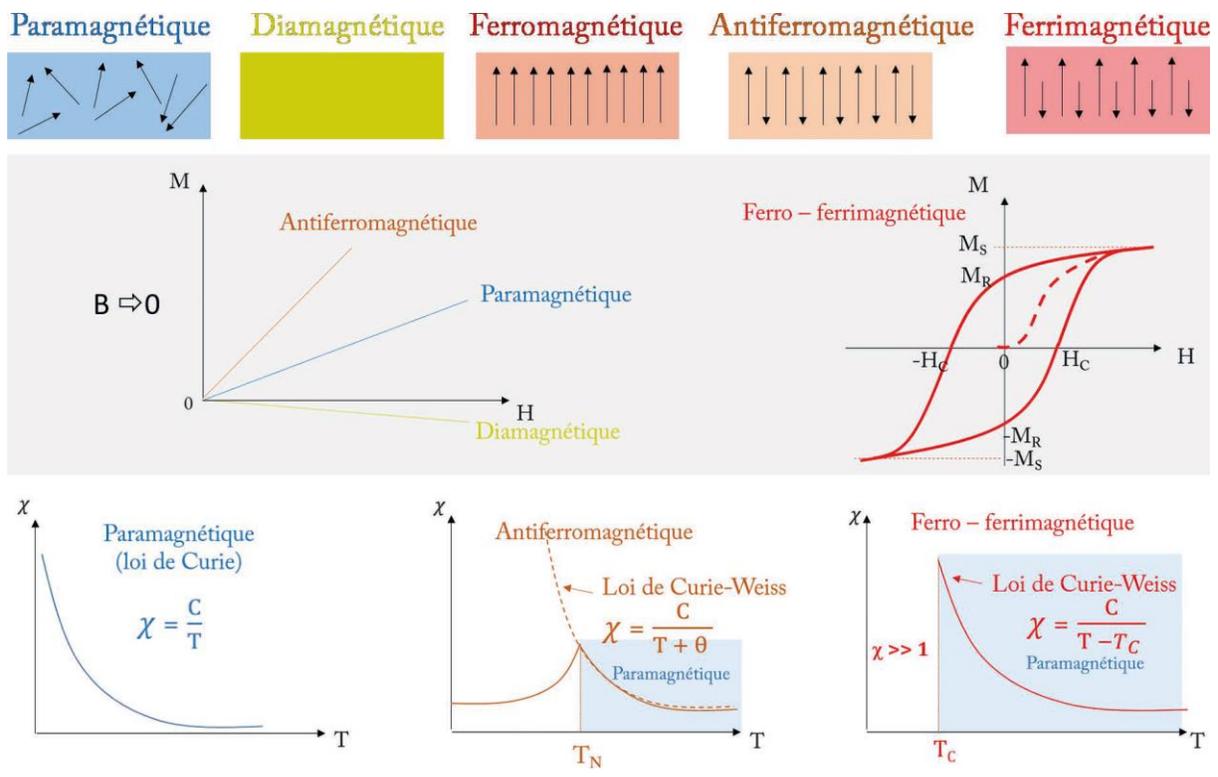


Figure 1.1: Comportements magnétiques distincts des matériaux : Classification et courbes d'aimantation et de susceptibilité

## 1.2. Ferromagnétisme et ferrimagnétisme

Le couplage par interaction d'échange des moments magnétiques entre eux permet énergétiquement d'aligner les moments magnétiques de façon parallèles entre eux. Les matériaux ferromagnétiques possèdent alors une aimantation spontanée. La susceptibilité magnétique molaire est très élevée ( $10^2$  à  $10^5 \text{ cm}^3 \cdot \text{mol}^{-1}$ ) et n'est pas linéaire en fonction de  $\mathbf{H}$ . En fonction de la température, elle suit la loi de Curie-Weiss (éq 1),  $C$  étant la constante de Curie et  $T_C$  la température de Curie. Pour  $T > T_C$ , le matériau subit une transition de phase et perd ses propriétés d'aimantation spontanée, il devient alors paramagnétique, en effet l'agitation thermique devient prépondérante devant l'interaction d'échange et désaligne les moments magnétiques.

$$\chi = \frac{C}{T-T_c} \text{ (éq 1)}$$

Pour comprendre le comportement des matériaux ferromagnétiques, on peut le diviser en domaines de Weiss dans lesquels les moments magnétiques sont tous parallèles entre eux dans une même direction (Figure 1.2, cadre vert). Les domaines étant orientés de façon aléatoire, un composé ferromagnétique n'ayant jamais été exposé à un champ externe possède une aimantation nulle. En présence d'un champ magnétique  $\mathbf{H}$  croissant, l'aimantation  $\mathbf{M}$  croît selon la courbe de première aimantation (courbe pointillée, Figure 1.2) pour atteindre une valeur maximale (aimantation à saturation  $M_S$ ). Le champ magnétique externe est suffisamment fort pour permettre l'alignement de tous les moments magnétiques dans le matériau, il n'y a alors qu'un seul domaine de Weiss (Figure 1.2, cadre bleu). En faisant décroître  $\mathbf{H}$ , l'aimantation  $\mathbf{M}$  décroît selon une courbe distincte de la première aimantation, il y a un retard à la désaimantation (courbe rouge Figure 1.2). A champ  $\mathbf{H}$  nul, le matériau possède une aimantation non nulle (aimantation rémanente  $M_R$ ), qui est liée à la conservation de l'alignement des moments magnétiques de certains domaines bloqués (Figure 1.2, cadre rose). Pour obtenir  $M = 0$ , il faut inverser le champ  $\mathbf{H}$  jusqu'à une valeur  $-H_C$  (champ magnétique coercitif). En continuant de diminuer le champ, on atteint la saturation de l'aimantation ( $-M_S$ ), puis en inversant et augmentant le champ, l'aimantation prend la valeur  $-M_R$  à champ nul. Le cycle tracé est appelé cycle d'hystérésis.

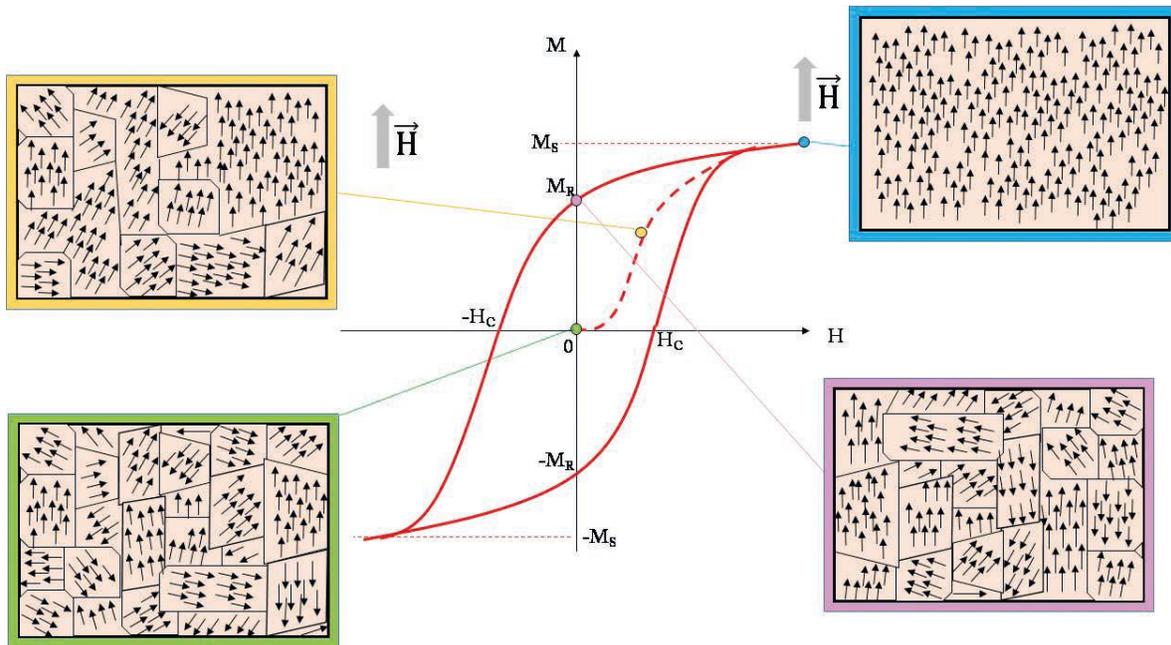


Figure 1.2: Cycle d'hystérésis d'un matériau ferromagnétique : une illustration des variations de l'aimantation en fonction du champ magnétisant, ainsi que des valeurs de  $M_r$ ,  $H_c$  et  $M_s$  du matériau.

On peut classer les matériaux ferromagnétiques en deux catégories suivant la valeur du champ coercitif. Les ferromagnétiques doux (comme la ferrite de nickel  $NiFe_2O_4$ ) ont une valeur de  $H_c$  faible (inférieure à  $1000 \text{ A.m}^{-1}$ ), les ferromagnétiques durs (comme la magnétite  $Fe_3O_4$ ) ont une valeur de  $H_c$  supérieure à  $1000 \text{ A.m}^{-1}$ .

Les composés ferrimagnétiques peuvent être considérés comme un sous-ensemble des composés ferromagnétiques. En effet, ils présentent une aimantation spontanée, même si elle est inférieure à celle des matériaux ferromagnétiques, ils possèdent des moments magnétiques antiparallèles mais ne se compensent pas deux par deux (Figure 1.1). Comme pour les matériaux ferrimagnétiques, ils présentent des phénomènes d'hystérésis et une transition de phase à la température de Curie  $T_C$  au-delà de laquelle le composé devient paramagnétique.

### 1.3. Antiferromagnétisme

Comme pour les matériaux ferromagnétiques, il existe un couplage par interaction d'échange des moments magnétiques en eux pour les composés antiferromagnétiques. Cependant les moments magnétiques sont antiparallèles entre eux, ce qui donne une aimantation totale nulle du matériau. L'alignement n'est possible qu'à une température inférieure à la température de Néel,  $T_N$  (Figure

1.3). Pour  $T > T_N$ , le matériau devient paramagnétique. La susceptibilité dépend de la température, et suit alors la loi de Curie-Weiss (éq 2) :

$$\chi = \frac{C}{T+T_N} \text{ (éq 2),}$$

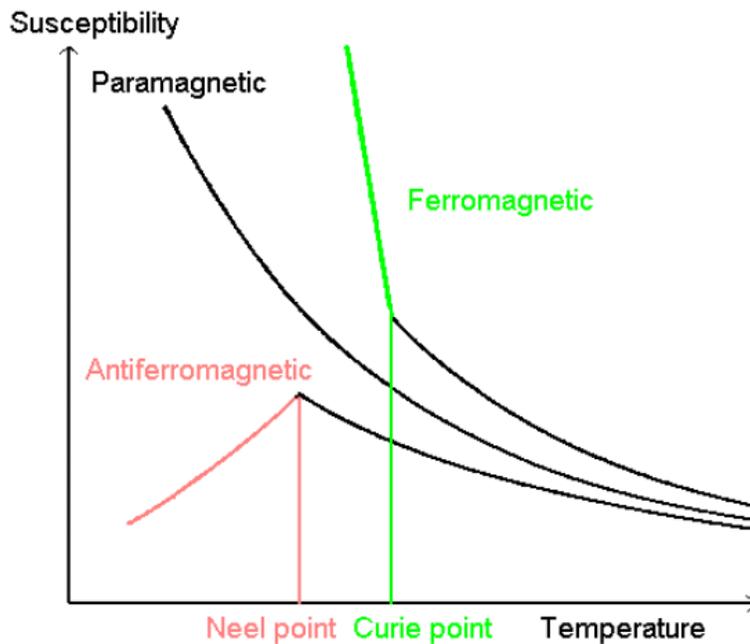


Figure 1.3: Réponse de la susceptibilité en fonction de la température pour un matériau antiferromagnétique/ferromagnétique.

#### 1.4. Superparamagnétisme

Lorsque la taille des matériaux ferro- ou ferrimagnétique décroît, le nombre de domaines de Weiss diminue jusqu'à ce que la nanoparticule soit constituée d'un seul domaine (Figure 1.1) pour une valeur critique  $D_C$ . Pour ce monodomaine, le champ coercitif décroît quand la taille diminue jusqu'à une valeur de taille de nanoparticule  $D_S$ , en dessous de laquelle la nanoparticule est superparamagnétique.

Le superparamagnétisme est caractérisé par un champ coercitif et une hystérésis nuls, avec une valeur de susceptibilité magnétique élevée en présence d'un champ magnétique externe (Figure 1.4) mais qui se désaimante en absence de champ.

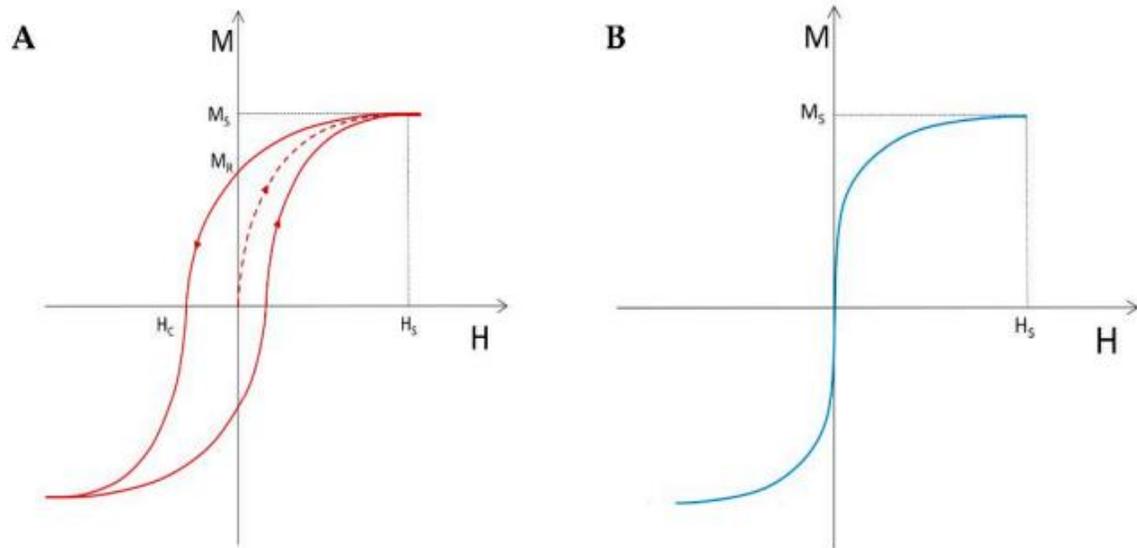


Figure 1.4: Évolution du comportement magnétique : De la courbe d'hystérésis typique d'un matériau ferromagnétique (A) à la courbe d'aimantation d'un matériau superparamagnétique (B).

Les valeurs de  $D_c$  et  $D_s$  dépendent de la nature du matériau (Figure 1.5) et  $D_s$  est de l'ordre de la dizaine/centaine de nanomètre. Parmi les matériaux superparamagnétiques les plus couramment utilisés en médecine pour l'imagerie par résonance magnétique (IRM) et en nanotechnologie pour la délivrance ciblée de médicaments on peut nommer l'oxyde de fer ( $Fe_3O_4$ ), l'oxyde de cobalt (CoO), qui est souvent utilisé dans la fabrication de supports magnétiques tels que les disques durs, les bandes magnétiques et les cartes magnétiques, l'oxyde de nickel (NiO) qui est utilisé dans la fabrication de transformateurs, d'inductances et d'autres composants électroniques et finalement les nanoparticules de ferrite, telles que les nanoparticules de cobalt, de nickel ou de manganèse, qui sont des matériaux superparamagnétiques utilisés dans de nombreux domaines, y compris la médecine, l'électronique et la catalyse.

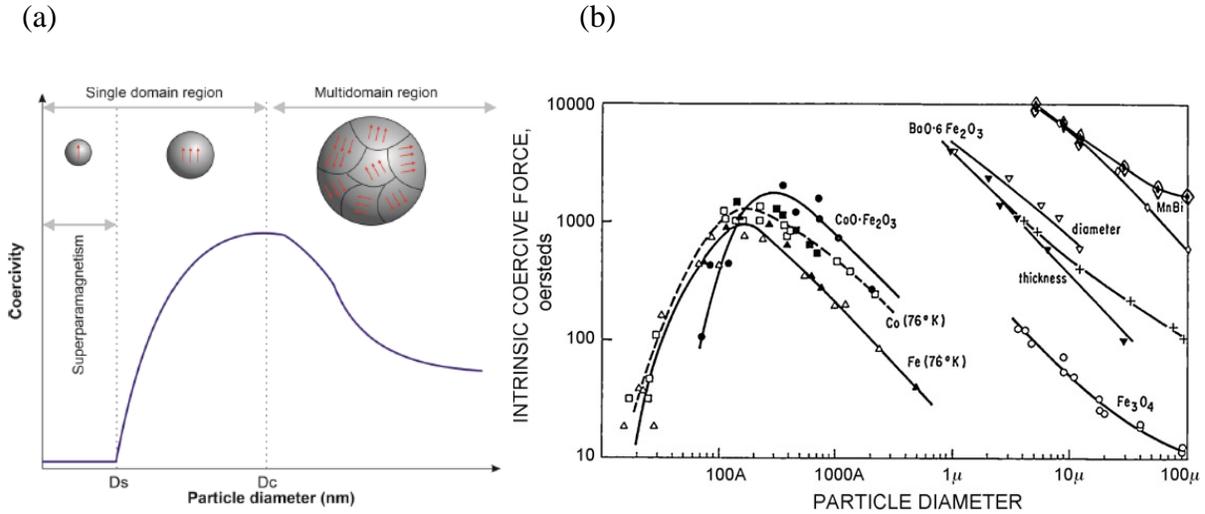


Figure 1.5: (a) Passage des nanoparticules magnétiques de la région superparamagnétique à la région multidomaine en fonction de leur diamètre. Les flèches rouges indiquent l'orientation des domaines. (b) Relation expérimentale entre la coercivité et le diamètre des particules, principalement liée à l'énergie d'anisotropie cristalline.

Dans les monodomaines, on considère l'aimantation comme étant un seul moment magnétique (somme de tous les moments magnétiques du grain), c'est l'approximation « macro-spin ». L'aimantation peut se renverser spontanément en fonction de la température. Le temps de relaxation de Néel  $\tau_N$  est défini comme étant le temps moyen entre deux renversements parallèle et antiparallèle séparés par une barrière énergétique  $KV_M$ ,  $K$  étant définie comme l'anisotropie magnétique et  $V_M$  le volume de la nanoparticule. Si la mesure de cette aimantation est supérieure à  $\tau_N$  alors, on observera une aimantation globalement nulle, il est dans un état dit superparamagnétique. A l'inverse si le temps de mesure  $\tau_m$  est inférieur au temps de relaxation, l'aimantation ne se retourne pas, il est dans un état dit bloqué ou ferromagnétique. En général, le temps de mesure est constant, seule la température varie. La température de transition entre l'état superparamagnétique et ferromagnétique est appelé température de blocage et a lieu quand  $\tau_m = \tau_N$ . Cette température se mesure grâce à des expériences appelées ZFC/FC, après refroidissement sous un champ nul (Zero field cooling), on mesure l'aimantation en augmentant la température de 3 à 300 K sous un champ magnétique faible, puis on refroidit la température toujours sous champ non nul (Field cooling). La température de blocage correspond au maximum de la courbe ZFC (Figure 1.6). Pour la magnétite la limite de taille entre mono et multidomaine est entre 80 et 128 nm [1] [2], tandis que pour la maghémite le diamètre est inférieur à 166 nm [1].

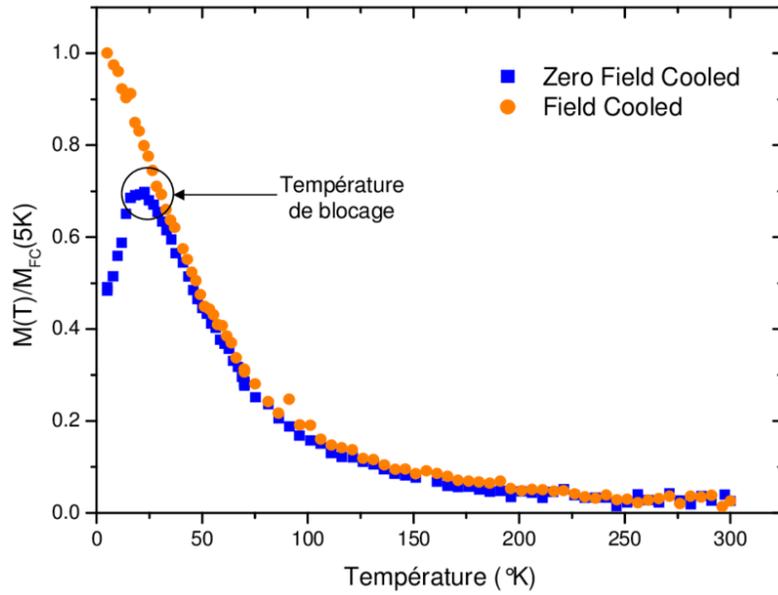


Figure 1.6: Mesure de l'aimantation lors des cycles de refroidissement (ZFC) et de refroidissement sous champ (FC) sur un ensemble de nanoparticules de CoPt. L'axe des ordonnées ( $M(T)/M_{FC}(5K)$ ) représente l'aimantation mesurée, normalisée par rapport à l'aimantation maximale mesurée lors du refroidissement sous champ à 5 °K.

## 1.5.Applications biomédicales

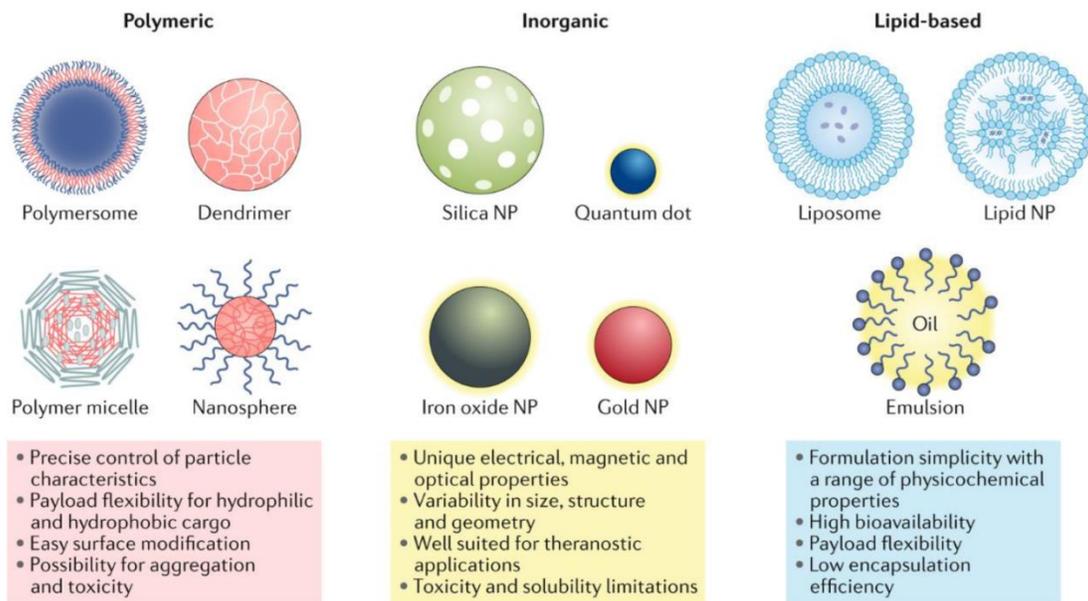


Figure 1.7 : Révélation des diverses sous-classes de nanoparticules (NPs) présentes dans différentes classes, mettant en lumière leurs avantages et inconvénients en termes de chargement, de délivrance et de réponse du patient [3]

Pour les applications biomédicales, de nombreux matériaux sont maintenant utilisés (Figure 1.7), on trouve des matériaux polymériques, lipidiques ou inorganiques comme les nanoparticules d'or, de silice, des quantum dots et d'oxyde de fer. Parmi ces nanomatériaux, les nanoparticules d'oxydes de fer (NPs) sont les plus étudiés et certains ont été approuvés par la FDA (Food and Drug Administration). Les NPs sont généralement composées de magnétite ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) ou de maghémite ( $\text{Fe}_2\text{O}_3$ ), de taille inférieure à 100 nm. Les trois principales applications sont, la délivrance de médicaments, les agents de contrastes et l'hyperthermie magnétique (Figure 1.8).

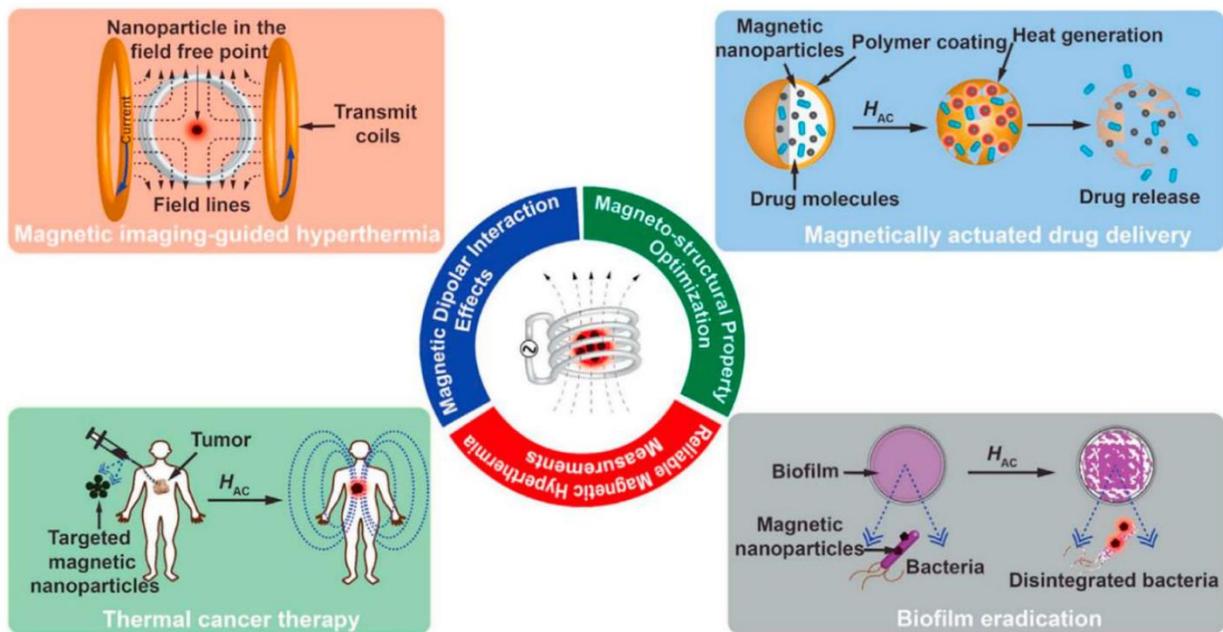


Figure 1.8 : Diagramme schématique illustrant les paramètres importants qui influencent l'efficacité du traitement par hyperthermie magnétique et les différents types d'applications biomédicales de l'hyperthermie magnétique.

### 1.5.1. Délivrance de médicaments.

La délivrance de médicaments conventionnelle utilise les voies biologiques intrinsèques du corps humain, comme la circulation sanguine, la pénétration dans les tissus ou le transport cellulaire. Cependant beaucoup de médicaments, notamment les anticancéreux ont des faibles indices thérapeutiques, c'est-à-dire qu'ils sont aussi toxiques pour les cellules saines que les cellules cancéreuses. C'est pourquoi le ciblage magnétique de médicaments a été le sujet de nombreuses études.

Les médicaments, généralement peu solubles, toxiques, non spécifiques à une cible particulière, sont chargés dans les NPs par adsorption ou sont conjugués chimiquement à celles-ci afin d'améliorer leur effet thérapeutique. De plus, certains tissus peuvent être cibler en greffant sur les NPs des molécules spécifiques (anticorps, peptide de pénétration cellulaire, aptamères ...). Après administration de ces systèmes dans la circulation, un champ magnétique peut être aussi appliqué pour cibler un tissu et améliorer la pénétration cellulaire (Figure 1.9).

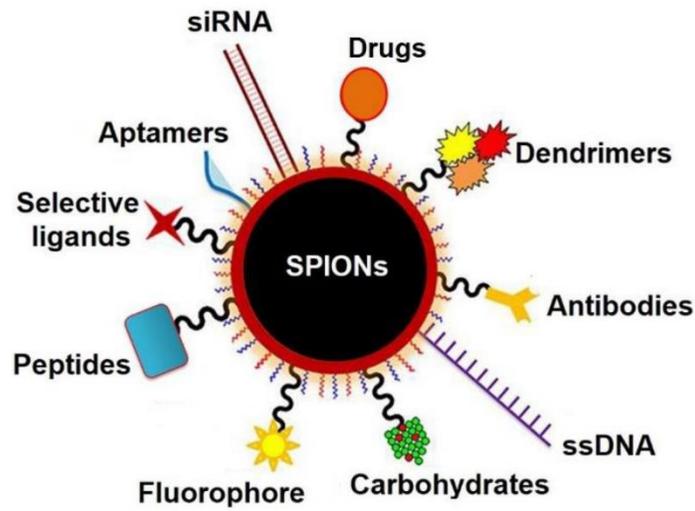


Figure 1.9: Illustration des diverses méthodes de fonctionnalisation des MNP permettant de conférer une identité théranostique.

Plusieurs études sur ces systèmes magnétiques font l'objet d'essai clinique (Tableau 1.1). Les principales molécules anticancéreuses associés aux NPs sont la Doxorubicin, Paclitaxel, Artemisinin, Gemcitabine, Bortezombin, Cisplatine, et Docetaxel.

Le ciblage magnétique a été exploré pour la délivrance de gènes [4]. La magnétofection est utilisée pour améliorer la transfection du matériel génétique [5]. Les NPs sont généralement décorées de polymères cationiques (par exemple polyéthylèneimine PEI) ou des lipides cationiques pour adsorber par interactions électrostatiques les SiRNAs ou ADN plasmides. Le champ magnétique permet d'accumuler les NPs à la surface de la cellule et ainsi améliorer la pénétration cellulaire des acides nucléiques. Après internalisation, la surface cationique déstabilise les endosomes et relargue le matériel génétique dans le cytoplasme. Pour des plasmides plus larges, l'utilisation de particules virales donne un rendement plus important pour l'expression des gènes que les NPs. Les vecteurs viraux peuvent être dérivés de virus de mammifères comme les lentivirus ou adenovirus. Ces particules virales peuvent être conjuguées

avec des NPs pour favoriser le transport du vecteur. Cette stratégie est plus efficace que les systèmes classiques de vectorisation pour des tissus qui ne peuvent être transduits, comme par exemple les tissus de l'estomac dont le milieu est acide et avec de nombreuses enzymes digestives.

Agents	Formulation	Disease	Status
Ferofluids [83]	magnetite nanocrystals coated with starch polymers carrying epirubicin (100 nm)	Various cancers	Phase I in 1996
MTC-DOX [84]	Elementary iron coated with activated carbon carrying doxorubicin (0.5-5 µm)	Hepatocellular carcinoma	Phase II/III stopped prematurely in 2005
Endorem <sup>®</sup> / Feridex I.V. <sup>®</sup> [103]	Iron oxide nanocrystals coated with dextran (80-150 nm)	Liver tumor detection	FDA approval in 1996; currently discontinued
Resovist <sup>®</sup>	Iron oxide nanocrystals coated carboxydextran (60 nm)	Liver tumor detection	EMA approval in 2001; currently discontinued
Gastromark <sup>®</sup> / Lumirem <sup>®</sup>	Iron oxide nanocrystals coated with silica (300 nm)	GI Tract Imaging	FDA approval in 1996 and EMA approval in 2001; currently discontinued
Sinerem <sup>®</sup> / Combidex [42]	Iron oxide nanocrystals coated with dextran (20-40 nm)	Detecting occult lymph node metastasis in prostate cancer	Clinical imaging available in the Netherlands
Feraheme <sup>®</sup> / Ferumoxytol	Iron oxide nanocrystals coated with polyglucose sorbitol carboxymethylethe (30 nm)	Anemia associated with chronic renal failure, iron deficiency anemia	FDA approval in 2009
NanoTherm <sup>®</sup> [37]	Iron oxide nanocrystals coated aminosilane (15 nm)	Focal thermal ablation treatment of glioblastoma multiforme Focal thermal ablation treatment of intermediate-risk prostate cancer	EMA approval in 2010 Ongoing clinical trials with the Investigational Device Exemption (IDE) approved by FDA

Tableau 1.1: Exploration des nanoparticules magnétiques à base d'oxyde de fer : Essais cliniques et applications médicales en cours [6]

### 1.5.2. Agents de contraste pour l'imagerie par résonance magnétique (IRM)

Aujourd'hui, l'imagerie médicale être largement utilisée dans l'établissement du diagnostic. Elle permet notamment un suivi très précis de l'évolution d'une maladie en offrant la possibilité d'un examen comparatif quantitatif [6]. Elle est aussi utilisée pour aider ou assister une intervention (imagerie interventionnelle) que ce soit un examen complémentaire requis pour un diagnostic, comme une biopsie, ou une intervention nécessaire pour un traitement.

En IRM, les hydrogènes, principalement ceux de l'eau présente à 70% dans le corps humain, sont excités par une impulsion radio fréquence. À la fin de l'impulsion radio fréquence, le retour de l'aimantation à sa position d'équilibre, appelé relaxation, se réalise selon deux temps caractéristiques, T1 (relaxation longitudinale) et T2 (relaxation transversale) (Figure 1.10-B). Les temps de relaxation dépendent des interactions entre l'eau et les molécules biologiques

voisines. Les agents de contraste permettent de changer le temps de relaxation dans les tissus sains ou pathogènes afin d'améliorer la sensibilité et la spécificité de l'IRM [7]. Il existe deux grandes familles d'agents de contraste : les agents de contraste positifs ou agents T1, et les agents de contraste négatifs ou T2. La relaxivité exprime le taux de relaxation ( $R1 = 1/T1$  ou  $R2 = 1/T2$ ) induite par un agent de contraste en fonction de sa concentration.

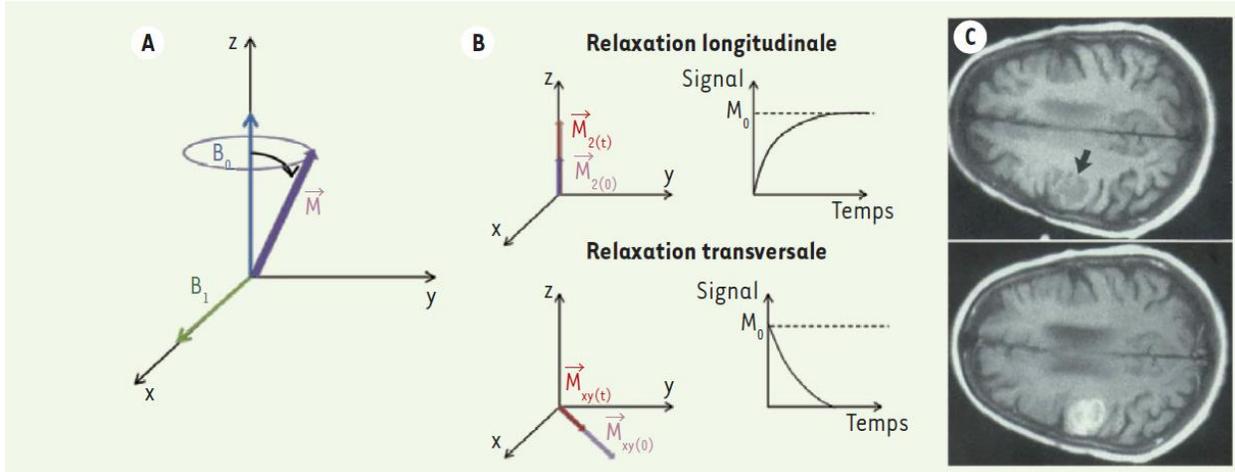


Figure 1.10: (A) Effet de l'application d'un champ magnétique  $B_1$  sur l'aimantation. (B) Relaxation de l'aimantation selon les axes  $z$  (longitudinal) et  $xy$  (transversal). (C) Images pondérées en T1 du cerveau avant (en haut) et après l'administration d'un agent de contraste (Gadoteridol 0,3 mmol Gd/kg). Une augmentation du contraste est observée dans la tumeur (indiquée par une flèche) après l'injection.

Les agents de contraste T1 raccourcissent le temps de relaxation T1, et les zones où se trouvent cet agent T1 apparaissent d'autant plus claires en IRM que sa concentration est importante. Les agents T1 commercialisés sont des complexes de Gadolinium ( $Ga^{3+}$ ) paramagnétiques (Figure 10.1-C). Bien que ces agents ont été mises sur le marché, la stabilité de ces complexes a été remise en cause et des risques de fibrose ont été recensés chez certains patients (Tableau 1.2).

Nom chimique	Nom	Nom commercial	Fabricant	Relaxivité (3T, plasma, 37° C) en L/ (mmol.s)	Excrétion	Risque de fibrose néphrogénique systémique*
Gd(DTPA-BMA)(H <sub>2</sub> O)	Gadodiamide	Omniscan®	GE	4,0	Rénale	Important
Gd(DTPA-BMEA)(H <sub>2</sub> O)	Gadoversetamide	Optimark™	Mallinckrodt	4,5	Rénale	Important
Gd(DTPA)(H <sub>2</sub> O) <sup>2-</sup>	Gadopentetate dimeglumine	Magnevist®	Bayer	3,7	Rénale	Important
Gd(BOPTA)(H <sub>2</sub> O) <sup>2-</sup>	Gadobenate dimeglumine	Multihance®	Bracco	5,5	Rénale, 4-5 % hépatobiliaire	Moyen
Gd(EOB-DTPA)(H <sub>2</sub> O) <sup>2-</sup>	Gadoxetate disodium	Primovist®/ Eovist®	Bayer	6,2	50 % Rénale, 50 % hépatobiliaire	Moyen
Gd(DTPA-diphénylcyclohexylphosphate)(H <sub>2</sub> O) <sup>3-</sup>	Gadofosveset trisodium	Ablavar®/ Vasovist®	Lantheus Medical Imaging	9,9	Rénale, 4-5 % hépatobiliaire	Moyen
Gd(DO3A-butrol)(H <sub>2</sub> O)	Gadobutrol	Gadovist®/ Gadavist®	Bayer	5,0	Rénale	Faible
Gd(HP-DO3A)(H <sub>2</sub> O)	Gadoteridol	Prohance®	Bracco	3,7	Rénale	Faible
Gd(DOTA)(H <sub>2</sub> O) <sup>-</sup>	Gadoterate meglumine	Dotarem®	Guerbet	3,5	Rénale	Faible

Tableau 1.2: Agent de contraste à base de gadolinium sur le marché.

Les nanoparticules d'oxyde de fer peuvent être des agents T1 ou T2, même si la plupart sont des agents de contraste négatif, grâce à leur très grand moment magnétique. Les NPs accélèrent la relaxation de la magnétisation transverse et les images IRM apparaissent alors plus sombres. Le taux de relaxation (R2) augmente avec le moment magnétique des NPs, ce qui peut être amélioré avec la taille de la phase cristalline ou en dopant avec d'autres métaux. La fonctionnalisation des NPs (souvent par du dextran ou du PEG), qui permet en général une meilleure stabilité colloïdale, influence la relaxation, en limitant l'accès des molécules d'eau à la NP. Donc, des NPs de taille suffisamment grande avec une fine couche organique conduit à un R2 plus élevé. La première génération des NPs commercialisés d'environ 60 nm de diamètre (Feridex I. V et Resovist) a des R2 d'environ 100 s<sup>-1</sup>.mM<sup>-1</sup> Fe, tandis que pour les générations suivantes cette valeur est augmentée de plusieurs ordre de grandeur.

La pénétration tissulaire des NPs peut se faire par effet EPR (« enhanced permeability and retention ») dans les tissus tumoraux [8], grâce à des pores de la paroi des vaisseaux tumoraux qui peuvent atteindre 100 nm (contre 10 nm dans les tissus sains). Cette pénétration peut être aussi active en greffant à la surface des NPs des ligands réagissent avec des récepteurs

surexprimés dans les tumeurs (récepteur de la transferrine, de l'acide folique, du facteur de croissance épidermique...). Bien que ces NPs soient acceptées pour un usage diagnostique ponctuel, puisque le fer est peu toxique, la plupart des entreprises qui ont développé ces agents de contraste à base d'oxyde de fer ont mis fin à leur commercialisation, par manque de succès commercial. De plus, des limitations de l'usage de ces NPs ont été mentionnées dans la littérature [9][10], notamment à cause des concentrations élevées nécessaires de ces NPs pour une détection efficace (de 0,01 à 10 mM). C'est pourquoi des études ont été menées pour concentrer les NPs dans des nano-objets, comme par exemple l'utilisation de magnéto liposomes qui encapsulent de la maghémite [11].

Il faut également noter que la zone plus sombre obtenue sur les images IRM avec un agent de contraste T2 peut interférer avec le signal d'arrière-plan, le vide dans le corps et les artefacts causés par le flux sanguin. C'est pourquoi des études ont été développées avec des NPs, de très petite taille (< 5 nm) conduisant à des agents de contraste positif [12], ce qui pourrait alors remplacer les agents de contraste à base de  $Ga^{3+}$ .

### 1.5.3. Hyperthermie magnétique

L'hyperthermie est définie comme une élévation de la température du corps et permet le traitement de tumeurs par échauffement. Ceci est dû au fait que les cellules cancéreuses sont plus sensibles à la chaleur que les cellules saines à cause d'une vitesse de leur métabolisme accrue. De plus, les cellules somatiques saines peuvent survivre à une température de 44°C pendant 1h [13][14]. L'exposition des cellules cancéreuses à des températures comprises entre 39 et 45 °C induit un choc thermique, modifiant les fonctions cellulaires, altérant la structure et fonction des protéines, dénaturant la membrane plasmique conduisant à l'apoptose de ces cellules. Une température plus élevée (45 à 50 °C) peut causer une ablation thermique ou nécrose.

Le principe de l'hyperthermie magnétique repose sur la conversion de l'énergie électromagnétique en chaleur d'un matériau magnétique exposé à un champ magnétique alternatif. Sous ce champ alternatif, l'aire du cycle d'hystérésis (A) correspond à l'énergie dissipée. L'efficacité thermique est mesurée par la mesure du SAR (Specific absorption rate) et est donc proportionnelle à l'aire du cycle d'hystérésis ( $SAR = fA$ ). Elle dépend de la susceptibilité magnétique, de l'anisotropie magnétique et de la taille des NPs et de leur

assemblage. Le SAR augmente avec la valeur H et la fréquence f du champ magnétique alternatif. Cependant, pour raisons de contraintes physiologiques (stimulation neuromusculaire, échauffement non spécifique de tout le corps), une limite de sécurité de  $H.f < 5 \times 10^9 \text{ Am}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  est imposée pour les applications cliniques. Par conséquent, le champ et la fréquence du champ alternatif utilisé est de l'ordre de grandeur de 10 kA/m et 100 kHz respectivement.

La dissipation thermique des NPs superparamagnétiques exposées à un champ magnétique alternatif est principalement due à la relaxation de Néel et de Brown. La relaxation de Néel correspond à une rotation interne du moment magnétique pour se réorienter de façon parallèle au champ appliqué, tandis de la relaxation de Brown correspond à une rotation de la NPs en entière dans le fluide pour s'aligner également dans la direction du champ appliqué (Figure 1.11- a). Le temps de relaxation magnétique effectif d'une nanoparticule est indiqué par les équations suivantes :

$$\tau_N = \tau_0 e^{\frac{KV_M}{kT}}$$

$$\tau_B = \frac{3\eta V_H}{kT}$$

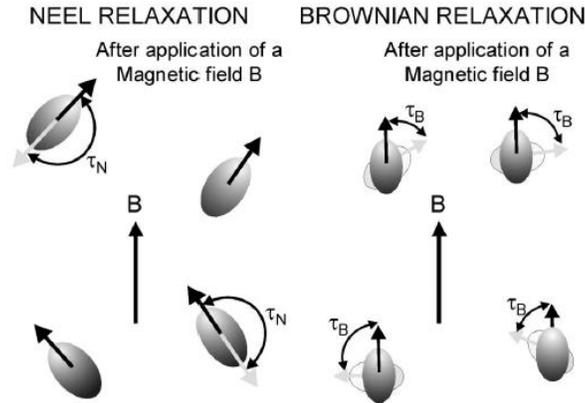
$$\tau = \frac{\tau_B \tau_N}{\tau_B + \tau_N}$$

Où  $\tau_N$  est le temps de relaxation de Néel,  $\tau_B$  celui de Brown, et  $\tau$  le temps de relaxation magnétique effectif,  $\tau_0 = 10^{-9} \text{ s}$ , K est la constante d'anisotropie magnétique,  $V_M$  le volume de la nanoparticule, k la constante de Boltzmann, T la température,  $\eta$  la viscosité et  $V_H$  le volume hydrodynamique de la nanoparticule. Il est alors clair que le temps de relaxation dépend du diamètre de la nanoparticule (1.11-b). Pour des nanoparticules petites, la relaxation de Néel est dominante tandis que pour nanoparticules plus grosses, c'est la relaxation de Brown qui domine. Or la relaxation de Brown dépend de l'environnement de la nanoparticule, notamment du tissu cellulaire, et peut donc conduire à des différences importantes dans les expériences menées in vitro et in vivo. Parce que la relaxation de Néel est indépendante du milieu, on essaiera de favoriser celle-ci. C'est pourquoi des NPs superparamagnétiques seront privilégiés pour cette application biomédicale.

Or les NPs superparamagnétiques ont une hystérésis nulle par définition. Cependant, en général, les ensembles de NPs superparamagnétiques présentent une aimantation rémanente et un champ coercitif non négligeable. Les particules autres que les NPs superparamagnétiques qui présentent

un cycle d'hystérésis sont également d'intérêt pour l'hyperthermie, comme les ferrimagnétiques ou les assemblages de NPs superparamagnétiques qui présentent un comportement ferromagnétique à cause des interactions magnétique entre monodomains.

(a)



(b)

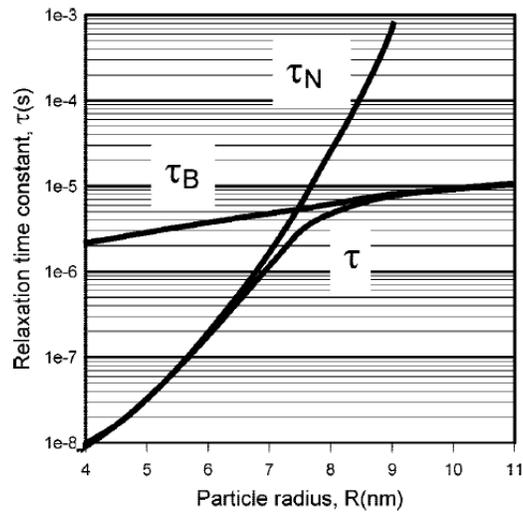


Figure 1.11: (a) Schéma représentant les deux composantes de la relaxation magnétique d'un fluide magnétique. (b) Variation des deux composantes de la relaxation magnétique en fonction du rayon des cristaux magnétiques.

C'est pourquoi, nous cherchons à synthétiser des assemblages de nanoparticules d'oxydes de fer qui présenteraient des propriétés d'hyperthermie importantes. Les deux prochains paragraphes présentent l'état de l'art sur la synthèse de nanoparticules d'oxyde de fer puis sur les assemblages de ces nanoparticules. Le chapitre 4 décrira plus particulièrement aux propriétés magnétiques de ces assemblages.

## 2. Synthèse de nanoparticules d'oxyde de fer

### 2.1. Différentes méthodes de synthèses

Pour synthétiser les nanoparticules, deux types d'approches sont utilisées (Figure 1.12), approche ascendante ou « Botton-up » et approche descendante ou « top-down » [15]. On entend par approche ascendante la synthèse des nanoparticules au moyen de réactions chimiques qui comportent trois étapes, la nucléation, la croissance et enfin l'agglomération. Le sel métallique est réduit pour donner des atomes métalliques de valence zéro qui entrent en collision en solution avec des ions, atomes ou molécules afin de former des noyaux stables irréversibles. Le diamètre de ces noyaux dépend de la force des liaisons métal-métal et de la différence entre les potentiels d'oxydoréduction du sel métallique et de l'agent réducteur utilisé. Au cours de cette étape de nucléation, aucun contrôle chimique n'est exercé. Il s'agit d'un phénomène purement cinétique. Par contre, l'étape de croissance est influencée par la présence d'agents stabilisants.

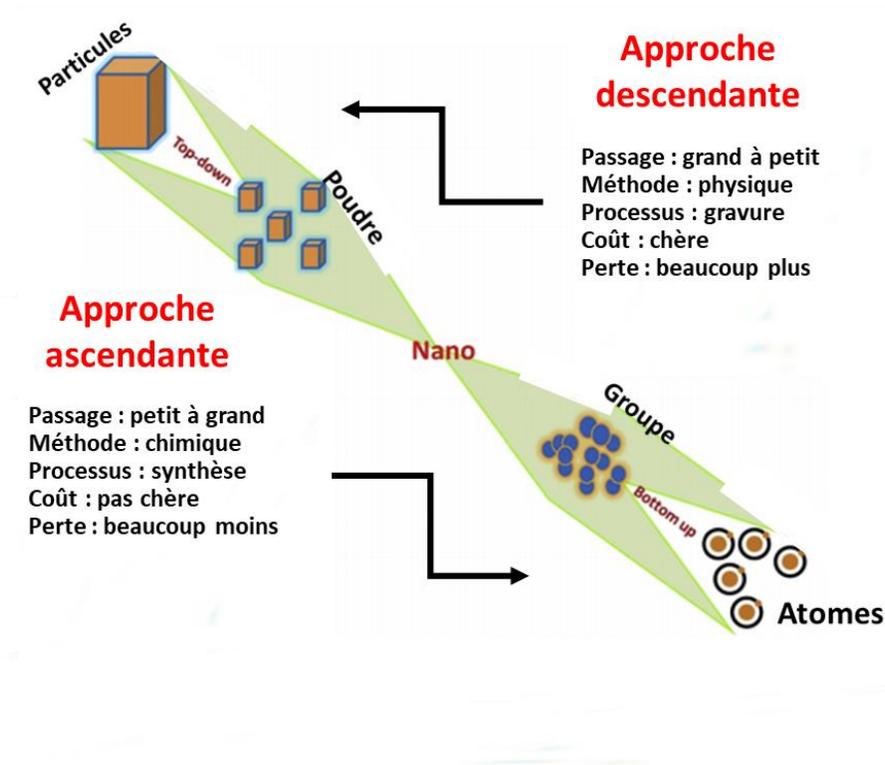


Figure 1.12: Les deux techniques de synthèse des nanoparticules : approche ascendante et approche descendante.

Par contre l'approche descendante implique la décomposition du matériau en structures ou particules nanométriques. Les approches descendantes sont intrinsèquement plus simples dans l'élaboration et dépendent soit de l'élimination ou de la division du matériau, soit de la miniaturisation des processus de fabrication pour produire la structure souhaitée avec les propriétés appropriées. Le principal inconvénient avec l'approche descendante est l'imperfection de la structure de surface qui peut contenir beaucoup d'impuretés. Elle peut être aussi coûteuse et complexe, ce qui la rend difficile pour une production à grande échelle. Elle peut aussi abîmer la structure du matériau et rendre difficile le contrôle précis de la taille et la forme des particules, ce qui est un problème pour des usages qui nécessitent des particules uniformes.

Par conséquent, la partie suivante, sera dédiée exclusivement à la description des différentes méthodes de l'approche ascendante pour la synthèse des nanoparticules :

#### 2.1.1. Sol-gel

Le sol-gel est une méthode de synthèse des nanoparticules en utilisant des conditions très douces, à basse température (de 20 à 150 °C). Elle est basée sur la réaction d'hydrolyse et de condensation de précurseurs d'alcoxyde [16] [17]. La méthode sol-gel comprend généralement plusieurs réactions : l'hydrolyse des groupements alkoxy du précurseur métallique, qui permet d'obtenir une solution colloïdale appelée « sol » d'un état liquide, la condensation du « sol », la congélation et l'évaporation pour sécher et former un gel (vieillessement et séchage). Ensuite le gel est traité à haute température (calcination) pour éliminer les groupes alkoxy et hydroxyle et améliorer la condensation (Figure 1.13). La dernière étape est le broyage du gel pour récupérer les nanoparticules [18]. L'avantage de cette méthode est la facilité de contrôler les conditions expérimentales comme le pH, la température, la vitesse d'hydrolyse et la condensation des précurseurs. Elle permet de synthétiser des nanoparticules de tailles comprises entre 5 et 200 nm, avec une pureté et homogénéité très élevées, des structures cristallines bien définies et un comportement magnétique important.

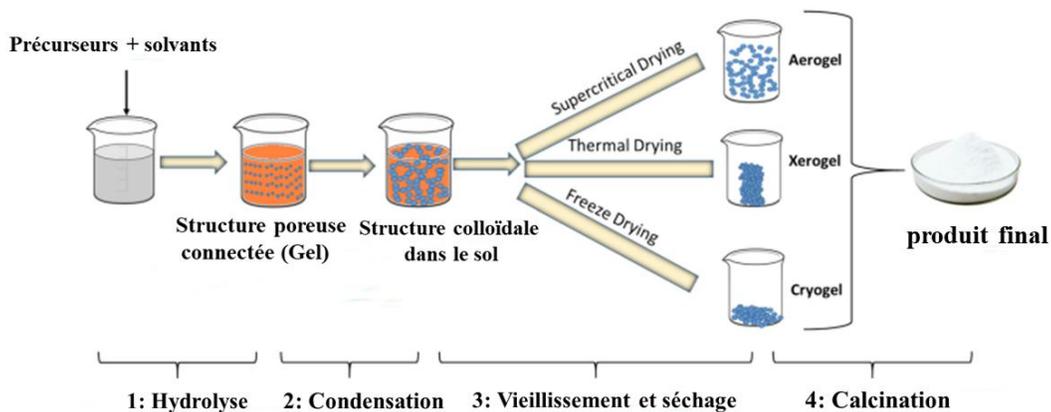


Figure 1.13: Étapes des réactions impliquées dans le processus sol-gel pour synthétiser les NPMs

### 2.1.2. Co-précipitation

Ce procédé de synthèse est basé sur la co-précipitation de sels métalliques dans un milieu basique. La précipitation des ions Fe(II) et Fe(III) est initiée par l'addition d'une base. Cette précipitation est l'indication de la formation des nanoparticules d'oxyde de fer ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) (Figure 1.14). Le mécanisme de formation des NPMs dépend des conditions de synthèse comme la nature et la concentration des précurseurs, la vitesse d'agitation, la température, le pH, la séquence d'ajout de réactif et de stabilisant [19]. Ces conditions peuvent modifier la phase d'oxyde avant ou pendant la formation des phases magnétiques souhaitées, c'est-à-dire la magnétite ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) ou la maghémite ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ) et par conséquent, la cinétique de nucléation, ainsi que les propriétés finales des NPMs synthétisés. Cependant, les synthèses par co-précipitation sont sensibles aux conditions de réaction, et sont connues pour produire des nanoparticules d'une magnétisation relativement faible et d'une polydispersité élevée.

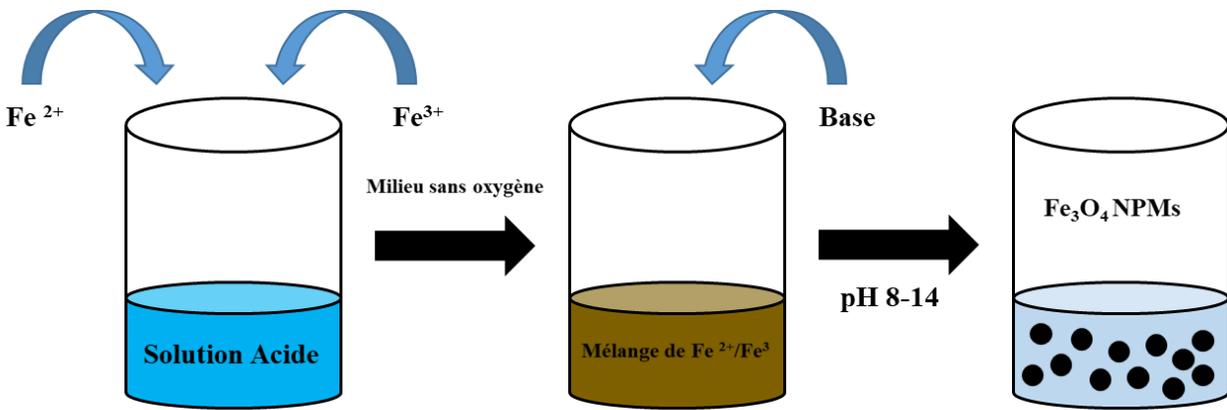


Figure 1.14: Synthèse de nanoparticules magnétiques d'oxyde de fer en utilisant la méthode de co-précipitation

### 2.1.3. Microémulsion

Le principe de cette technique est basé sur la précipitation des sels métalliques dans les microémulsions (Figure 1.15) de deux phases aqueuse-huileuse (eau dans l'huile) qui sont stabilisées par des tensioactifs [20][21]. Il existe différents tensioactifs qui peuvent être utilisés, tels que cationiques, anioniques ou non ioniques. Le choix du tensioactif dépend des caractéristiques physico-chimiques du système. La taille des micelles dépend du rapport molaire du tensioactif / eau [22]. L'addition d'un solvant organique (acétone ou éthanol) suivi d'une centrifugation, permet de récupérer les nanoparticules. L'avantage de cette technique est la synthèse de nanoparticules qui présentent une forme et une dimension contrôlables variant de 10 à 50 nm, une stabilité, un comportement superparamagnétique avec une aimantation élevée tandis que le principal inconvénient associé à cette technique est l'effet néfaste des tensioactifs résiduels sur les propriétés magnétiques des nanoparticules synthétisées.

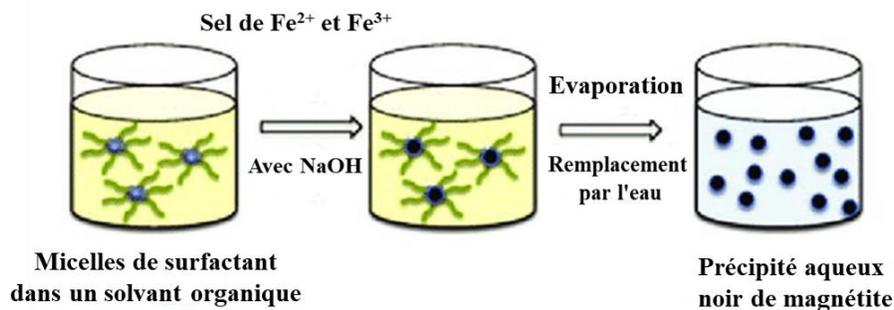


Figure 1.15: Synthèse de nanoparticules magnétiques d'oxyde de fer en utilisant la méthode de microémulsion.

#### 2.1.4. Décomposition thermique

Cette méthode de synthèse est basée sur la décomposition thermique du précurseur de type organométallique dans des solvants organiques (Figure 1.16) à haute température ( $> 200\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), en stabilisant le mélange par des agents tensioactifs tel que les acides gras [23]. Pour contrôler la taille et la morphologie des nanoparticules synthétisées, la température, le temps de réaction et les rapports entre le précurseur, l'agent tensioactif, et le solvant sont modifiées. Après la purification et le transfert de phase, des nanoparticules d'oxyde de fer monodisperses et de morphologie contrôlée, sont obtenues avec des tailles comprises entre 5 et 20 nm.



Figure 1.16: Synthèse des nanoparticules magnétiques d'oxyde de fer par décomposition thermique.

#### 2.1.5. Hydrothermale

Cette technique est basée sur la précipitation des sels métalliques dans l'eau ou dans un solvant organique porté à haute température pour obtenir des nanoparticules par des réactions chimiques en phase liquide, monophasique ou multiphasique [24]. Les réactions hydrothermales [25] sont effectuées dans un autoclave, avec des pressions de vapeur élevées et à haute température pour des durées allant de 6 à 72h (Figure 1.17). Ces réactions sont affectées par deux paramètres : plus la concentration en précurseur est élevée, plus la taille des nanoparticules est grande ; plus le temps de réaction est court plus les nanoparticules sont monodispersées. L'avantage de cette méthode est le contrôle facile des paramètres de synthèse qui affectent la croissance des nanoparticules, l'obtention des nanoparticules de taille allant de 10 à 50 nm, avec un rendement élevé mais l'inconvénient est leur manque de stabilité.

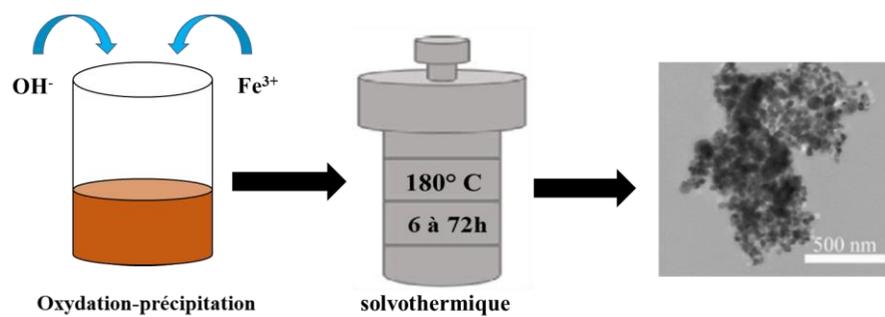


Figure 1.17: Représentation schématique de la synthèse des nanoparticules d'oxyde de fer en utilisant la technique hydrothermale

### 2.1.6. Résumé (tableau récapitulatif)

<b>Méthode de synthèse</b>	<b>Conditions expérimentales</b>	<b>Avantages</b>	<b>Inconvénients</b>	<b>Taille des NPs synthétisées</b>	<b>Aimantation (emu/g)</b>
<i>Sol-gel</i>	T. de réaction : quelques jours Température (°C): de 20 à 150 Solvant : Organique	Simple, rapide. Peu coûteuse. Contrôle précis de la taille, la structure et les conditions expérimentales.	Temps de réaction long	5-200 nm	47 à 62
<i>Co-précipitation</i>	T. de réaction : quelques minutes Température (°C): de 20 à 90 Solvant : eau	Procédures expérimentales simples. Productivité élevée.	Distribution de taille large. Agrégation des nanoparticules. Oxydation non contrôlable. Faible cristallinité.	10 -60 nm	16 à 82
<i>Microémulsion</i>	T. de réaction : quelques heures Température (°C): de 20 à 50 Solvant : Organique	Contrôle de la taille et la morphologie des particules. Homogénéité élevé.	Grandes quantités de solvant organique nécessaires. Chronophage. Faible rendement.	10-50 nm	20 à 80
<i>Décomposition thermique</i>	T. de réaction : quelques heures Température (°C): de 100 à 300 Solvant : Organique	Contrôle de la taille et de forme. Rendement élevé.	Température de réaction élevée	5-20 nm	20 à 82
<i>Hydrothermale</i>	T. de réaction : quelques heures Température (°C): de 110 à 180 Solvant : Organique	Contrôle facile de la taille et de la forme des particules.	Temps de réaction long. Pression et température élevée. Nanoparticules instables	10-50 nm	53 à 82
<i>Polyol</i>	T. de réaction : quelques heures Température (°C): de 100 à 300 Solvant : Organique	Contrôle facile de la taille et de la forme des particules. Haute cristallinité Rendement : élevée	Température élevée Temps de lavage long	2- 100 nm	50 à 69 emu/g

Tableau 1.3: Résumé des différentes techniques de synthèse des nanoparticules magnétique

## 2.2. Fonctionnalisation de la surface des nanoparticules

### 2.2.1. Intérêt de la fonctionnalisation des nanoparticules

La synthèse des nanoparticules peut être divisée en deux grandes catégories, une synthèse impliquant des conditions hydrophobes et une synthèse directe en phase aqueuse, aboutissant respectivement à des nanoparticules hydrophobes et hydrophiles. Cependant, pour utiliser ces nanoparticules pour des applications biomédicales, les nanoparticules doivent être solubles dans les milieux biologiques. De plus, dans le cas des nanoparticules magnétiques, des agrégations peuvent se produire à cause de la forte attraction magnétique ou des forces de van der Waals entre les particules. Par conséquent la solubilisation, la fonctionnalisation et la stabilisation sont les étapes clés pour utiliser ces nanoparticules dans les applications biomédicales. Les nanoparticules peuvent être stabilisées électrostatiquement ou stériquement en ajoutant des molécules chargées ou des chaînes polymériques, respectivement [26]. Cela a pour but d'empêcher l'agglomération, d'augmenter de la stabilité colloïdale pour avoir une monodispersité. Une fonctionnalisation appropriée permet de plus d'assurer la biocompatibilité avec des propriétés physicochimiques améliorées.

La méthode de revêtement est l'approche de modification de surface la plus courante pour conjuguer des matériaux à la surface des nanoparticules. Les matériaux utilisés dans la modification de surface sont classés en matériaux organiques et en matériaux inorganiques. Les molécules de matériaux organiques sont des petites molécules ou des polymères, tandis que les matériaux inorganiques comprennent la silice, le carbone, les métaux et les oxydes/sulfures métalliques. Les nanoparticules d'oxyde de fer synthétisées possèdent à leur surface des groupements hydroxydes, et présentent des atomes de fer possédant des lacunes électroniques. Ceux-ci peuvent alors être complexés par des ligands possédant des fonctions amines [27], alcool, acides carboxyliques, etc [26] (Figure 1.18), ce qui peut éviter l'oxydation ultérieure des nanoparticules d'oxyde de fer nu. Dans le cas des nanoparticules magnétiques, la fonctionnalisation augmente les interactions répulsives entre les nanoparticules et par conséquent diminue la formation d'agrégats.

La stabilité de la liaison entre les molécules fonctionnelles et les nanoparticules est décisive pour la plupart des applications biomédicales ainsi la sélection de la molécule de fonctionnalisation est très importante. Différentes approches de fonctionnalisation des nanoparticules magnétiques de maghémite avec du citrate, de la dopamine ou l'APPA (Aminopropyl phosphonic acid) sont présentées dans la partie suivante.

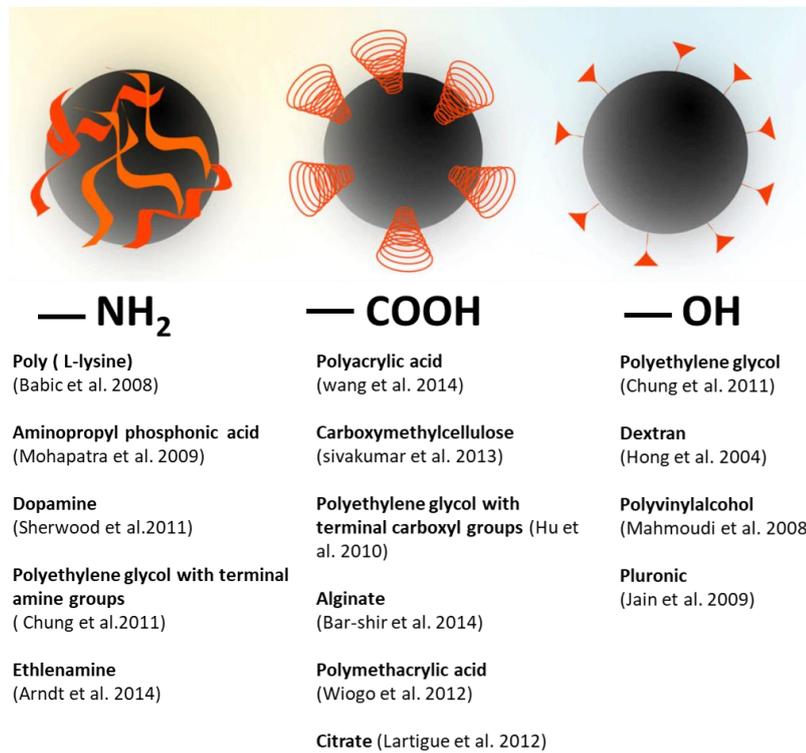


Figure 1.18: Molécules organiques et polymères en fonction des groupes fonctionnels utilisés pour la fonctionnalisation et la stabilisation des NPMs.

### 2.2.2. Fonctionnalisation de la surface des nanoparticules par le citrate

Les nanoparticules d'oxyde de fer synthétisées possèdent à leur surface des groupements hydroxydes et des atomes de fer (Figure 1.19). La fonctionnalisation est réalisée en formant des liaisons covalentes entre le fer présent à la surface des nanoparticules et l'oxygène des groupes carboxylates présents sur le citrate [28]. Les ions citrate à la surface des particules créent une couche chargée négativement. Ceci contribue à une répulsion électrostatique entre ces nanoparticules qui empêche leur agrégation, et permet leur stabilisation.

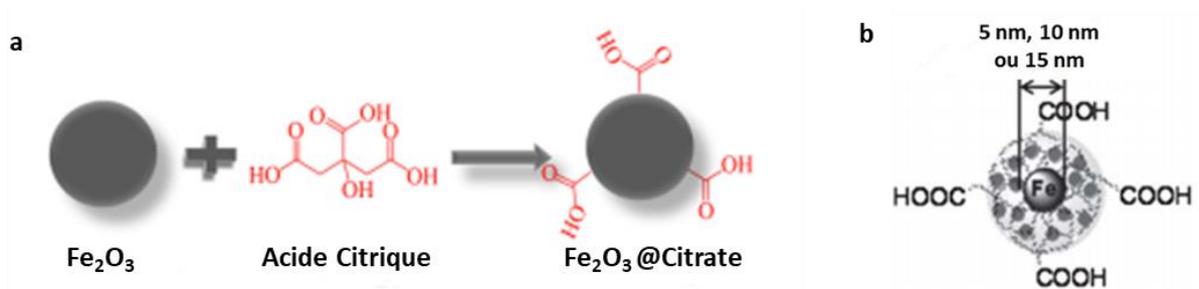


Figure 1.19: Fonctionnalisation des nanoparticules d'oxyde de fer avec l'acide citrique (a) des nanoparticules recouvertes des groupes carboxyliques (b)

### 2.2.3. Fonctionnalisation de la surface des nanoparticules par Dopamine

La dopamine est parmi les molécules biologiques la plus utilisée en tant qu'agent de fonctionnalisation [29] en raison de ses propriétés chélatrices, car elle peut former un métallocycle à cinq chaînons dans sa formule moléculaire. En effet, la dopamine forme une ancre stable et robuste à la surface de l'oxyde de fer. La fonction amine sur la surface des nanoparticules permet la conjugaison avec diverses molécules biologiques telles que les protéines, les polypeptides ou les anticorps afin d'améliorer leur biocompatibilité et de cibler spécifiquement des cellules d'intérêt (Figure 1.20).

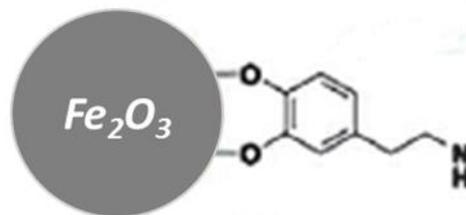


Figure 1.20: Des nanoparticules d'oxyde de fer superparamagnétiques fonctionnalisées avec Dopamine.

### 2.2.4. Fonctionnalisation de la surface des nanoparticules par APPA

La fonctionnalisation des nanoparticules d'oxyde de fer en utilisant la molécule de couplage organophosphorée comme l'acide aminopropyl phosphonique (APPA) est intéressante pour la modification de surface [30]. Les agents de couplage organophosphorés se lient sélectivement à la surface de l'oxyde de fer via le site acide phosphonique car ils présentent une excellente affinité envers les métaux et les supports contenant des métaux de transition (Figure 1.21). Après fonctionnalisation avec l'APPA, les nanoparticules présentent à leur surface des groupes fonctionnels actifs susceptibles d'être conjugués avec des molécules biologiques.

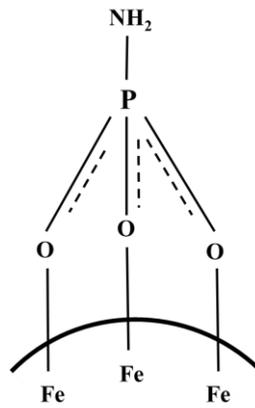


Figure 1.21: Fonctionnalisation des nanoparticules d'oxyde de fer avec APPA

### 3. Assemblages de nanoparticules magnétiques

Deux approches ont été généralement étudiées pour assembler des nanoparticules magnétiques, approche ascendante et approche descendante. L'approche descendante ou « top-down » est composée de quatre techniques principales : la lithographie, la gravure, la déposition et le dopage. Dans cette partie nous nous intéresserons uniquement sur l'assemblage ascendant ou « Bottom-up ». Cette approche se subdivise en plusieurs catégories : assemblage induit par un stimulus externe, assemblage via un échafaudage chimique ou biologique, et l'auto-assemblage.

#### Auto-assemblage

L'auto-assemblage est une stratégie clé dans la fabrication nanotechnologique, exploitant la capacité des molécules à s'organiser spontanément en structures ordonnées sans intervention externe. Dans le cadre des particules magnétiques, ce phénomène prend une importance particulière. Ces particules, souvent composées d'oxydes de fer comme la magnétite ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) ou la maghémite ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ), possèdent des propriétés magnétiques uniques qui peuvent être exploitées dans de nombreuses applications, allant de la médecine à l'électronique.

L'auto-assemblage est un processus fondamentalement basé sur des interactions non covalentes. Dans le contexte des particules magnétiques, ces interactions peuvent être dues à des forces magnétiques, des forces de van der Waals, des liaisons hydrogène ou encore des interactions électrostatiques. D'autre part, la méthode polyol offre une voie de synthèse attrayante pour l'auto-assemblage des particules magnétiques [31]. Les conditions de la réaction, telles que la température, la concentration et le choix du solvant, peuvent être ajustées pour obtenir des structures spécifiques, telles que des nanofleurs magnétiques (Figure

1.22). Les nanofleurs magnétiques, obtenues à partir de l'auto-assemblage, sont de petites structures ayant des caractéristiques uniques qui les rendent idéales pour diverses applications, notamment dans le domaine des nanotechnologies. Leurs formes spécifiques et leur organisation les rendent parfaites pour des usages où les propriétés magnétiques sont essentielles. Par exemple, dans le domaine de la thérapie contre le cancer, notamment pour la thérapie thermique. Grâce à leurs propriétés magnétiques, elles peuvent générer de la chaleur sous l'effet d'un champ magnétique externe, offrant ainsi un moyen de tuer sélectivement les cellules cancéreuses sans affecter les tissus sains environnants.

Ces nanofleurs peuvent également être utilisées comme canaux pour la délivrance dirigée de médicaments, où elles peuvent agir en tant que véhicules efficaces pour transporter et libérer de manière ciblée des médicaments au sein de l'organisme. En tant que matériaux de stockage d'information, elles peuvent contribuer à la mise au point de dispositifs de stockage d'énergie à haute capacité et efficacité, comme des batteries et des supercondensateurs, grâce à leur grande surface spécifique et leur conductivité électrique. De plus, ces structures peuvent aussi être utilisées comme blocs de construction pour développer des matériaux et des dispositifs nanotechnologiques avancés, tels que les catalyseurs dans diverses réactions chimiques. Elles augmentent la vitesse de ces réactions et rendent les processus plus efficaces et écologiques.

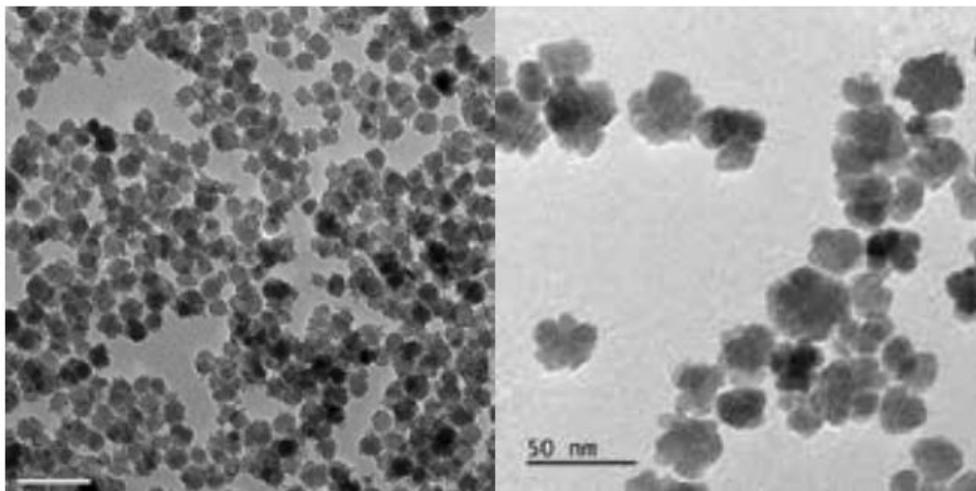


Figure 1.22: Image en microscopie électronique à transmission de nanofleurs magnétiques synthétisées par la méthode polyol, avec des diamètres moyens de 13 nm et 26 nm respectivement.

Cette capacité catalytique est d'une grande importance pour l'accélération des réactions dans de nombreux processus industriels. Finalement, dans les domaines de l'électronique et de la photonique, les nanofleurs sont utilisées pour élaborer des composants électroniques

miniaturisés, ouvrant ainsi la voie à l'avancement des technologies électroniques et photoniques [32][33].

En somme, l'auto-assemblage des particules magnétiques offre un énorme potentiel pour la fabrication de matériaux et de dispositifs à l'échelle nanométrique.

### 3.1. Stimuli externe

Les assemblages bottom-up de nanoparticules magnétiques par un stimulus externe font référence à la formation d'agrégats ou de structures organisées à partir de nanoparticules magnétiques individuelles, en utilisant un stimulus externe pour contrôler leur arrangement. Différentes méthodes existent pour réaliser cet assemblage de nanoparticules magnétiques, en utilisant des champs magnétiques (Figure 1.23) statiques ou oscillants, des gradients de champ magnétique, des champs électriques (Figure 1.24) ou des champs thermiques pour guider l'organisation des particules [34]. En fonction des conditions expérimentales et des interactions entre les particules, lorsqu'un stimulus externe est appliqué les nanoparticules magnétiques peuvent former différents types d'assemblages. Cela peut inclure des chaînes linéaires, des agrégats tridimensionnels, des structures en forme de réseau, des monocouches ou des multicouches. Par exemple, l'application d'un champ magnétique, [35][36] peut provoquer l'alignement des nanoparticules dans une direction spécifique, tandis qu'un champ magnétique non uniforme peut induire des interactions entre les particules, conduisant à la formation d'assemblages structurés. En ajustant les paramètres du champ magnétique tels que l'intensité, la fréquence ou le gradient, la concentration, la taille et la forme des particules permet de contrôler précisément l'organisation des nanoparticules magnétiques [36].

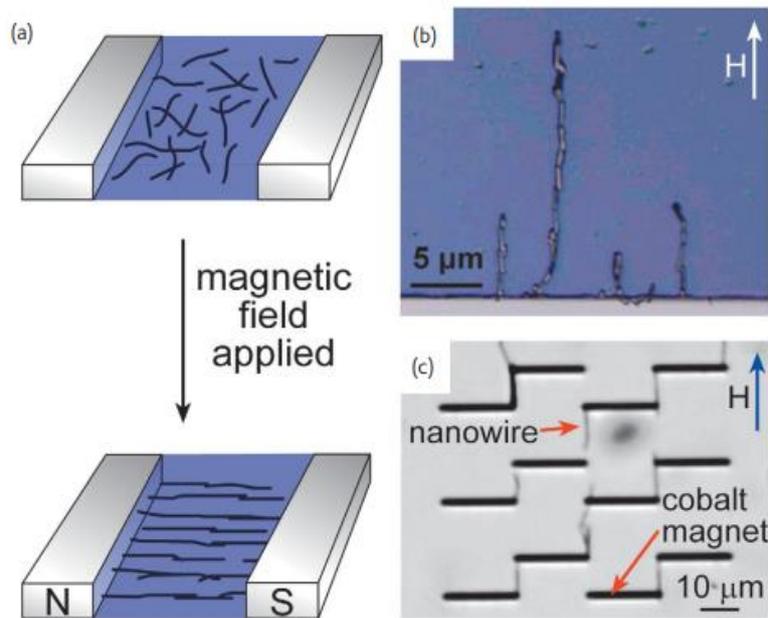


Figure 1.23: (a) Des nanofils superparamagnétiques peuvent être alignés dans un champ magnétique. (b) Les nanofils composites Ni/Au/Ni ou Ni/Bi/Ni s'alignent spontanément le long des lignes du champ magnétique, comme le montre cette image de microscopie optique. (c) Des nanofils individuels de nickel peuvent être assemblés de manière autolimitée en utilisant des tableaux de aimants modélisés, comme illustré sur cette image optique.

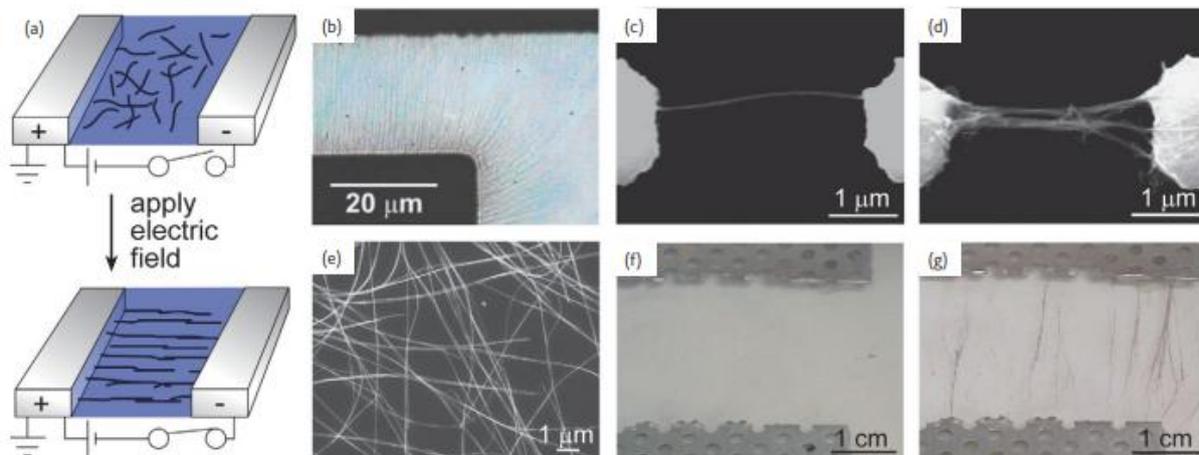


Figure 1.24: (a) La polarisation des nanofils dans un champ électrique peut diriger l'alignement de ces structures. (b) De grandes quantités de nanofils de sélénure de cadmium peuvent être assemblées, comme le montre l'image optique. (c, d) Images SEM des nanofils d'oxyde de zinc assemblés entre des électrodes. (e-g) Images SEM et optiques des nanofils souples de sélénium (e, f) avant et (g) après assemblage.

Ces assemblages peuvent être utilisés dans divers domaines, tels que la nanotechnologie, la médecine et l'électronique. Par exemple, ils peuvent servir à la fabrication de matériaux magnétiques avancés, à la détection de biomolécules ou à la manipulation de cellules pour des applications biologiques, ou encore à la création de dispositifs de stockage de données magnétiques.

### 3.2. Echaffaudage chimique

L'assemblage ascendant par échaffaudage chimique représente une technique sophistiquée dans la fabrication de nanostructures. Au cœur de cette méthode se trouve l'utilisation d'échaffaudages, qu'ils soient organiques, polymères ou autres composés chimiques, qui servent de structures guides pour façonner les nanostructures. Ces échaffaudages, qu'ils soient temporaires ou permanents, fournissent un moyen de diriger la croissance ou l'assemblage de molécules à l'échelle nanométrique.

Diverses méthodes peuvent être employées dans cette approche. Les molécules tensioactives, par exemple, peuvent s'organiser en micelles ou vésicules, fournissant un échaffaudage pour d'autres structures comme les nanoparticules ou les nanocomposites [37]. Considérons la synthèse des nanoparticules or-silice via la méthode de microémulsion inverse. Des surfactants comme le Triton X-100 et le n-hexanol sont mélangés à de l'eau et du cyclohexane, formant des gouttelettes d'eau en phase huileuse. Dans cette structure, le sel d'or  $\text{HAuCl}_4$  est réduit, formant un cœur d'or stabilisé par le mercaptoéthanesulfonate. Les luminophores sont attachés à la structure et enveloppés d'une couche de silice, dont l'épaisseur est ajustée par les précurseurs TEOS et APTES. Après l'ajout d'un catalyseur et une maturation de 24 heures, les nanoparticules sont prêtes (Figure 1.25).

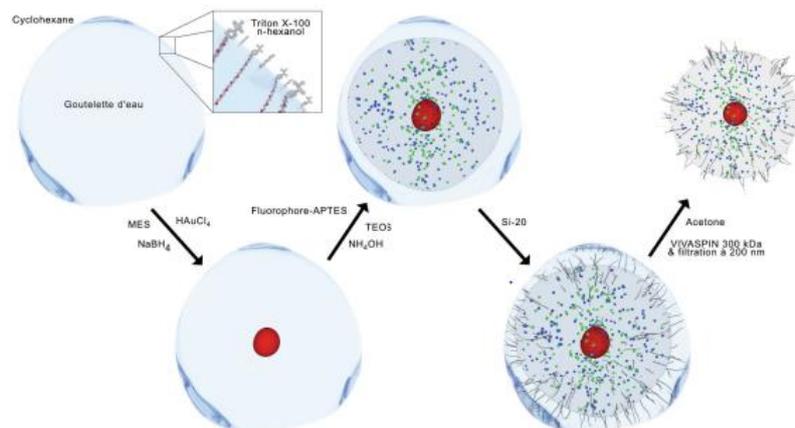


Figure 1.25: Synthèse séquentielle des nanoparticules or-silice par la microémulsion inverse.

Les polymères conducteurs, de leur côté, peuvent orienter la croissance de nanostructures conductrices [38]. De plus, diverses stratégies de chimie de surface peuvent être mises en œuvre pour fonctionnaliser les nanoparticules magnétiques avec des groupes chimiques spécifiques qui favorisent leur assemblage. Par exemple, des ligands spécifiques peuvent être attachés à la surface des nanoparticules (Figure 1.26), leur permettant de former des liaisons

chimiques avec d'autres nanoparticules portant des groupes complémentaires [37]. Des réactions de couplage chimique, telles que des réactions d'échange de ligands, peuvent être utilisées pour lier les nanoparticules entre elles [39].

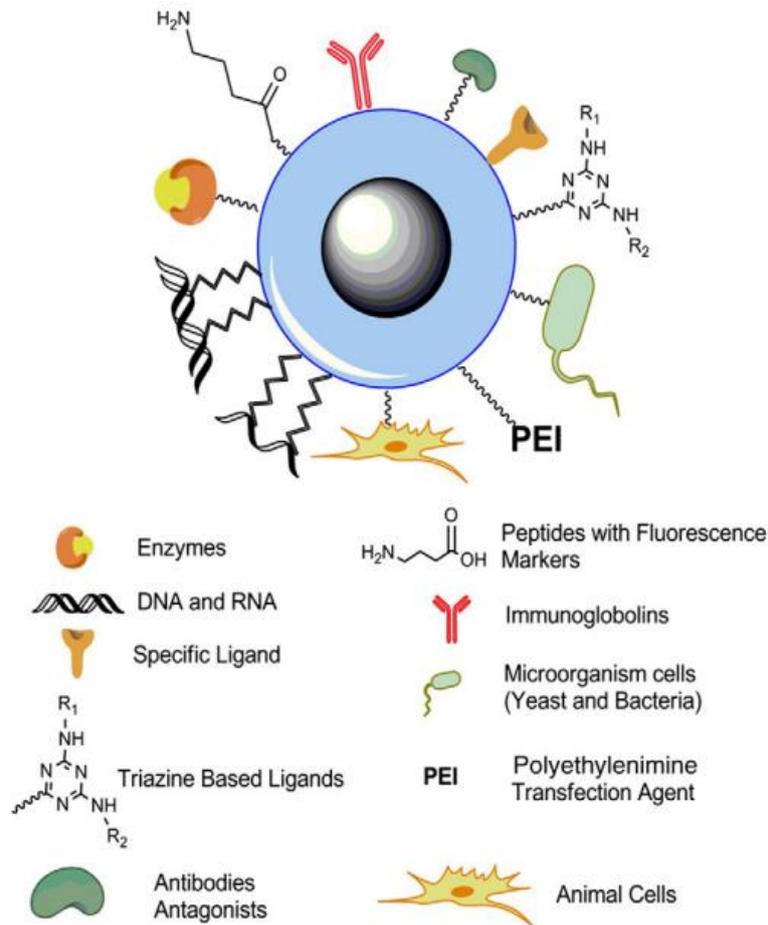


Figure 1.26: Exemples de nanoparticules magnétiques enrobées de polysaccharides et décorées avec des récepteurs multifonctionnels.

Un des avantages majeurs de cette méthode est le contrôle précis qu'elle offre sur la taille, la forme et la composition des structures magnétiques en modulant les réactions chimiques utilisées et les conditions expérimentales, telles que la concentration des nanoparticules, la température et le pH. On peut ainsi définir des conditions réactionnelles ciblées pour obtenir des assemblages aux propriétés souhaitées.

Le procédé sol-gel s'inscrit dans le contexte de l'assemblage par échafaudage chimique, orienté particulièrement vers la création d'oxydes métalliques. Il combine des précurseurs métalliques en solution, dépose ces précurseurs sur des substrats adaptés, puis effectue un traitement thermique pour aboutir au matériau final solide. Il offre une maîtrise remarquable de la composition, de la microstructure et de la nanostructure des matériaux élaborés. Les travaux de Zhao et al. [40] illustrent bien l'efficacité de cette méthode. Ils ont fabriqué des

films hiérarchiques de LDH (layered double hydroxides) par le procédé sol-gel, montrant une grande adaptabilité dans le traitement de l'eau (Figure 1.27). De plus, ils montrent une forte capacité d'adsorption pour les molécules de colorant et les ions Cr(VI) dans l'eau. De même, les films minces nanostructurés issus du sol-gel ouvrent la voie à de nouvelles applications, notamment la création de surfaces et films superhydrophobes [40].

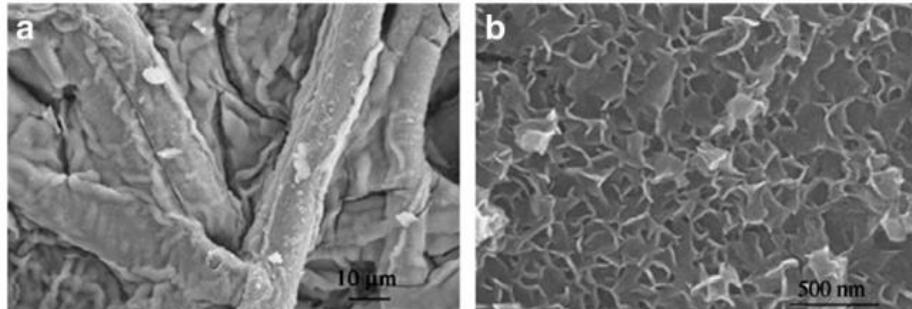


Figure 1.27: Images SEM du film NiAl-LDH/papier obtenues à (a) faible grossissement et (b) fort grossissement.

En outre, cette stratégie facilite l'ajout de propriétés chimiques aux assemblages, ouvrant la porte à des applications diversifiées, allant des matériaux magnétiques pour l'électronique à des systèmes de détection sensibles aux champs magnétiques, sans oublier les dispositifs d'imagerie médicale et la thérapie ciblée. En conclusion, l'assemblage ascendant par échafaudage chimique est une approche robuste pour créer des nanostructures complexes avec un haut degré de contrôle.

### 3.3. Echafaudage biologique

C'est une approche spécifique, où les nanoparticules inorganiques magnétiques, fluorescentes, plasmoniques ou électroconductrices sont assemblées en utilisant des composants biologiques tels que des protéines, des peptides, ou des acides nucléiques. Cette approche exploite les propriétés d'auto-assemblage et de reconnaissance moléculaire présentes dans les systèmes biologiques pour créer des structures magnétiques complexes à l'échelle nanométrique. Dans ce cas les composants biologiques lient les nanoparticules entre elles et forment des structures ordonnées. Par exemple, des peptides ou des acides nucléiques peuvent être utilisés pour capter et lier spécifiquement les nanoparticules, formant ainsi des arrangements précis ou des composites hybrides aux propriétés uniques [41] [42]. Ces assemblages sont principalement dirigés par des interactions non covalentes.

Les assemblages bottom-up par échafaudage biologique peuvent effectivement utiliser des virus végétaux [43]. Ces virus ont une structure bien définie et peuvent être génétiquement modifiés pour exprimer des protéines d'intérêt à leur surface (Figure 1.28). Grâce à des

techniques avancées de biologie moléculaire, il est possible de fonctionnaliser des nanoparticules avec des peptides ou des protéines qui ciblent spécifiquement les protéines virales exposées à la surface du virus [44]. Elles se lient spécifiquement aux sites d'interaction sur la surface du virus, entraînant ainsi leur auto-assemblage en structures ordonnées. À titre d'exemple, le virus de la mosaïque du niébé (CPMV) [44], présente des propriétés uniques rendant possible l'assemblage des nanoparticules, comme le montre également la Figure 1.28.

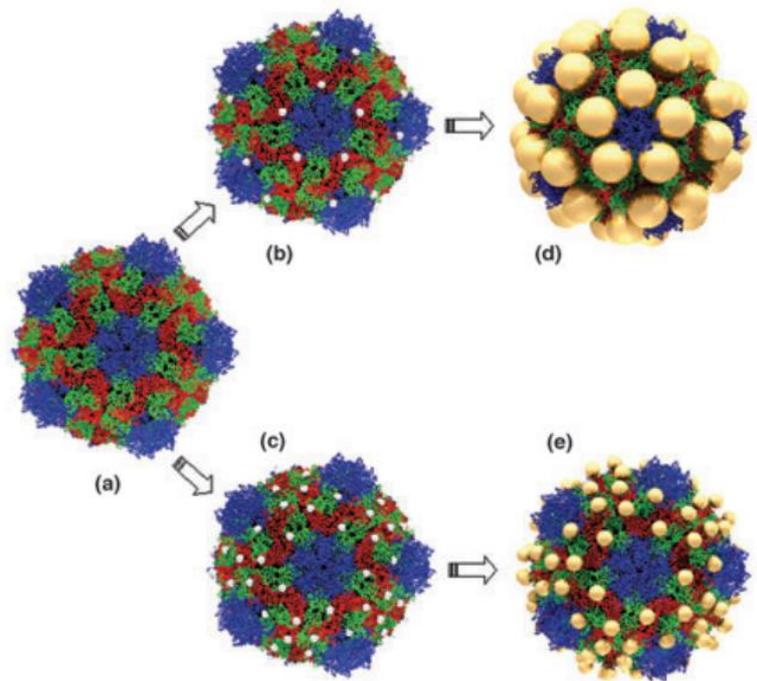


Figure 1.28: a) Structure de la capsid de CPMV à partir de données cristallographiques ; b) modification de la surface avec une cystéine (points blancs) par sous-unité ; c) modification de la surface avec deux cystéines par sous-unité ; d) greffage des nanoparticules d'or de 5 nm liées aux cystéines insérées ; e) greffage avec des nanoparticules d'or de 2 nm liées aux cystéines insérées.

Un autre exemple notable est le virus de la mosaïque du tabac (TMV), illustré dans la Figure 1.29. Cette figure dépeint comment les nanostructures du TMV entourent les nanoparticules d'or, formant des structures étoilées avec les nanoparticules comme cœur central et de nombreux bras de nanotubes. L'interaction entre l'ADN oligomère des nanoparticules d'or et l'ARN du TMV assure une liaison séquence-spécifique, garantissant à la fois une densité contrôlée de nanotubes et une haute spécificité de liaison [45].

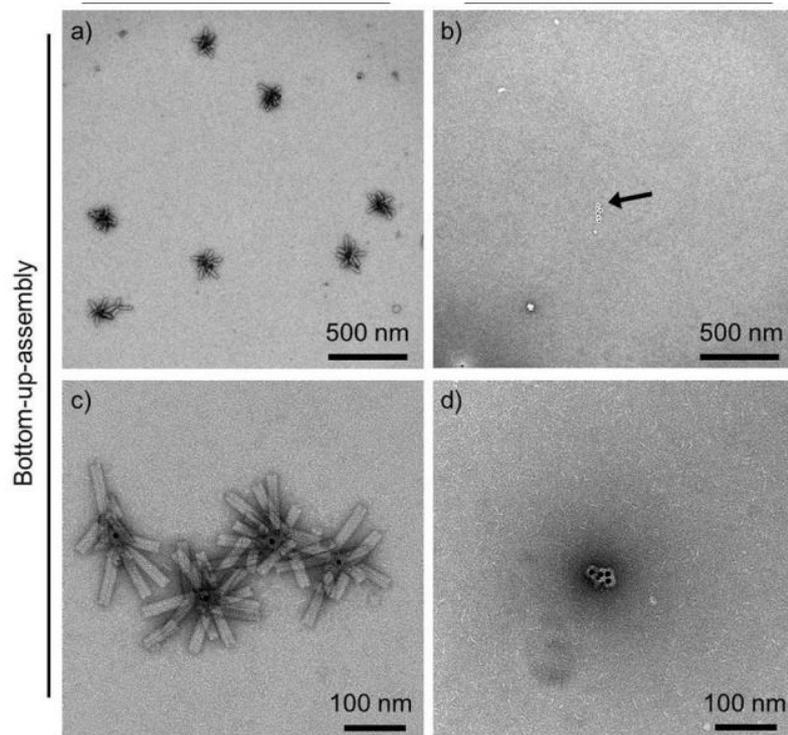


Figure 1.29 : Création de nanoétoiles suite à l'hybridation d'ARNs synthétiques issus du TMV avec des oligonucléotides attachés à des nanoparticules d'or, et assemblage ultérieur dirigé par l'ARN du CP viral (a, c).

Les assemblages par échafaudage biologique, utilisant notamment des virus végétaux, combinent des nanoparticules inorganiques et des composants biologiques pour une reconnaissance moléculaire spécifique. Cette synergie permet une conception flexible de structures tridimensionnelles et l'intégration de fonctionnalités diverses. Les avantages majeurs sont la sélectivité accrue, la capacité à créer des configurations élaborées, et le potentiel d'innovations hybrides entre les domaines biologique et inorganique.

## 4. Objectives

L'étude des virus et de leurs interactions avec des nanoparticules est un domaine en plein essor dans la littérature scientifique. Notamment, l'utilisation des nanoparticules d'or en association avec des virus a dominé une grande partie des recherches récentes. Cependant, souhaitant apporter une contribution innovante et distincte à ce champ d'étude, j'ai opté pour une orientation différente : l'exploration des nanoparticules d'oxyde de fer. Dans cette perspective, j'ai défini mes objectifs de recherche, avec une attention particulière portée à l'assemblage des nanoparticules d'oxydes de fer avec deux capsides virales icosaédriques spécifiques : le Virus de la mosaïque jaune du navet (TYMV) et le Virus de la panachure jaune du riz (RYMV). Mon ambition est de développer de nouveaux nanobiohybrides magnétiques grâce à des réactions d'amidation.

Pour réaliser cela, j'ai dû, dans un premier temps, procéder à la synthèse de nanoparticules magnétiques d'oxydes de fer de trois tailles différentes (5, 10 et 15 nm). Ces dimensions ont été spécialement choisies pour leur adéquation avec la taille des virus. La méthode du polyol a été employée pour cette synthèse, en privilégiant spécifiquement le type maghémite. Une fois cette étape franchie, j'ai entrepris la fonctionnalisation des nanoparticules synthétisées. Une caractérisation minutieuse de leurs nanostructures, surfaces et propriétés magnétiques a ensuite été effectuée pour garantir leur stabilité.

Par la suite, un travail d'optimisation des conditions de greffage pour les deux types de virus a été mené. Après avoir réussi ce greffage, une phase cruciale de purification et de caractérisation des nanobiohybrides magnétiques nouvellement formés a été entreprise.

Finalement, ces nouveaux nanobiohybrides ont fait l'objet d'une étude poussée pour évaluer leurs propriétés magnétiques. Leur potentiel en hyperthermie magnétique et photothermique a également été exploré, mettant en lumière l'efficacité de ces nanomatériaux innovants.

## 5. Références

- [1] D. L. Leslie-Pelecky and R. D. Rieke, “Magnetic properties of nanostructured materials,” *Chem. Mater.*, vol. 8, no. 8, pp. 1770–1783, 1996, doi: 10.1021/cm960077f.
- [2] R. F. Butler and S. K. Banerjee, “Theoretical single-domain grain size range in magnetite and titanomagnetite,” *J. Geophys. Res.*, vol. 80, no. 29, pp. 4049–4058, 1975, doi: 10.1029/jb080i029p04049.
- [3] M. J. Mitchell, M. M. Billingsley, R. M. Haley, M. E. Wechsler, N. A. Peppas, and R. Langer, “Engineering precision nanoparticles for drug delivery,” *Nat. Rev. Drug Discov.*, vol. 20, no. 2, pp. 101–124, 2021, doi: 10.1038/s41573-020-0090-8.
- [4] E. Delyagina, W. Li, N. Ma, and G. Steinhoff, “Magnetic targeting strategies in gene delivery,” *Nanomedicine*, vol. 6, no. 9, pp. 1593–1604, 2011, doi: 10.2217/nmm.11.143.
- [5] T. HE *et al.*, “Pro-opiomelanocortin gene delivery suppresses the growth of established Lewis lung carcinoma through a melanocortin-1 receptor-independent pathway,” *J. Gene Med.*, vol. 14, no. 1, pp. 44–53, 2012, doi: 10.1002/jgm.
- [6] S. Tong, H. Zhu, and G. Bao, “Magnetic iron oxide nanoparticles for disease detection and therapy,” *Mater. Today*, vol. 31, no. December, pp. 86–99, 2019, doi: 10.1016/j.mattod.2019.06.003.
- [7] N. Tsapis, “Agents de contraste pour l’imagerie médicale,” *Medecine/Sciences*, vol. 33, no. 1, pp. 18–24, 2017, doi: 10.1051/medsci/20173301004.
- [8] A. M. M. Dias *et al.*, “Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles for Immunotherapy of Cancers through Macrophages and Magnetic Hyperthermia,” *Pharmaceutics*, vol. 14, no. 11, 2022, doi: 10.3390/pharmaceutics14112388.
- [9] A. N. Ilinskaya and M. A. Dobrovolskaia, “Immunosuppressive and anti-inflammatory properties of engineered nanomaterials,” *Br. J. Pharmacol.*, vol. 171, no. 17, pp. 3988–4000, 2014, doi: 10.1111/bph.12722.
- [10] M. H. Falk, R. D. Issels, “Hyperthermia in oncology,” *Int. J. Hyperth.*, vol. 17, no. 1, pp. 1–18, 2001, doi: 10.1080/02656730118511.
- [11] M. S. Martina *et al.*, “Generation of superparamagnetic liposomes revealed as highly efficient MRI contrast agents for in vivo imaging,” *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 127, no. 30, pp. 10676–10685, 2005, doi: 10.1021/ja0516460.
- [12] C. H. Cunningham, T. Arai, P. C. Yang, M. V. McConnell, J. M. Pauly, and S. M. Conolly, “Positive contrast magnetic resonance imaging of cells labeled with magnetic nanoparticles,” *Magn. Reson. Med.*, vol. 53, no. 5, pp. 999–1005, 2005, doi: 10.1002/mrm.20477.
- [13] S. Dutz and R. Hergt, “Magnetic nanoparticle heating and heat transfer on a microscale: Basic principles, realities and physical limitations of hyperthermia for tumour therapy,” *Int. J. Hyperth.*, vol. 29, no. 8, pp. 790–800, 2013, doi: 10.3109/02656736.2013.822993.
- [14] J. Van Der Zee, “Review Heating the patient: a promising approach?,” *Ann. Oncol.*, vol. 13, no. 8, pp. 1173–1184, 2002, doi: 10.1093/annonc/mdf280.

- [15] N. Abid *et al.*, “Synthesis of nanomaterials using various top-down and bottom-up approaches, influencing factors, advantages, and disadvantages: A review,” *Adv. Colloid Interface Sci.*, vol. 300, no. December 2021, p. 102597, 2022, doi: 10.1016/j.cis.2021.102597.
- [16] S. V. Aurobind, K. P. Amirthalingam, and H. Gomathi, “Sol-gel based surface modification of electrodes for electro analysis,” *Adv. Colloid Interface Sci.*, vol. 121, no. 1–3, pp. 1–7, 2006, doi: 10.1016/j.cis.2006.04.001.
- [17] W. Li, D. P. Fries, and A. Malik, “Sol-gel stationary phases for capillary electrochromatography,” *J. Chromatogr. A*, vol. 1044, no. 1–2, pp. 23–52, 2004, doi: 10.1016/j.chroma.2004.04.079.
- [18] M. Parashar, V. K. Shukla, and R. Singh, “Metal oxides nanoparticles via sol-gel method: a review on synthesis, characterization and applications,” *J. Mater. Sci. Mater. Electron.*, vol. 31, no. 5, pp. 3729–3749, 2020, doi: 10.1007/s10854-020-02994-8.
- [19] K. L. Dubrawski, C. Delaire, R. Kister, S. Addy, A. Gadgil, and M. Mohseni, “Formation pathways of magnetite nanoparticles by iron electrocoagulation,” pp. 1–5.
- [20] S. Li *et al.*, “Preparation of MgO nanomaterials by microemulsion-based oil/water interface precipitation,” *Mater. Lett.*, vol. 171, pp. 204–207, 2016, doi: 10.1016/j.matlet.2016.02.048.
- [21] B. K. Paul and S. P. Moulik, “Uses and applications of microemulsions,” *Curr. Sci.*, vol. 80, no. 8, pp. 990–1001, 2001.
- [22] N. Feltin and M. P. Pileni, “New technique for synthesizing iron ferrite magnetic nanosized particles,” *Langmuir*, vol. 13, no. 15, pp. 3927–3933, 1997, doi: 10.1021/la960854q.
- [23] T. Hyeon, Su Seong Lee, J. Park, Y. Chung, and Hyon Bin Na, “Synthesis of highly crystalline and monodisperse maghemite nanocrystallites without a size-selection process,” *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 123, no. 51, pp. 12798–12801, 2001, doi: 10.1021/ja016812s.
- [24] S. H. Feng and G. H. Li, *Hydrothermal and Solvothermal Syntheses*. 2017. doi: 10.1016/B978-0-444-63591-4.00004-5.
- [25] H. M. Muleme *et al.*, “基因的改变 NIH Public Access,” *J Immunol.*, vol. 23, no. 1, pp. 1–7, 2009, doi: 10.1021/jp902953t.A.
- [26] C. Boyer, M. R. Whittaker, V. Bulmus, J. Liu, and T. P. Davis, “The design and utility of polymer-stabilized iron-oxide nanoparticles for nanomedicine applications,” *NPG Asia Mater.*, vol. 2, no. 1, pp. 23–30, 2010, doi: 10.1038/asiamat.2010.6.
- [27] H. Basti *et al.*, “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,” *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 341, no. 2, pp. 248–254, 2010, doi: 10.1016/j.jcis.2009.09.043.
- [28] E. Cheraghipour, S. Javadpour, and A. R. Mehdizadeh, “Citrate capped superparamagnetic iron oxide nanoparticles used for hyperthermia therapy,” *J. Biomed. Sci. Eng.*, vol. 05, no. 12, pp. 715–719, 2012, doi: 10.4236/jbise.2012.512089.
- [29] J. Sherwood, Y. Xu, K. Lovas, Y. Qin, and Y. Bao, “Surface functionalization of dopamine coated iron oxide nanoparticles for various surface functionalities,” *J. Magn.*

- Magn. Mater.*, vol. 427, no. 205, pp. 220–224, 2017, doi: 10.1016/j.jmmm.2016.10.039.
- [30] S. Mohapatra and P. Pramanik, “Synthesis and stability of functionalized iron oxide nanoparticles using organophosphorus coupling agents,” *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.*, vol. 339, no. 1–3, pp. 35–42, 2009, doi: 10.1016/j.colsurfa.2009.01.009.
- [31] P. Hugounenq *et al.*, “Iron oxide monocrystalline nanoflowers for highly efficient magnetic hyperthermia,” *J. Phys. Chem. C*, vol. 116, no. 29, pp. 15702–15712, 2012, doi: 10.1021/jp3025478.
- [32] X. S. Fang, C. H. Ye, T. Xie, Z. Y. Wang, J. W. Zhao, and L. De Zhang, “Regular MgO nanoflowers and their enhanced dielectric responses,” *Appl. Phys. Lett.*, vol. 88, no. 1, pp. 1–4, 2006, doi: 10.1063/1.2159565.
- [33] E. Manikandan, V. Murugan, G. Kavitha, P. Babu, and M. Maaza, “Nanoflower rod wire-like structures of dual metal (Al and Cr) doped ZnO thin films: Structural, optical and electronic properties,” *Mater. Lett.*, vol. 131, pp. 225–228, 2014, doi: 10.1016/j.matlet.2014.06.008.
- [34] A. Vijayaraghavan *et al.*, “Ultra-large-scale directed assembly of single-walled carbon nanotube devices,” *Nano Lett.*, vol. 7, no. 6, pp. 1556–1560, 2007, doi: 10.1021/nl0703727.
- [35] C. M. Hangarter and N. V. Myung, “Magnetic alignment of nanowires,” *Chem. Mater.*, vol. 17, no. 6, pp. 1320–1324, 2005, doi: 10.1021/cm047955r.
- [36] C. M. Hangarter, Y. Rheem, B. Yoo, E. H. Yang, and N. V. Myung, “Hierarchical magnetic assembly of nanowires,” *Nanotechnology*, vol. 18, no. 20, 2007, doi: 10.1088/0957-4484/18/20/205305.
- [37] J. Chen, R. Zhang, L. Han, B. Tu, and D. Zhao, “One-pot synthesis of thermally stable gold@mesoporous silica core-shell nanospheres with catalytic activity,” *Nano Res.*, vol. 6, no. 12, pp. 871–879, 2013, doi: 10.1007/s12274-013-0363-1.
- [38] P. Paulraj, N. Janaki, S. Sandhya, and K. Pandian, “Single pot synthesis of polyaniline protected silver nanoparticles by interfacial polymerization and study its application on electrochemical oxidation of hydrazine,” *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.*, vol. 377, no. 1–3, pp. 28–34, 2011, doi: 10.1016/j.colsurfa.2010.12.001.
- [39] M. Khalkhali *et al.*, “Synthesis and characterization of dextran coated magnetite nanoparticles for diagnostics and therapy,” *BioImpacts*, vol. 5, no. 3, pp. 141–150, 2015, doi: 10.15171/bi.2015.19.
- [40] Y. Zhao, S. He, M. Wei, D. G. Evans, and X. Duan, “Hierarchical films of layered double hydroxides by using a sol-gel process and their high adaptability in water treatment,” *Chem. Commun.*, vol. 46, no. 17, pp. 3031–3033, 2010, doi: 10.1039/b926906a.
- [41] S. R. Whaley, D. S. English, E. L. Hu, P. F. Barbara, and A. M. Belcher, “Selection of peptides with semiconductor binding specificity for directed nanocrystal assembly,” *Nature*, vol. 405, no. 6787, pp. 665–668, 2000, doi: 10.1038/35015043.
- [42] S. Y. Park, A. K. R. Lytton-Jean, B. Lee, S. Weigand, G. C. Schatz, and C. A. Mirkin, “DNA-programmable nanoparticle crystallization,” *Nature*, vol. 451, no. 7178, pp.

553–556, 2008, doi: 10.1038/nature06508.

- [43] A. A. A. Aljabali, J. E. Barclay, G. P. Lomonossoff, and D. J. Evans, “Virus templated metallic nanoparticles,” *Nanoscale*, vol. 2, no. 12, pp. 2596–2600, 2010, doi: 10.1039/c0nr00525h.
- [44] A. S. Blum *et al.*, “An engineered virus as a scaffold for three-dimensional self-assembly on the nanoscale,” *Small*, vol. 1, no. 7, pp. 702–706, 2005, doi: 10.1002/sml.200500021.
- [45] F. J. Eber, S. Eiben, H. Jeske, and C. Wege, “Bottom-Up-Assembled Nanostar Colloids of Gold Cores and Tubes Derived From Tobacco Mosaic Virus,” *Angew. Chemie*, vol. 125, no. 28, pp. 7344–7348, 2013, doi: 10.1002/ange.201300834.

---

# Chapitre II

---

## **SYNTHESE, FONCTIONNALISATION ET CARACTERISATION DES NANOPARTICULES MAGNETIQUES.**

Au cours des dernières décennies, une grande attention a été accordée aux nanoparticules magnétiques (NPMs) en raison de leurs propriétés magnétiques ajustables et de leur excellente biocompatibilité. Certaines de leurs applications, telles que le ciblage magnétique (médicaments, gènes, produits radio-pharmaceutiques), l'imagerie par résonance magnétique, les diagnostics et le traitement du cancer (Figure 2.1), nécessitent un contrôle extrême de leurs propriétés, qui sont liées aux conditions physico-chimiques imposées lors de la synthèse, garantissant une reproductibilité élevée, un contrôle de la taille, ainsi qu'une stabilité à long terme, même après des modifications de surface.

Dans ce chapitre, je détaillerai la synthèse et la fonctionnalisation des nanoparticules par la voie polyol, ainsi que le rôle des divers paramètres expérimentaux dans le contrôle de la taille et de la morphologie des nanoparticules. Puis j'expliquerai pourquoi une fonctionnalisation de leur surface améliorera leur stabilité, leur biocompatibilité, et leurs efficacités globales pour les applications biomédicales. Cette fonctionnalisation de surface peut être réalisée par conjugaison via des liaisons covalentes ou non covalentes de produits chimiques ou de biomolécules, comme l'acide folique, les peptides ou les anticorps [1][2]. Les nanoparticules fonctionnalisées ont de bonnes propriétés physiques, comme l'anticorrosion, l'anti-agglomération, la stabilité et des caractéristiques non invasives.

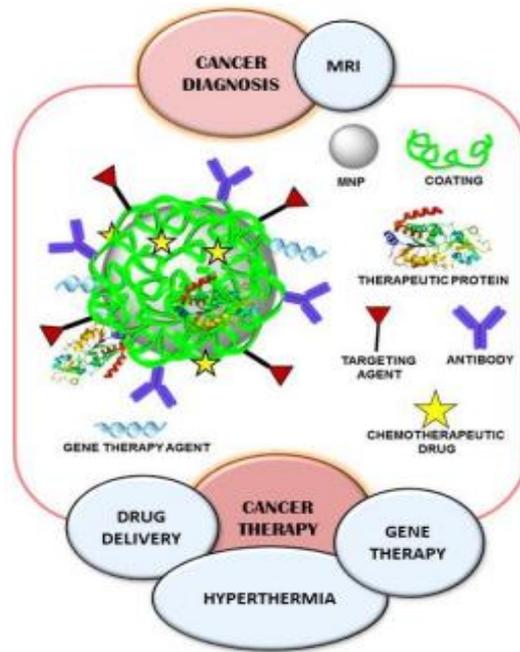


Figure 2.10: Schéma des applications biomédicales des nanoparticules d'oxyde de fer.

Pour ce travail, nous avons choisi de synthétiser puis de fonctionnaliser des nanoparticules d'oxyde de fer « maghémite » de différentes tailles 5, 10 et 15 nm avec un comportement superparamagnétique dans une configuration monodomaine. Dans la dernière partie, j'exposerai donc les caractérisations physicochimiques des nanoparticules synthétisées et fonctionnalisées grâce à la diffusion dynamique de la lumière (DLS), la diffraction des rayons X (DRX), le microscope électronique à transmission (MET), la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR) et la spectrométrie photoélectrique X (XPS).

### 1. La méthode polyol

Cette méthode de synthèse repose sur l'hydrolyse et la réduction des sels inorganiques de précurseurs métalliques et la condensation de ces ions pour former des nanoparticules métalliques, à haute température dans un milieu de polyols (Figure 2.2) [3]. Les polyols dans cette technique offrent des propriétés intéressantes en raison de leurs constantes diélectriques et leurs points d'ébullition élevés, qui aident à dissoudre les composés inorganiques. Ces polyols agissent à la fois comme solvant et agent complexant, stabilisant les ions  $Fe^{2+}$  et prévenant leur oxydation en ions  $Fe^{3+}$ , tout en contrôlant la croissance des nanoparticules et en empêchant l'aggrégation interparticulaire. Cette méthode offre l'avantage de contrôler les conditions expérimentales telles que le temps, la température, le taux d'hydrolyse et la condensation des précurseurs, ce contrôle permet d'obtenir des nanoparticules avec une distribution de taille étroite et une forme contrôlée. Des nanoparticules d'oxydes de fer sont

obtenues avec des tailles allant de 2 à 200 nm, de haute qualité, homogènes avec des structures cristallines bien définies et des propriétés magnétiques très intéressantes.

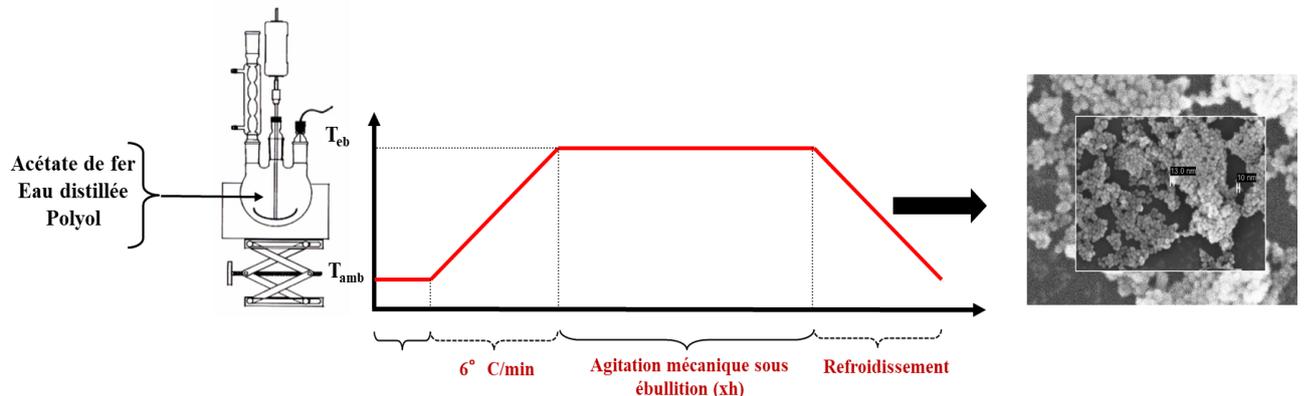


Figure 2.11 : Image illustrant la synthèse des nanoparticules magnétiques d'oxyde de fer par la voie polyol.

Cette partie décrit les différents paramètres (le taux d'hydrolyse, la concentration des précurseurs, la température et le temps de la réaction) de la synthèse par voie polyol, qui affectent la taille, la nature des nanoparticules magnétiques, et qui permettent d'améliorer le rendement de cette synthèse. La méthode polyol a été développée par Fievet et al. en 1984 [4]. Cette méthode de synthèse par chimie douce consiste à mettre en suspension un précurseur métallique dans un solvant polyol et à chauffer le mélange jusqu'à atteindre son point d'ébullition. Cette technique est la plus simple et la plus avantageuse pour synthétiser des poudres métalliques nanométriques solubles dans l'eau, monodisperses, monocristallines avec des propriétés magnétiques idéales.

### 1.1. Propriété des polyols

Les études confirment que le choix du solvant est essentiel pour obtenir des nanoparticules de haute qualité avec la taille souhaitée et avec une distribution de taille étroite [5][6]. La nature du solvant utilisé polaire ou apolaire a une influence très importante pendant la synthèse et peut affecter les étapes de nucléation et de croissance des nanoparticules.

Dans le processus de synthèse de nanoparticules inorganiques, les polyols couramment utilisés se catégorisent généralement comme des  $\alpha$ -diols, à l'instar du 1,2-éthanediol (EG) et du 1,2-propanediol (PG). Il existe également des alcools dérivés de la condensation d' $\alpha$ -diols, tels que le diéthylèneglycol (DEG), le triéthylène glycol (TEG) et le tétraéthylèneglycol (TEG) [7] (Figure 2.3).

Ces solvants polaires permettent sans l'aide d'une haute pression ou d'autoclaves de conduire des réactions de synthèse à haute température entre 200 à 320°C, grâce à leur point d'ébullition élevé, en comparaison avec celui de l'eau. Le point d'ébullition du polyol augmente avec son poids moléculaire (Figure 2.3 et Tableau 2.1). De même, la permittivité et le moment dipolaire augmente avec le poids moléculaire (Tableau 2.1). Ces valeurs élevées confèrent aux polyols un pouvoir ionisant et dissociant important, ce qui offre la possibilité de dissoudre de nombreux sels inorganiques.

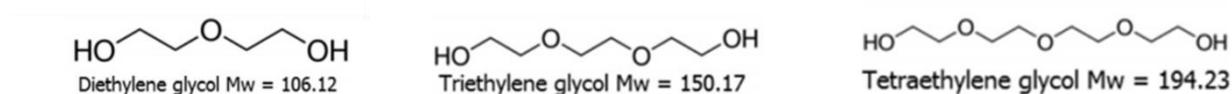


Figure 2.12: Structures chimiques et poids moléculaires des polyols utilisés dans la synthèse des nanoparticules magnétiques d'oxyde de fer par la voie de polyol.

Les polyols, en tant que solvants protiques, présentent des protons plus labiles que les alcools simples, en raison de l'effet inductif attracteur des groupements éther. Leur capacité à chélater encourage la création de complexes métalliques [8], offrant un contrôle stratégique sur la nucléation, la croissance des particules, et la prévention de l'agglomération durant la synthèse.

De plus, leur potentiel réducteur significatif [9] facilite la réduction de divers ions métalliques, participant à la synthèse de nanoparticules métalliques et d'oxydes métalliques. La réaction d'oxydo-réduction entre les cations métalliques et le polyol favorise la production de nanoparticules, dont la taille est maîtrisée, et assure simultanément une fonctionnalisation et une stabilisation de surface, attribuable à une présence accrue de polyol. L'oxydation du polyol varie en fonction de la capacité oxydante des sels métalliques, requérant une basse température pour des sels facilement réductibles, et une température plus élevée pour ceux qui sont moins aisément réductibles. Ainsi, le choix du solvant est crucial pour acquérir des nanoparticules de haute qualité, de taille désirée, et avec une distribution de taille resserrée.

Solvant	Température d'ébullition (°C)	Permittivité $\epsilon$ (pF/m)	Moment dipolaire $\mu$ (Debye)	Masse molaire (g/mol)
Eau	100	80	1.94	18.01
Ethanol	78.3	24.3	1.69	46.07
Ethylèneglycol	198	37.7	2.28	62.07
Diéthylèneglycol	245	32	2.31	106.12
Triéthylèneglycol	287	23.7	5.58	150.17
Tétraéthylèneglycol	314	-	-	194.23

Tableau 2.4: Caractéristiques physicochimiques de l'eau, de l'éthanol et de quelques  $\alpha$ -diols utilisés dans cette thèse.

## 1.2. Hydrolyse et réduction du précurseur métallique

Des études menées par Poul et al. ont examiné l'impact du milieu polyol dans l'orientation des réactions vers soit la réduction ou l'hydrolyse, influençant ainsi la nature du produit formé, qu'il s'agisse de métal, d'oxydes ou d'hydroxydes [8]. Le taux d'hydrolyse, noté  $h$ , est crucial dans ce contexte, étant défini comme le rapport molaire entre l'eau et le cation métallique dans le milieu réactionnel (Éq 1), et joue un rôle significatif dans la détermination du produit final [10].

$$h = \frac{n(H_2O)}{n(Fe^{2+})} \quad (\text{Éq 1})$$

Ce taux d'hydrolyse présente une valeur critique, variant selon le précurseur métallique utilisé. Au-delà de cette valeur, la réaction d'hydrolyse prédomine, formant des oxydes ou hydroxydes, tandis qu'en dessous, la réaction de réduction des cations métalliques est favorisée, conduisant à la formation de métaux. Notamment, il est à observer que le taux d'hydrolyse  $h$  impacte également la température d'ébullition du mélange réactionnel. Une valeur élevée de  $h$  entraînera une température inférieure à la température d'ébullition du polyol seul, privilégiant ainsi la réaction de condensation par hydroxylation et menant à la formation d'hydroxydes. Ainsi, une optimisation du taux d'hydrolyse  $h$  est essentielle pour la synthèse d'oxydes afin de contrôler la température d'ébullition du mélange réactionnel et favoriser la réaction de condensation par oxolation.

Le choix du sel d'acétate comme précurseur est courant dans les réactions d'hydrolyse et de condensation en raison du rôle pivot du contre-ion. En effet, grâce à son caractère basique, l'ion acétate confère à l'eau un caractère nucléofuge affirmé comparé à l'ion chlorure, qui tend à demeurer dans la sphère de coordination du cation métallique [7].

Avec l'utilisation des sels d'acétate, la réaction d'hydrolyse se déroule en deux phases distinctes : initialement, les liaisons hydrogène se forment entre l'eau et les ligands acétate, générant de l'acide acétique. Par la suite, le groupe  $OH^-$  substitue l'acide acétique (Figure 2.4).

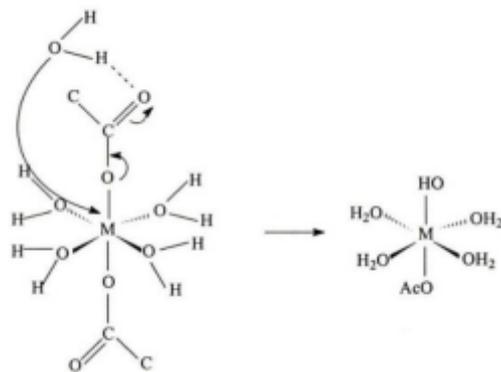


Figure 2.13 : La substitution nucléophile de l'acétate par l'eau en milieu polyol se réfère à une réaction chimique dans laquelle l'ion acétate est remplacé par une molécule d'eau en présence d'un solvant polyol

Pour certains cations métalliques, et à faibles taux d'hydrolyse, des échanges acido-basiques peuvent survenir entre les ions acétate et le polyol, entraînant la formation d'anions glycolates. Ces derniers peuvent partiellement remplacer les ions acétates dans la sphère de coordination du cation, formant ainsi des complexes alkoxyacétates (Figure 2.5).

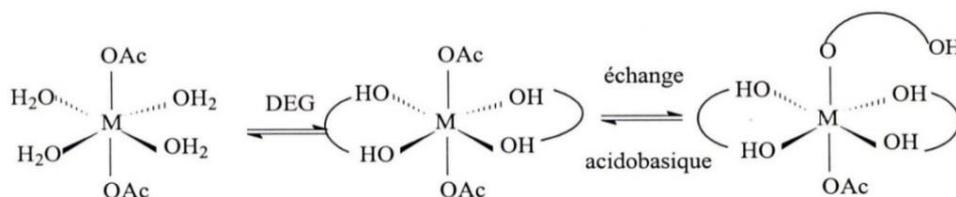


Figure 2.14 : formation des complexes de types alkoxyacétates en milieu polyol.

Cette étape clé de formation des complexes alkoxyacétates joue un rôle essentiel dans notre compréhension des réactions en cours.

### 1.3. Nucléation et croissance des nanoparticules

Pendant la synthèse des nanoparticules en milieu liquide, le contrôle de la taille nécessite la bonne compréhension des principaux concepts de nucléation et de croissance qui sont décrits par LaMer et al. [11]. La nucléation et la croissance cristalline sont les deux processus fondamentaux à la formation des colloïdes (Figure 2.6).

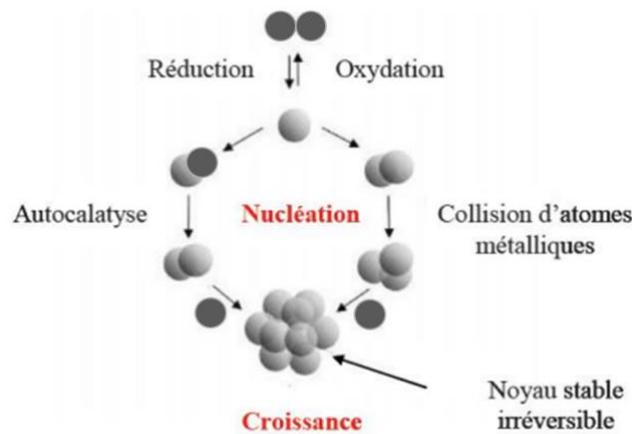


Figure 2.15 : Mécanisme de formation des colloïdes par réduction d'un sel métallique

Le modèle classique de cristallisation des nanoparticules, décrit par LaMer et Dinegar [10], est structuré autour de trois étapes clés : prénucléation, nucléation, et croissance. Il commence par une intensification de la concentration en soluté, accélérant la dissolution du précurseur dans la solution jusqu'à atteindre une concentration critique de sursaturation. À ce stade, une nucléation homogène est déclenchée, engendrant une formation uniphasee de germes et une diminution concomitante de la concentration en soluté. Quand cette dernière diminue au-dessous du seuil de sursaturation, la génération de germes est inhibée, et la croissance des noyaux déjà formés est déclenchée, alimentée par la diffusion du soluté depuis la solution vers le noyau, jusqu'à ce que la concentration du soluté atteigne la solubilité et que les nanoparticules parviennent à leur taille idéale (Figure 2.7, courbe I).

Suite à la création de nanoparticules uniformément dispersées par nucléation primaire, des processus secondaires peuvent se manifester, ainsi que la formation de nouveaux germes particulières à haute énergie. D'autres occurrences de nucléation homogène sont possibles dans toute la solution réactionnelle, où les petits cristaux ainsi formés peuvent se redissoudre et s'ajouter à des noyaux plus gros, facilitant ainsi la croissance de cristaux importants et uniformes, via un processus dénommé maturation d'Ostwald ou auto-réformage (Figure 2.7, courbe II).

Des études récentes révèlent que des niveaux élevés de sursaturation dans la solution favorisent la formation d'agrégats de petites unités [12][13], en induisant la création rapide d'un grand nombre de noyaux, conduisant ainsi à l'émergence de nanoparticules de taille uniforme (Figure 2.7, courbe III).

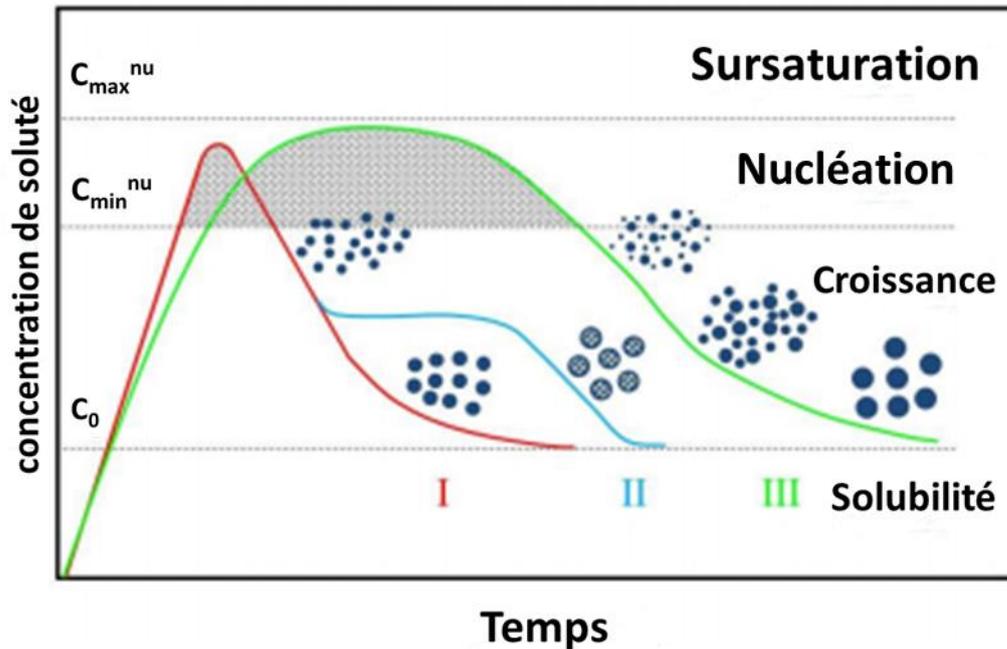


Figure 2.16: Mécanisme de formation de particules uniformes en solution : courbe I (rouge) : nucléation unique et croissance uniforme par diffusion (modèle classique de LaMer et Dinegar) ; courbe II (bleue) : événements de nucléation multiples et croissance de maturation d'Ostwald ; courbe III (verte) : nucléation, croissance et agrégation de sous-unités plus petites.

En ce qui concerne la synthèse de nanoparticules en milieu polyol, une phase intermédiaire, telle qu'un hydroxyde ou un oxo-hydroxyde, se forme, agissant comme un réservoir de cations. Au sein de cette phase, la régulation de la concentration des cations et la cinétique de nucléation des particules dépendent de la cinétique de dissolution des sels, guidant ainsi la formation de nanoparticules monodisperses.

Si LaMer et al. considèrent la nucléation et la croissance comme des phases distinctes, Den Ouden et Thompson avancent que la distinction nette entre ces deux étapes n'est pas impérative [14] pour obtenir une monodispersité des nanoparticules. Ils notent qu'une élévation de la concentration du précurseur peut propulser la croissance des nanoparticules pendant la phase de nucléation, et, par conséquent, une croissance plus rapide induit des nanoparticules de taille réduite. La vitesse de croissance des nanoparticules, plutôt que la vitesse de diffusion du soluté, détermine donc leur dispersité.

En résumé, la croissance particulière peut se réaliser soit par coalescence entre deux particules, soit par diffusion atomique, et la monodispersité est imputable à la rapidité relative de la phase de nucléation comparée à l'étape de croissance des germes. La préservation de

cette monodispersité est cruciale dans presque toutes les applications, étant donné son influence substantielle sur les propriétés magnétiques, qui sont intrinsèquement liées à la taille et à la forme des nanoparticules.

#### 1.4. Contrôle de la taille des nanoparticules

Les trois paramètres réactionnels cruciaux qui régulent le processus de nucléation, croissance et homogénéisation des nanoparticules dans le milieu polyol sont la température, le temps de réaction, et la concentration du précurseur. Néanmoins, les deux premiers paramètres sont également influencés par la nature du polyol utilisé. Dans la section suivante, nous examinerons l'impact de ces trois paramètres ainsi que celui du polyol sur le contrôle de la taille et de la morphologie des nanoparticules d'oxyde de fer synthétisées.

##### 1.4.1. Influence de la température

Dans le contexte du milieu polyol, la température occupe une position centrale dans la régulation de la taille des nanoparticules. Des recherches antérieures ont confirmé que l'abaissement de la température d'ébullition du milieu réactionnel se traduit par une réduction de la taille des nanoparticules lors de la synthèse par la voie polyol [15]. Cet effet peut s'expliquer par le fait qu'à basse température, l'énergie nécessaire à la formation d'un germe est réduite, ce qui favorise une germination à la fois plus rapide et plus abondante par rapport à ce qui est observé à haute température, conformément au mécanisme classique de LaMer pour la synthèse de nanoparticules. En conséquence, en supposant une quantité équivalente de précurseur dans le milieu réactionnel, le diamètre moyen des particules formées croît avec la température d'ébullition.

La température d'ébullition peut être influencée par deux facteurs : la nature du polyol et le taux d'hydrolyse. Comme mentionné précédemment, la quantité d'eau présente joue un rôle déterminant dans l'établissement du taux d'hydrolyse et, intéressant, la température d'ébullition est inversement proportionnelle à ce taux. Par conséquent, un taux d'hydrolyse plus élevé résulte en une baisse de la température d'ébullition du système par rapport à celle du polyol pur. En outre, une augmentation de la masse moléculaire du polyol entraîne une élévation de sa température d'ébullition, comme l'illustrent les valeurs présentées dans le Tableau 2.1.

#### 1.4.2. Influence du temps de réaction

L'impact du temps de réaction sur la synthèse des nanoparticules d'oxyde de fer via la méthode polyol est appuyé par diverses études ainsi que par nos expériences propres, démontrant une influence concrète sur la taille des nanoparticules et, par conséquent, sur leur aimantation. Spécifiquement, dans le contexte du diéthylène glycol, faire passer le temps de réaction de 30 minutes à 2 heures a provoqué une augmentation de la taille des nanoparticules, passant de 5 nm à 15 nm [16]. Au-delà de 2 heures de réaction, la taille des nanoparticules cesse de croître, tous les précurseurs ayant été consommés à ce stade. Il est intéressant de noter que la modulation de la taille des nanoparticules synthétisées peut être accomplie en ajustant la nature du polyol ainsi que le temps de réaction. À titre d'exemple, des nanoparticules de 10 nm peuvent être obtenues en chauffant pendant 1 heure avec le triéthylène glycol, alors qu'une taille de 15 nm peut être atteinte avec le tétraéthylène glycol pendant une durée identique de chauffage.

#### 1.4.3. Influence de la concentration de précurseurs

La concentration du précurseur constitue l'un des paramètres cruciaux qui régule la taille des nanoparticules dans le procédé polyol. L'augmentation de la concentration du précurseur dans le milieu réactionnel conduit à une croissance significative des nanoparticules, et donc à une augmentation de leur taille. Cette dynamique peut s'expliquer de la manière suivante : en accroissant la quantité initiale de sels métalliques dissous, la matière disponible se dépense plus lentement dans le milieu, atteignant la sursaturation avant l'étape de germination. Cela tend à accélérer la vitesse de nucléation et la croissance des particules via diffusion. Par conséquent, le rapport entre les cations dans la solution et le nombre de noyaux diminue, conduisant à la formation de cristallites plus grandes. Cependant les interactions de type van der Waals, qui sont responsables de l'agrégation, diminuent à mesure que la taille des cristallites augmente. La taille des nanoparticules varie en proportion directe avec la concentration du précurseur, étant donné que c'est ce paramètre qui régit les vitesses de nucléation, de croissance et d'agrégation.

#### 1.4.4. Influence de la nature du polyol

Les polyols, alcools polyfonctionnels, jouent un rôle crucial dans la synthèse des nanoparticules métalliques en influençant notablement leur taille et leur forme. Ils endossent plusieurs fonctions dans ce processus, notamment la réduction des métaux, la stabilisation des particules formées et le contrôle de leur croissance. En effet, diverses propriétés physico-chimiques des polyols, comme la viscosité, la polarité, la constante diélectrique et leur capacité à coordonner les ions métalliques, interfèrent avec la cinétique de formation des nanoparticules, influençant ainsi la nucléation et la croissance des particules, et par conséquent, leur taille finale.

Des études antérieures ont mis en lumière l'importance du choix du polyol dans la détermination de la taille et de la forme des nanoparticules. Certains polyols peuvent favoriser une nucléation plus rapide, ce qui conduit à des particules plus petites, tandis que d'autres permettent un contrôle plus précis de la taille des nanoparticules formées. Ainsi, Chieng et al. [17] ont démontré que la taille des particules d'oxyde de zinc formées est proportionnelle à la longueur de la chaîne alkyl du polyol utilisé, à travers une étude impliquant trois types de polyols différents (EG, DEG, TTEG).

Par ailleurs, le choix du polyol peut aussi diriger la croissance préférentielle des nanoparticules dans certaines directions cristallographiques, menant à la formation de particules de formes spécifiques. Alors que l'utilisation d'éthylène glycol favorise souvent la création de nanoparticules sphériques et l'ajustement des conditions de synthèse avec ce même polyol peut également engendrer des nanoparticules présentant des formes anisotropes.

En conclusion, bien que les polyols puissent servir de réducteurs et stabilisateurs dans la synthèse de nanoparticules métalliques, leur nature et leurs propriétés spécifiques jouent un rôle non négligeable dans le contrôle de la taille et de la forme des particules obtenues, nécessitant un ajustement précis des paramètres de synthèse pour atteindre les caractéristiques particulières souhaitées.

## **2. Synthèse de nanoparticules d'oxyde de fer par la voie polyol**

### 2.1. Conditions expérimentales

Dans cette étude, nous avons employé la méthode polyol pour synthétiser des nanoparticules d'oxyde de fer de trois tailles distinctes (5 nm, 10 nm et 15 nm), et les avons fonctionnalisées avec des molécules organiques, conférant ainsi des groupes fonctionnels  $-\text{COOH}$  et  $-\text{NH}_2$  à

leur surface. Bien que la concentration des précurseurs métalliques soit maintenue constante à travers les trois expériences, des variations sont introduites par l'utilisation de solvants distincts, impactant ainsi les températures d'ébullition et, par conséquent, influençant les tailles finales des nanoparticules. Plus précisément, du diéthylèneglycol, du triéthylèneglycol et du tétraéthylèneglycol sont utilisés pour la synthèse des nanoparticules mesurant respectivement 5 nm, 10 nm et 15 nm (comme illustré dans la Figure 2.8). Par ailleurs, le temps de réaction et le taux d'hydrolyse sont ajustés en fonction de la taille de nanoparticule désirée

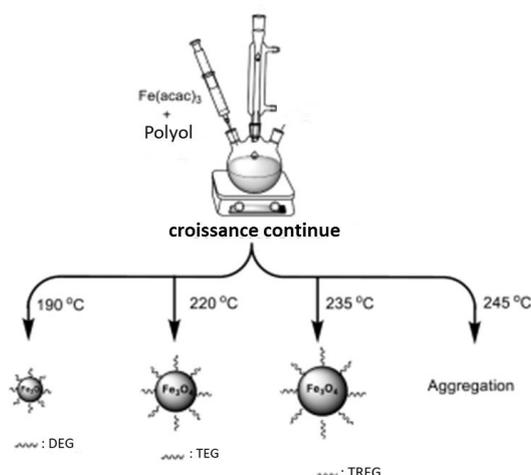


Figure 2.8: les conditions expérimentales pour synthétiser des nanoparticules d'oxyde de fer de différentes tailles par la voie polyol.

Les conditions expérimentales relatives à la synthèse des trois différentes tailles de nanoparticules par voie polyol sont résumées dans le Tableau 2.2. Suite à la synthèse, une poudre noire de magnétite est obtenue, laquelle est aisément oxydable en maghémite, produisant une poudre de couleur brune. Cette oxydation peut se produire soit en quelques heures dans une étuve à 50°C, soit à l'air ambiant durant une nuit

Nom de l'échantillon	A	B	C
Taille (nm)	5	10	15
$m_{\text{acétate de fer}}$ (g)	4.33	4.33	4.33
$m_{\text{eau}}$ (g)	10	1	0.45
$n_{\text{acetate}}$ (mol)	0.025	0.025	0.025
$n_{\text{eau}}$ (mol)	1.1	0.11	0.025
$h$ ( $n_{\text{eau}}/n_{\text{acétate}}$ )	22.5	2.25	1
Solvant	Diéthylène Glycol	Triéthylène Glycol	Tétraéthylène Glycol
V solvant (mL)	250	250	125
Teb polyol (°C)	245	285	314
Teb (°C)	169	230	250

Temps de reaction (h)	3	2	1
-----------------------	---	---	---

Tableau 5.2: Résumé des conditions expérimentales utilisées pour la synthèse de nanoparticules d'oxyde de fer de trois tailles différentes. Les paramètres clés tels que la température d'ébullition, le temps de réaction, la masse de précurseur et le taux d'hydrolyse sont indiqués pour chaque taille de nanoparticules

## 2.2. Caractérisation des nanoparticules obtenues

### 2.2.1. Détermination de la phase cristalline

La magnétite ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) et la maghémite ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ) se caractérisent par des structures cristallines distinctes. La magnétite cristallise dans une structure de type spinelle inverse, présentant un paramètre de maille de  $a=8,396 \text{ \AA}$ , et se compose d'anions  $\text{O}^{2-}$  qui forment un réseau cubique à faces centrées (cfc). Sa spécificité réside dans la coexistence des ions fer aux états d'oxydation  $\text{Fe}^{2+}$  et  $\text{Fe}^{3+}$ , les ions  $\text{Fe}^{3+}$  occupant des sites tétraédriques, tandis que les ions  $\text{Fe}^{2+}$  et  $\text{Fe}^{3+}$  se répartissent dans des sites octaédriques (Figure 2.9-a), orchestrés de manière à minimiser les interactions répulsives entre ions de même état d'oxydation adjacents. D'autre part, la maghémite, qui cristallise également dans le système cubique avec un paramètre de maille légèrement inférieur,  $a=8,348 \text{ \AA}$ , affiche une structure cristalline de spinelle directe. Sa particularité provient du fait que tous les ions fer présents sont à l'état d'oxydation  $\text{Fe}^{3+}$ , et qu'une portion des sites octaédriques reste vacante afin de préserver la neutralité électrique de la structure, en l'absence d'ions  $\text{Fe}^{2+}$  (Figure 2.17-b). Bien que la coordination des ions  $\text{Fe}^{3+}$  et  $\text{O}^{2-}$  dans la maghémite soit globalement similaire à celle observée dans la magnétite, l'absence d'ions fer dans certains sites octaédriques se révèle être un contraste structurel notable entre les deux.

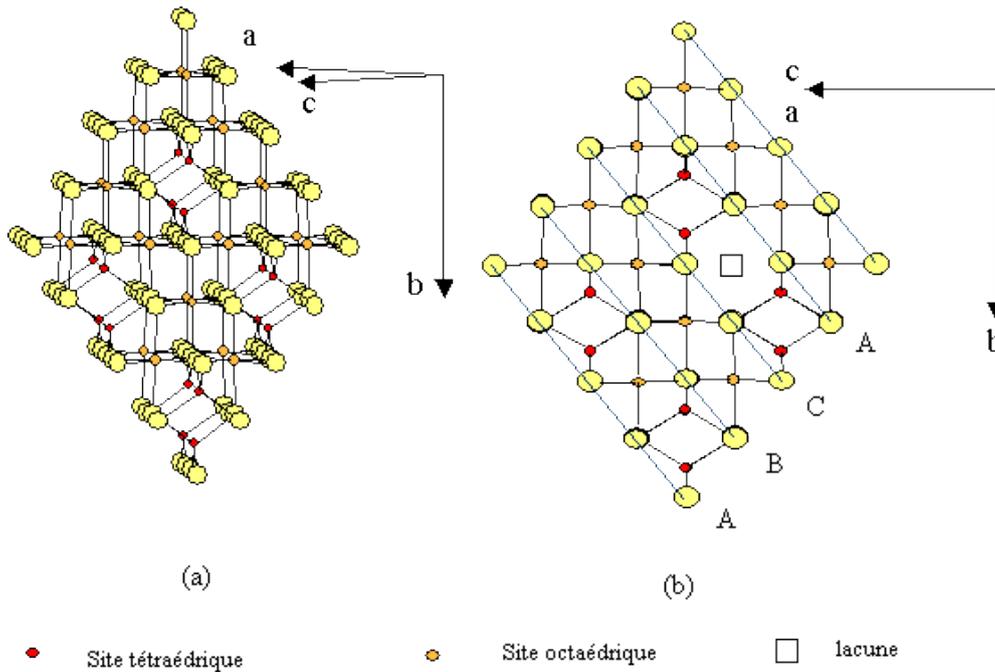
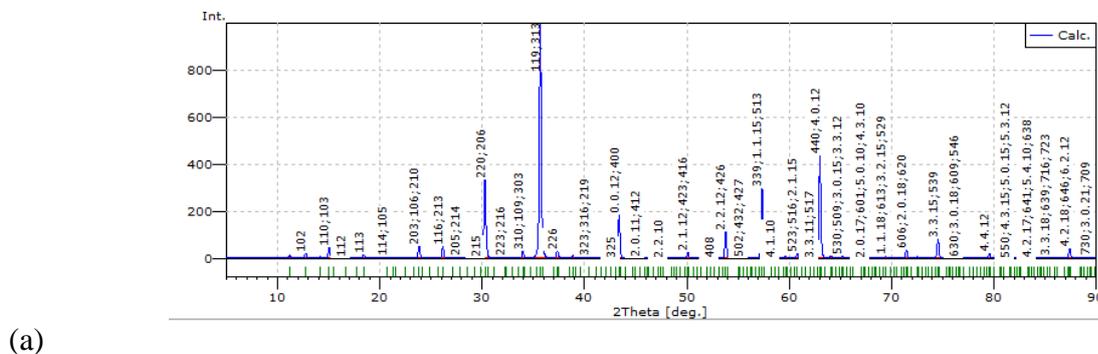


Figure 2.9: Comparaison des structures cristallines : (a) magnétite et (b) maghémite.

L'analyse par diffraction des rayons X (DRX) révèle des caractéristiques distinctes dans les structures cristallines de la magnétite et de la maghémite. La magnétite présente des pics de diffraction caractéristiques, associés à la structure spinelle inverse et des indices de Miller particuliers, dévoilant ainsi ses plans cristallins (Figure 2.10-b). En parallèle, la maghémite montre des pics spécifiques, en lien avec la structure corindon, qui, en termes de position, d'intensité et d'indices de Miller, peuvent se distinguer nettement de ceux de la magnétite (Figure 2.10-a). Les pics principaux, correspondant aux phases de la magnétite et de la maghémite, sont étroitement proches, comme le montre la littérature, et comme cela est illustré par les figures 2.10-a et b.



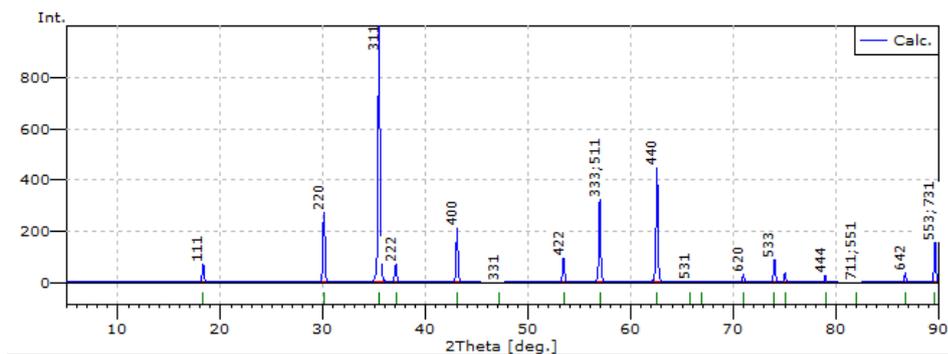


Figure 2.18: Raies de diffraction indexées obtenues avec le logiciel ReciPro (a) pour la maghémite ( $Fe_2O_3$ ) et (b) pour la magnétite ( $Fe_3O_4$ ). Les pics de diffraction illustrent la structure cristalline de la maghémite et de la magnétite dans deux échantillons de référence analysés.

(b)

La figure 2.11 montre les diffractogrammes des nanoparticules d'oxyde de fer que nous avons obtenu par synthèse polyol avec trois tailles : 5 nm (A), 10 nm (B) et 15 nm (C).

Les diffractogrammes sont indexés avec les données cristallographiques (Inorganic crystal structure database) des structures Fd-3m ICSD 98-016-4814 et ICSD 98-024-7034 pour la magnétite et la maghémite respectivement.

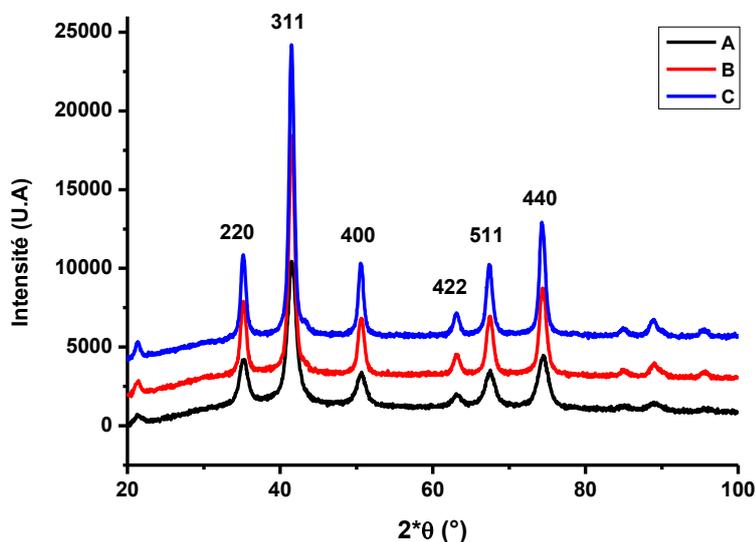


Figure 2.19: Diagrammes de diffraction aux rayons X des échantillons A, B et C préparés par la voie polyol, présentant des tailles de nanoparticules de 5 nm, 10 nm et 15 nm respectivement. Les pics de diffraction indiquent la structure cristalline des nanoparticules d'oxyde de fer de différentes tailles.

Le diffractogramme des nanoparticules de 10 nm, analysé à l'aide du logiciel HighScore et illustré dans la Figure 2.12, révèle deux raies distinctives à  $27^\circ$  et  $31^\circ$ , identifiées comme

caractéristiques de la phase maghémite, une observation corroborée par la Figure 2.10-a. Sur la Figure 2.12, les positions théoriques des raies de la maghémite sont marquées par des pointillés orange. On note un léger décalage des raies de diffraction de notre échantillon (indiqué par un trait plein orange) par rapport aux valeurs théoriques, plus visible aux grands angles. Cela pourrait indiquer la présence simultanée de deux phases d'oxyde de fer, à savoir la magnétite et la maghémite, au sein du même échantillon ou d'une particule unique. Cette observation a motivé une réoxydation de l'échantillon, une étape nécessaire pour assurer l'obtention exclusive de la phase maghémite, avant de procéder à des analyses supplémentaires. Il est important de noter qu'aucun pic relatif à d'autres phases d'oxyde de fer, telles que l'hématite (polymorphe  $\alpha$  de  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ ), les oxydes simples ( $\text{FeO}$ ) ou les hydroxydes ( $\text{Fe}(\text{OH})_2$  et  $\text{Fe}(\text{OH})_3$ ), n'a été détecté. Cela confirme que les nanoparticules synthétisées sont cristallisées de manière optimale, exemptes de composés cristallins indésirables ou de phases parasites.

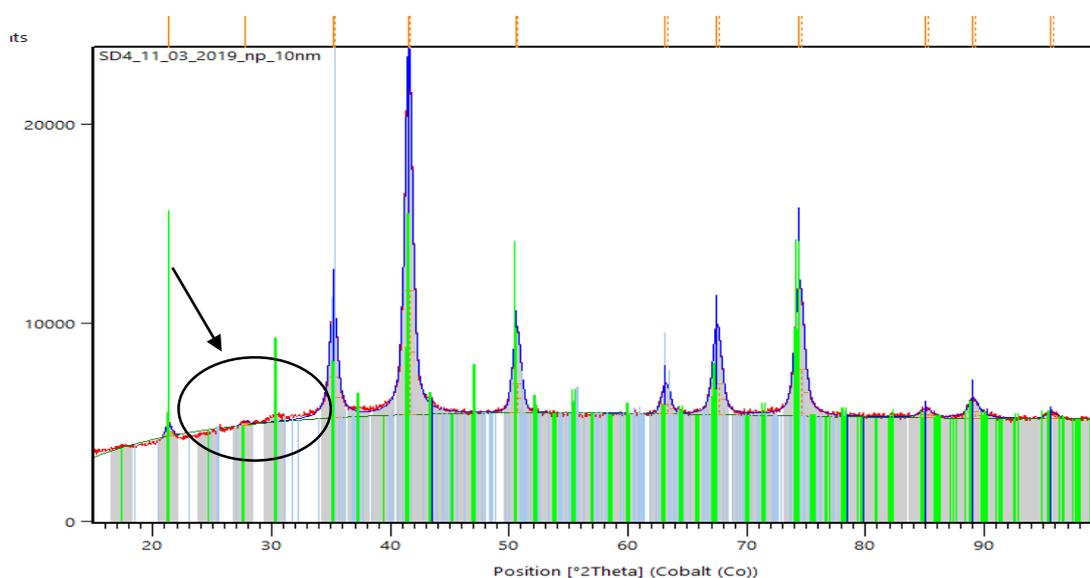


Figure 2.20: Les pics du diffractogramme d'un échantillon de 10 nm sont indexés par des lignes pointillées correspondant aux raies de diffraction de référence de la magnétite en bleu et de la maghémite en vert. Ces raies de diffraction confirment la présence simultanée des phases de magnétite et de maghémite dans l'échantillon de 10 nm.

Les pics d'intensité maximale obtenus par diffraction des rayons X, correspondant aux divers plans (hkl) de la maille, et un paramètre de maille mesuré à 8.364 Å suggèrent une complexité dans la distinction entre les phases magnétite et maghémite. Bien qu'elles partagent une maille cristalline cubique face centrée, les paramètres de maille sont subtilement différents : 8,396 Å

pour la magnétite et 8,348 Å pour la maghémite. Ainsi, les nanoparticules synthétisées semblent correspondre à une phase intermédiaire entre  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  et  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ , ou un mélange des deux.

L'examen des spectres haute résolution de Fe2p, réalisé par spectroscopie photoélectronique à rayons X (XPS) sur des échantillons standard de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  et  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ , a joué un rôle crucial dans la confirmation de la phase cristalline des nanoparticules d'oxyde de fer. D'après les travaux antérieurs, la position des pics de Fe2p<sub>1/2</sub> et Fe2p<sub>3/2</sub> est influencée par l'état d'oxydation du Fe [13], et l'impact de la présence ou de l'absence de pics satellites est également notable (Figure 2.13). Les énergies de liaison des électrons Fe 2p<sub>3/2</sub> et Fe 2p<sub>1/2</sub> sont établies à 710.6 et 724.1 eV pour les particules  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , et à 711.0 et 724.6 eV pour les particules  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ , comme le rapporte Liu et al. [18] (Figures 2.13-a et b respectivement). De plus, deux pics satellites distincts, situés respectivement à 718,8 eV et 729,5 eV, sont exclusivement associés à la phase maghémite, offre une confirmation supplémentaire de cette phase [19][20][21].

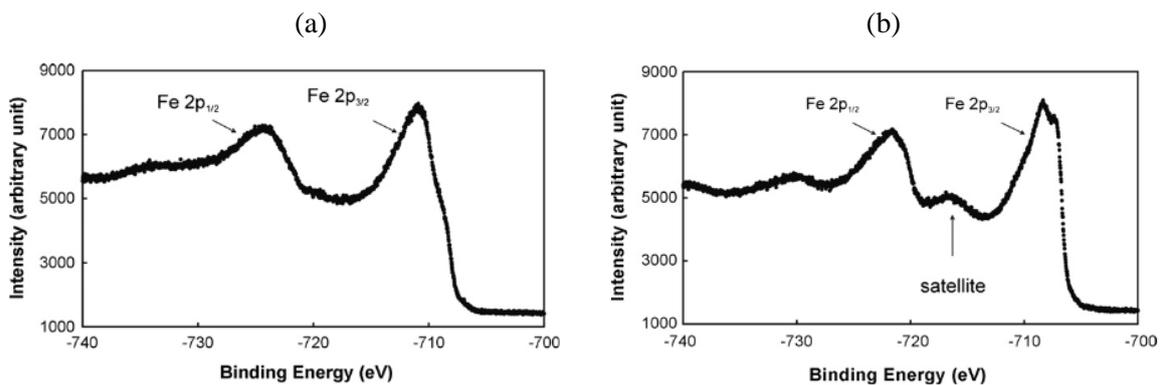


Figure 2.21: le spectre XPS de Fe 2p de la surface des échantillons standard de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  (a) et  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  (b).

Initialement, les spectres HR-XPS des échantillons synthétisés A, B et C indiquent des énergies de liaison de 711.0 et 724.6 eV, caractéristiques de la phase cristalline de la maghémite. De plus, deux pics satellites  $\text{Fe}^{3+}$  sont observés à 719 eV, intercalés entre les pics 2p<sub>3/2</sub> et 2p<sub>1/2</sub> du doublet, et à 729 eV (Figure 2.14). Ces observations corroborent les résultats de DRX, affirmant que ces échantillons sont majoritairement composés de maghémite. En outre, l'absence d'épaule dans la bande Fe2p<sub>3/2</sub> vers 709,0 eV (Figure 2.14) confirme la composition de type maghémite des échantillons.

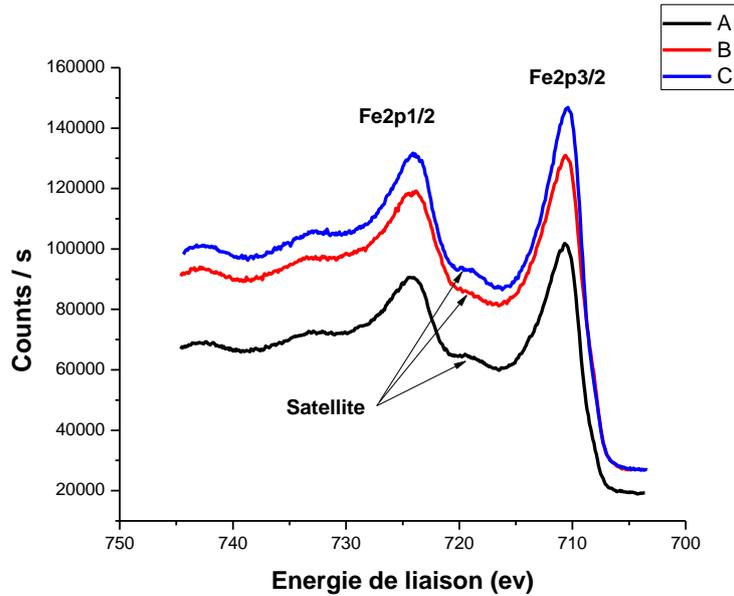


Figure 2.22: Les spectres XPS de Fe2p des surfaces des trois échantillons A, B et C. Les pics caractéristiques de liaison Fe2p sont clairement identifiables pour chaque échantillon, permettant ainsi d'analyser les états d'oxydation du fer dans les nanoparticules d'oxyde de fer de différentes tailles.

### 2.2.2. Détermination de la taille des nanoparticules synthétisées

La largeur des pics dans le diffractogramme est liée à la taille du cristal des nanoparticules, de sorte que plus la largeur du pic est grande, plus la taille du cristal est petite. Par conséquent, on peut voir que les pics de diffraction deviennent plus fins à mesure que la taille des nanoparticules augmente. Après la détermination de la structure cristallographique à partir des diffractogrammes enregistrés, la taille des cristallites sont estimés à partir de l'élargissement du pic principal (311) des échantillons A, B et C en utilisant l'équation de Scherrer (Éq 2):

$$t = \frac{k \cdot \lambda}{\sqrt{H^2 - S^2} \cdot \cos\theta} \quad (\text{Éq 2})$$

Avec  $t$  la taille des cristallites en Å,  $k$  un facteur correctif ( $k = 0,9$ ) propre au diffractomètre utilisé,  $\lambda$  la longueur d'onde du rayonnement Co,  $H$  la largeur à mi-hauteur du pic principal (311) de l'échantillon,  $S$  la largeur à mi-hauteur d'un pic de référence pour une cristallite infiniment grande. Les tailles de cristallites calculées sont respectivement de  $5,6 \pm 1,5$  nm,  $9,4 \pm 1,5$  nm et  $14,2 \pm 1,5$  nm pour les échantillons A, B et C (Tableau 2.3).

	Taille DRX (nm)	Taille MET (nm)
<b>A</b>	<b>5,6 ± 1,5</b>	<b>5 ± 6</b>
<b>B</b>	<b>9,4 ± 1,5</b>	<b>10 ± 5</b>
<b>C</b>	<b>14,2 ± 1,5</b>	<b>15 ± 7</b>

*Tableau 2.6: Comparaison des tailles des nanoparticules obtenues par Diffraction des Rayons X (DRX) et Microscopie Électronique à Transmission (TEM) pour les échantillons A, B et C. Les résultats DRX fournissent les tailles cristallines moyennes des nanoparticules, tandis que les images TEM permettent d'observer directement la morphologie et la taille des nanoparticules individuelles pour chaque échantillon.*

L'analyse MET, appliquée à trois synthèses de nanoparticules d'oxyde de fer par la méthode polyol avec divers polyols (DEG, TEG et TREG), est illustrée à la Figure 2.15. Toutes les images mettent en évidence une tendance notable à l'agrégation des nanoparticules, ce qui est cohérent avec le comportement attendu pour des nanoparticules d'oxyde de fer nues à un pH de 7. Bien que les morphologies des nanoparticules des trois échantillons soient assez similaires, présentant des formes quasi-sphériques et une distribution de taille étroite, les tailles moyennes diffèrent légèrement : respectivement  $5 \pm 6$  nm,  $10 \pm 5$  nm et  $15 \pm 7$  nm pour les échantillons A, B et C, des valeurs en adéquation avec les données couramment rapportées par cette méthode de synthèse [7].

Une gestion précise de deux paramètres clés, à savoir la température de réaction et le taux d'hydrolyse  $h$ , a permis la synthèse de nanoparticules en trois tailles distinctes. Les images MET révèlent que les échantillons des trois tailles de maghémite, une fois dispersés dans l'eau, exhibent d'importants agrégats de grande taille, comme anticipé. Effectivement, la taille des agrégats s'accroît avec le poids moléculaire du solvant, tandis que la morphologie des nanoparticules demeure inchangée. L'élargissement de la chaîne carbonée du polyol engendre une augmentation de la taille des nanoparticules et une concentration accrue de précurseurs, induisant ainsi une phase de germination éphémère. En début de phase de croissance, les particules évoluent vers une morphologie sphérique, leur énergie de surface fluctuant en fonction de leur taille et provoquant l'agrégation. Pour chaque échantillon, plusieurs images ont été systématiquement enregistrées à divers niveaux de grossissement, et des histogrammes illustrant la distribution des tailles ont été élaborés en mesurant manuellement un échantillon de 100 nanoparticules à l'aide du logiciel ImageJ.

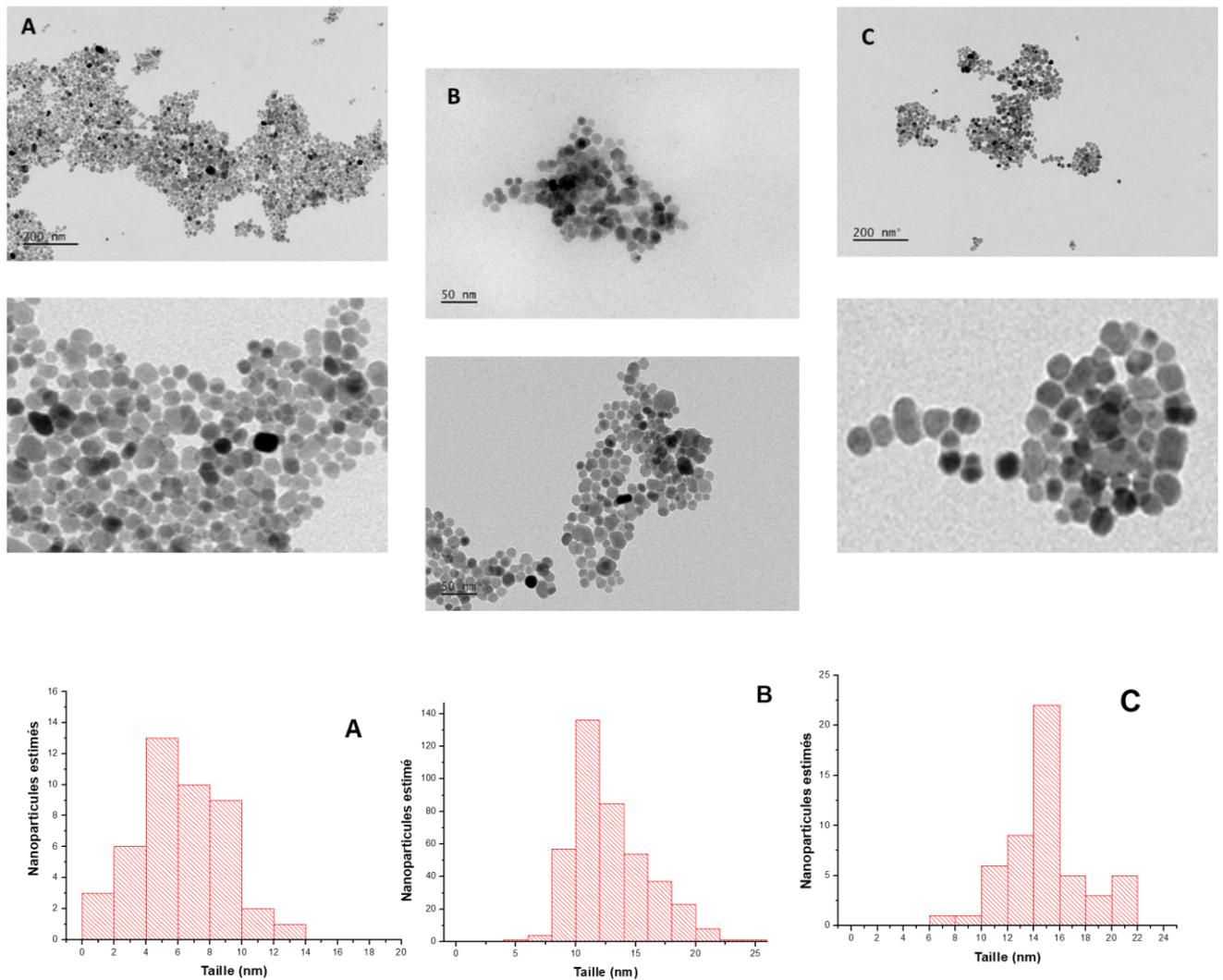


Figure 2.23: Images de microscopie électronique à transmission (MET) et histogrammes représentant la distribution en taille des nanoparticules de maghémite synthétisées avec différents polyols, (A) avec DEG, (B) avec TEG et (C) avec TREG.

Enfin, l'analyse par microscopie électronique à transmission (MET) et par diffraction des rayons X (DRX) indique des dimensions de nanoparticules similaires, comme le montre le Tableau 2.3. Cependant, les tailles obtenues par MET sont légèrement plus grandes que celles dérivées de la DRX. Cette variation s'explique par le fait que la MET mesure la taille globale des nanoparticules, y compris d'éventuelles couches superficielles amorphes qui ne contribuent pas aux motifs de diffraction des rayons X. En revanche, la méthode de Scherrer, appliquée dans l'analyse DRX, détermine la taille des domaines cristallins individuels à l'intérieur des nanoparticules.

La caractérisation du rayon hydrodynamique des nanoparticules, synthétisées et suspendues dans l'eau, a été effectuée en utilisant la diffusion dynamique de la lumière (DLS) via un appareil ZetaSizer (Nano ZS). Des suspensions fortement diluées de nanoparticules A, B et C

(0,1 mg/mL), toutes maintenues à un pH de 7,0, ont fait l'objet d'évaluations, comme le montre la Figure 2.16. Les mesures ont révélé diverses populations de diamètres hydrodynamiques, avec des moyennes de 190 nm, 45 nm et 400 nm pour les nanoparticules A, B et C respectivement.

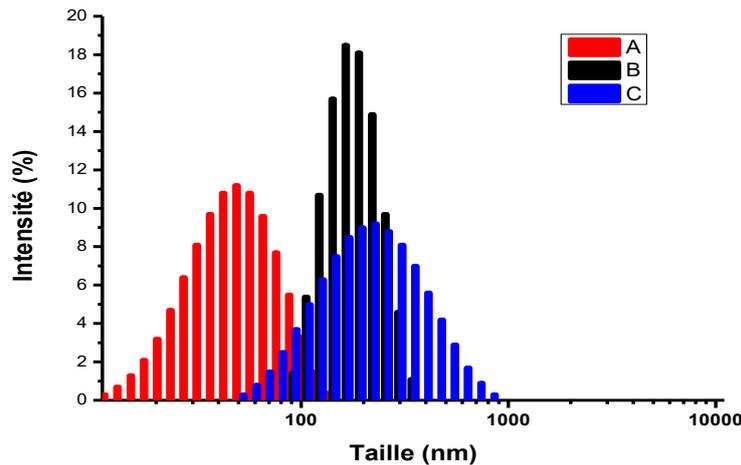


Figure 2.24: Distribution de la taille hydrodynamique pour les différentes nanoparticules synthétisées par voie polyol. Les résultats illustrent la répartition des tailles des nanoparticules en suspension, mesurée par des techniques de caractérisation en phase liquide, telles que la diffusion dynamique de la lumière (DLS).

Il est notable que ces diamètres hydrodynamiques sont nettement plus élevés que les diamètres moyens des nanoparticules, à savoir  $5 \pm 6$  nm,  $10 \pm 5$  nm et  $15 \pm 7$  nm, obtenus par microscopie électronique à transmission (MET) sur le même échantillon. Cela indique une agglomération rapide des particules en suspension, un phénomène également confirmé visuellement à pH neutre.

L'aggrégation observée des nanoparticules non enrobées à pH 7,0, un comportement documenté dans la littérature, est attribuée à l'absence de charge de surface [20]. Afin d'accroître la stabilité des nanoparticules en suspension à ce pH, une stratégie envisageable serait de fonctionnaliser leur surface, permettant ainsi d'atteindre une dispersion plus stable. Cette stratégie sera explorée plus en détail dans la section suivante de ce chapitre.

### 3. Fonctionnalisation des NPs et caractérisation

Les nanoparticules magnétiques d'oxyde de fer ont une propension à s'agglomérer lorsqu'elles sont en solution aqueuse avec un pH neutre. En raison d'une discontinuité cristalline, les

atomes de fer apparents à leur surface, qui portent des charges partielles, agissent en tant qu'acides de Lewis, établissant des liens avec des donateurs d'électrons. Par conséquent, les ions fer en surface s'associent avec les molécules d'eau dans le milieu aqueux [21], lesquelles se dissocient pour créer une couche d'hydroxyde sur les nanoparticules.

Selon le pH du milieu, les groupes hydroxyde  $-OH$  se transforment en groupes  $-OH_2^+$  ou  $-O^-$  par protonation ou déprotonation, respectivement. La surface des nanoparticules d'oxyde de fer pourrait ainsi être soit positive, négative, ou neutre en fonction du pH de l'environnement. Le point isoélectrique, qui est le pH où la surface des nanoparticules d'oxyde de fer est électriquement neutre en milieu aqueux, varie entre 6,8 et 7,4 [21][22]. Près de cette plage de pH, la charge superficielle des nanoparticules n'est plus suffisamment substantielle pour que les répulsions électrostatiques empêchent leur agrégation par les forces de Van der Waals.

Ainsi, les nanoparticules d'oxyde de fer perdent leur stabilité dans l'eau et forment des agrégats. Étant donné qu'un pH d'environ 7 est souvent requis pour maintenir la stabilité des nanoparticules dans diverses applications biologiques. La stratégie est de limiter leur agrégation en les fonctionnalisant avec des ligands organiques ou inorganiques, accroissant par la suite les répulsions entre les particules.

La fonctionnalisation de la surface des nanoparticules d'oxyde de fer magnétiques est généralement orientée vers deux objectifs majeurs : en premier lieu, assurer la stabilisation des nanoparticules pour éviter leur agrégation dans un environnement particulier, et en second lieu, les adapter pour une utilité dans une application précise.

La stabilisation des nanoparticules en solution implique généralement de créer des répulsions entre elles. Deux types principaux de répulsions peuvent être induits par la fonctionnalisation de surface des nanoparticules : les répulsions électrostatiques et stériques.

En attachant de petites molécules chargées telles que les carboxylates [23], les phosphonates [24] ou les sulfonates [25], ou en employant d'autres matières inorganiques comme la silice [26] ou l'or [27], les répulsions électrostatiques peuvent être induites. Les répulsions stériques peuvent être induites en greffant des polymères à la surface des nanoparticules soit par simple adsorption comme le dextran [28], le PVA [29] ou le chitosan [30]

Nous avons entrepris la fonctionnalisation des nanoparticules que nous avons synthétisées en utilisant trois molécules organiques différentes : l'acide (3-aminopropyl) phosphonique (@APPA), la dopamine (@Dopa) et le citrate (@Citrate) (voir chapitre 5). L'objectif était d'obtenir des nanoparticules stables et bien dispersées en solution tout en introduisant des fonctions carboxylates ou amines à leur surface, qui pourraient ensuite être accrochées à la capsid des virus via un couplage (EDC/NHS), un sujet qui sera développé dans le chapitre 3.

### 3.1. Analyse de la surface des NPs après fonctionnalisation.

La spectroscopie de photoélectrons X (XPS) constitue un outil crucial dans la caractérisation des nanoparticules d'oxyde de fer, notamment après leur fonctionnalisation avec diverses molécules, ici APPA, Dopa et Citrate. Les données XPS, post-fonctionnalisation, sur les spectres haute résolution du fer (Figure 2.17) révèlent des énergies de liaison spécifiques à 711.0 et 724.6 eV, qui sont attribuées respectivement aux niveaux d'énergie Fe 2p<sub>3/2</sub> et Fe 2p<sub>1/2</sub>. Cette observation est essentielle car elle procure un aperçu pertinent sur l'état d'oxydation du fer dans ces nanoparticules.

Dans ce contexte, même si les nanoparticules sont fonctionnalisées, une constance demeure dans la caractérisation des énergies de liaison du fer, ce qui indique que l'état d'oxydation du fer demeure inchangé même après la fonctionnalisation. Cette stabilité dans l'état d'oxydation du fer est cruciale dans l'optique d'applications spécifiques des nanoparticules, où un état d'oxydation constant est souvent nécessaire pour maintenir certaines propriétés magnétiques et réactivités chimiques.

La présence d'un pic satellite observé aux alentours de 719 eV est également d'une importance capitale et suscite un intérêt particulier dans cette étude. Ce pic satellite est un indicateur notable que la phase des nanoparticules est principalement constituée de maghémite, même après l'ajout des différentes molécules fonctionnalisantes. La persistance de ce pic satellite dans les spectres XPS des nanoparticules, qu'elles soient nues ou fonctionnalisées avec APPA, Dopa ou Citrate, confirme que le processus de fonctionnalisation n'a pas induit de modifications significatives dans la phase cristalline du matériau. On reste donc en présence de la maghémite, soulignant ainsi que la fonctionnalisation a été effectuée de manière à préserver l'intégrité structurale et la phase du matériau d'origine.

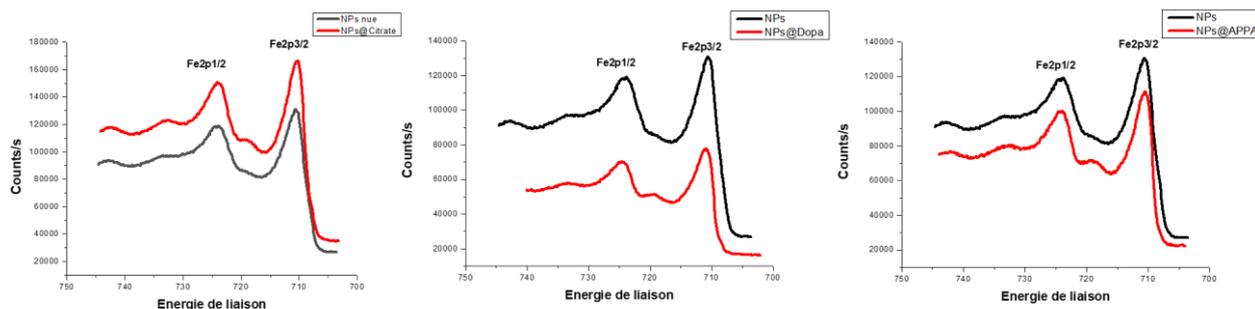


Figure 2.25: Spectres haute résolution XPS présentant le spectre de Fe2p pour les nanoparticules d'oxyde de fer de 10 nm fonctionnalisées avec du citrate, de la dopamine et de l'APPA (Acide 3-aminopropylphosphonique).

Pour les nanoparticules d'oxyde de fer magnétiques fonctionnalisées avec l'APPA (NPs@APPA), diverses observations ont été faites via les analyses spectroscopiques, comme illustré dans la Figure 2.18. La présence d'une énergie de liaison à 134 eV, spécifique au P2p, révèle la formation de liaisons phosphonates (Figure 2.18-b). Un examen du spectre haute résolution dans la région de l'azote 1s indique une énergie de liaison voisine de 400 eV, caractéristique d'une liaison C-NH<sub>2</sub> (Figure 2.18-c). Ces bandes n'ont pas été observées pour les NPs nues. En outre, dans la région C 1s, l'apparition de deux bandes distinctes à 284.96 et 286.40 eV suggère fortement la présence d'électrons dans des liaisons C-P et C-OH respectivement (Figure 2.18-d).

Dans la région de liaison O 1s, un large pic a été observé et peut être déconvolué en trois pics à 530, 531 et 532,08 eV (Figure 2.18-e) correspondant à O-Fe dans la structure de Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, O-P dans les phosphonates [31] et O-C dans le groupe carboxylique [32].

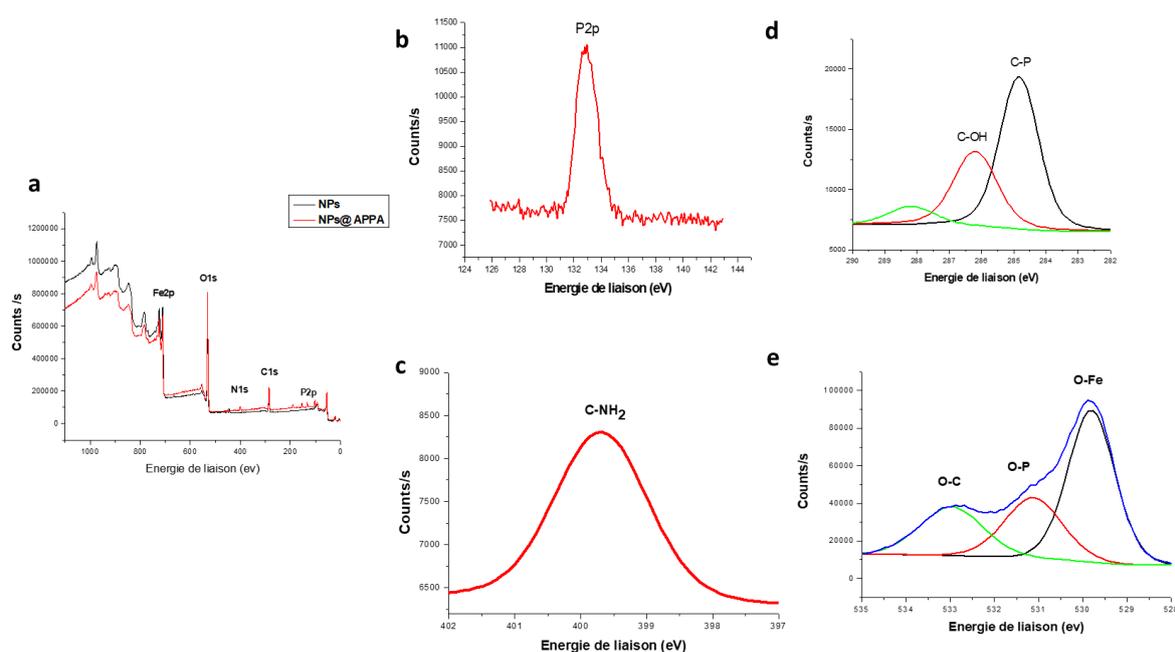


Figure 2.26 : (a) Spectre XPS global des nanoparticules d'oxyde de fer de 10 nm fonctionnalisées avec APPA (Acide 3-aminopropylphosphonique) et spectres de haute résolution pour (b) le phosphore, (c) l'azote, (d) le carbone et (e) l'oxygène.

Par ailleurs, l'augmentation des ratios C/Fe et O/Fe (comme présenté dans le Tableau 2.4) dans les NPs fonctionnalisées par rapport aux NPs nues indique non seulement une augmentation des molécules organiques à la surface, mais valide également la réussite de la fonctionnalisation par l'APPA.

<i>% Atomique</i>	<i>Energie de liaison (ev)</i>	<i>NPs nues de 10 nm</i>	<i>NPs@APPA</i>
<i>C1s</i>	<i>284.96</i>	8,88	12.23
<i>C1sA</i>	<i>286.40</i>	9,12	6.96
<i>C1sB</i>	<i>288.51</i>	3,1	1.89
<i>C1s totale</i>		<i>21.1</i>	<i>21.08</i>
<i>Fe2p</i>	<i>710.72</i>	26,74	21.92
<i>O1s</i>	<i>530,29</i>	52,15	51.58
<i>P2p</i>	<i>132.86</i>	-	2.62
<i>N1s</i>	<i>399.69</i>	-	1.43
<i>N1sA</i>	<i>401.34</i>	-	1.39
<i>C/Fe</i>		<i>0.78</i>	<i>0.96</i>
<i>O/Fe</i>		<i>1.95</i>	<i>2.35</i>

Tableau 2.7: Pourcentage atomique des éléments individuels dans les nanoparticules d'oxyde de fer avant (Nanoparticules nues) et après la fonctionnalisation avec APPA (Acide 3-aminopropylphosphonique). Les données illustrent les variations de la composition chimique résultant de la fonctionnalisation avec APPA.

Les analyses XPS, illustrées dans la Figure 2.19-a, montrent une complexité chimique à la surface des nanoparticules de maghémite après la fonctionnalisation avec la dopamine. Cette molécule, dotée d'un noyau benzénique et de groupes fonctionnels tels que les amines et les hydroxyles. En focalisant sur des régions spectrales clés, à savoir C 1s, O 1s et N 1s, nous déterminer l'existence d'une liaison entre la dopamine et les nanoparticules.

La déconvolution de la bande d'oxygène O1s montre deux types d'interactions de l'oxygène : des liaisons avec le fer, confirmant ainsi la structure de l'oxyde de fer à 530,28 eV, et des liaisons O-C établies à 531,86 eV (Figure 2.19-b).

Dans la région C1s, la déconvolution représentée en Figure 2.19-c met en évidence divers pics caractéristiques des états de carbone spécifiques. Le pic à 285.06 eV est représentatif des

carbones  $sp^2$  présents dans les cycles aromatiques, comme ceux de la structure de la dopamine. Le pic C1sA à 286.46 eV correspond à des carbones en liaison avec de l'oxygène (C-O), typiques des structures éther ou des alcools secondaires, qui peuvent être attribués aux groupes fonctionnels de la dopamine ou aux résidus de diéthylène glycol, le solvant utilisé lors de la synthèse. Le pic C1sB à 288.62 eV suggère la présence de carbones en environnement C-O-C, potentiellement liés aux composants de la dopamine. Finalement, le pic C1sC à 291.31 eV met en évidence les liaisons carbones doubles (C=C), confirmant la présence de structures aromatiques inhérentes à la dopamine.

L'analyse de la région N1s dans la Figure 2.19-d montre un pic vers 400 eV, indiquant la présence de l'azote caractéristique de la dopamine. Cela implique que la dopamine est greffée sur les NPs par ses groupes catéchols, qui forment des liaisons chélatantes avec les ions de fer de la surface des NPs, créant ainsi une interface stable et fonctionnalisée.

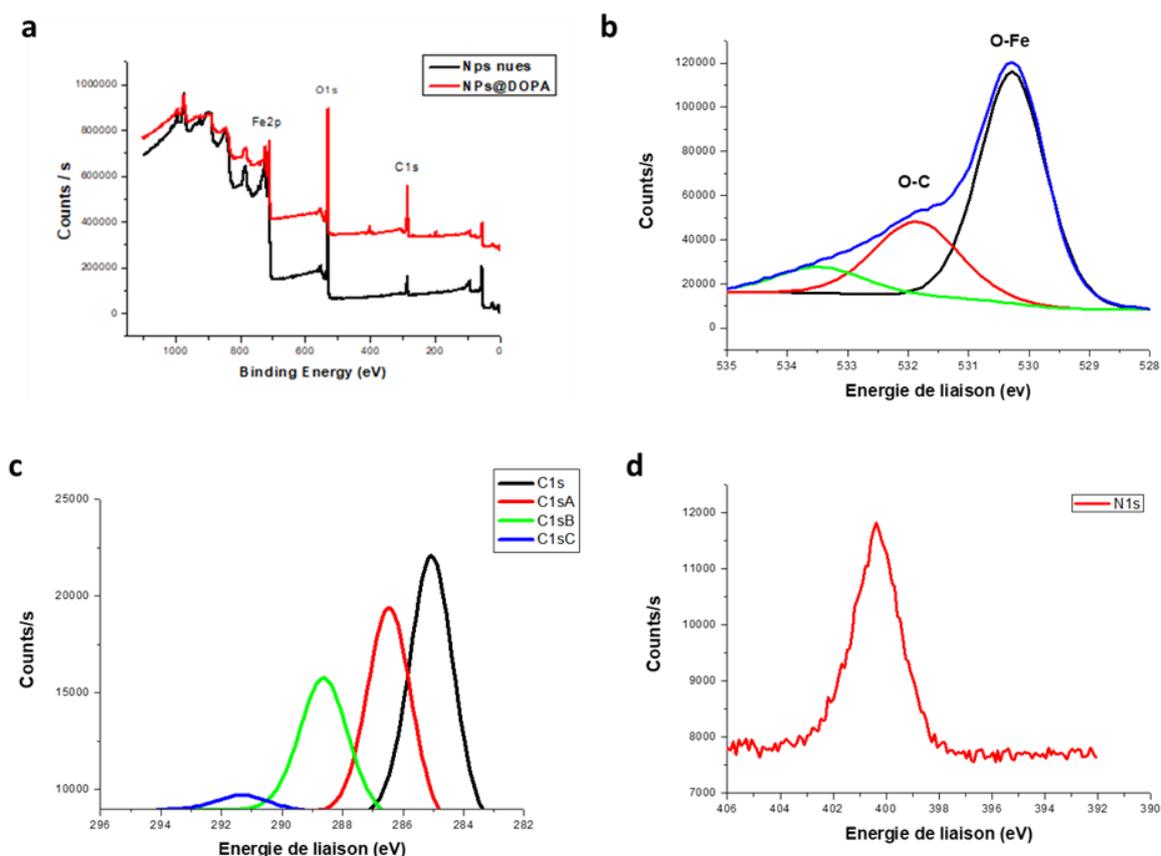


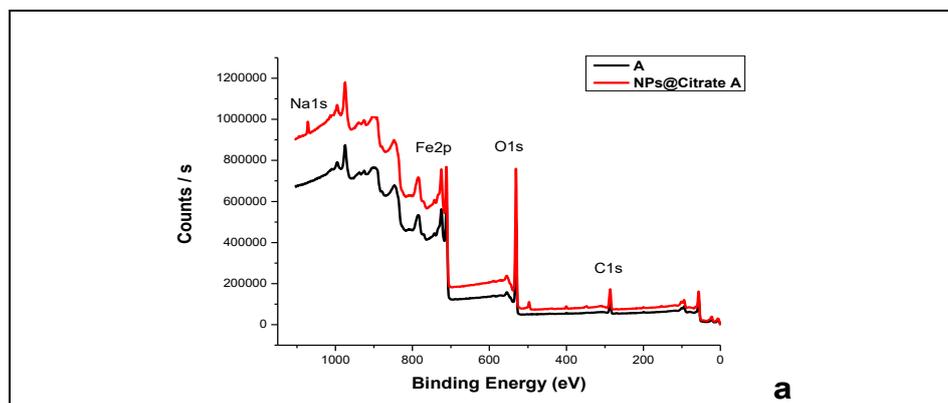
Figure 2.27: (a) Spectre XPS global des nanoparticules d'oxyde de fer de 10 nm fonctionnalisées avec Dopamine. Comparaison des éléments chimiques caractéristiques entre les nanoparticules nues et fonctionnalisées, et spectres de haute résolution pour (b) l'oxygène, (c) le carbone et (d) l'azote.

Tout comme avec la fonctionnalisation par l'APPA, une augmentation des ratios C/Fe et O/Fe est observée (Tableau 2.5), indiquant une présence accrue de la dopamine à la surface des nanoparticules. Cette augmentation notable des éléments organiques est une preuve tangible de la fonctionnalisation, mettant en lumière la surface des nanoparticules grâce à l'apport organique de la dopamine.

<i>% Atomique</i>	<i>Energie de liaison (ev)</i>	<i>NPs nues de 10 nm</i>	<i>NPs@DOPA</i>
<i>C1s</i>	<i>284.96</i>	8,88	12,2
<i>C1Sa</i>	<i>286.40</i>	9,12	9,48
<i>C1Sb</i>	<i>288.51</i>	3,1	6,68
<i>C1Sc</i>	<i>291,31</i>	-	0,83
<i>C1s totale</i>		<b>21.1</b>	<b>29.14</b>
<i>Fe2p</i>	<i>710.72</i>	26,74	22,3
<i>O1s</i>	530,29	52,15	45,74
<i>N1s</i>	400,32	-	2,78
<i>C/Fe</i>		0.79	1.30
<i>O/Fe</i>		1.95	2.05

Tableau 2.8: Pourcentage atomique des éléments individuels dans les nanoparticules d'oxyde de fer avant (Nanoparticules nues) et après la fonctionnalisation avec Dopamine. Le tableau présente les variations de la composition chimique résultant de la fonctionnalisation avec Dopamine.

L'analyse par XPS de nos échantillons a révélé des changements chimiques substantiels à la suite de la fonctionnalisation avec le citrate (NPs@Citrate). Les éléments principaux identifiés par XPS dans notre étude sont le carbone, le fer, et l'oxygène, dont les spectres et pics pour les NPs@Citrate de tailles diverses sont illustrés dans les Figures 2.20-a, b, et c.



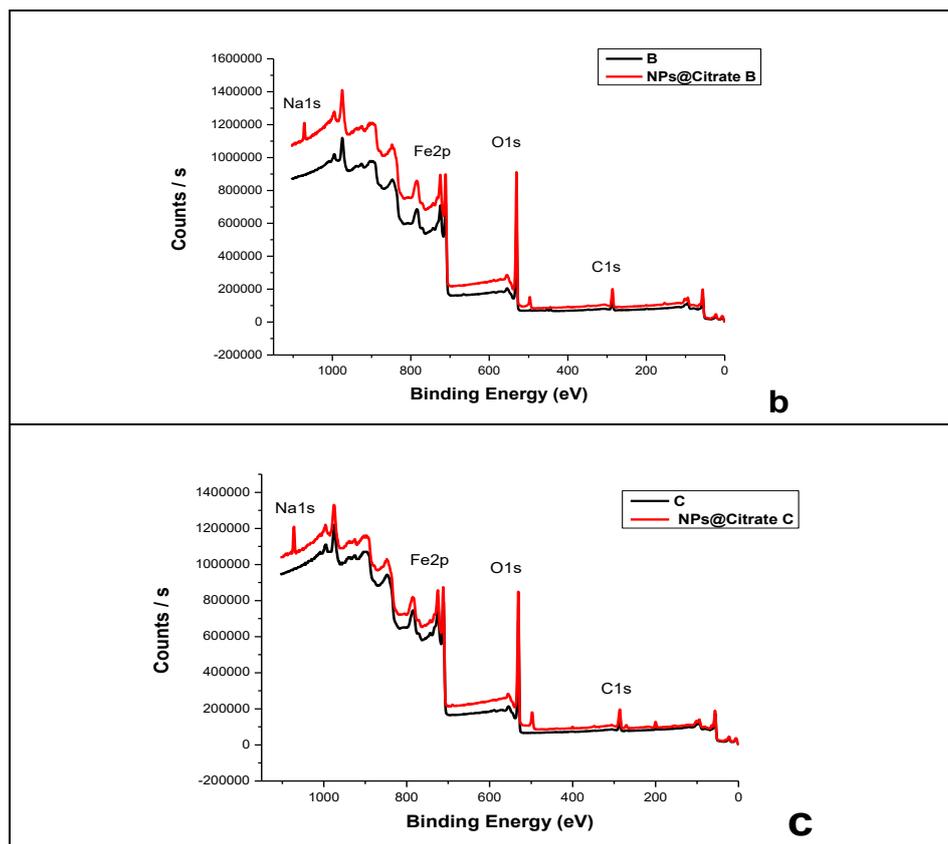


Figure 2.28: Vue d'ensemble des spectres XPS de nanoparticules de diverses tailles avant et après fonctionnalisation avec citrate.

Les échantillons A, B, et C, de tailles 5 nm, 10 nm et 15 nm respectivement, ont montré divers degrés de modification dans la composition de carbone après la fonctionnalisation. Cette observation peut être vue dans les spectres XPS de haute résolution de C1s, illustrés dans la Figure 2.21 et détaillés dans le Tableau 2.6.

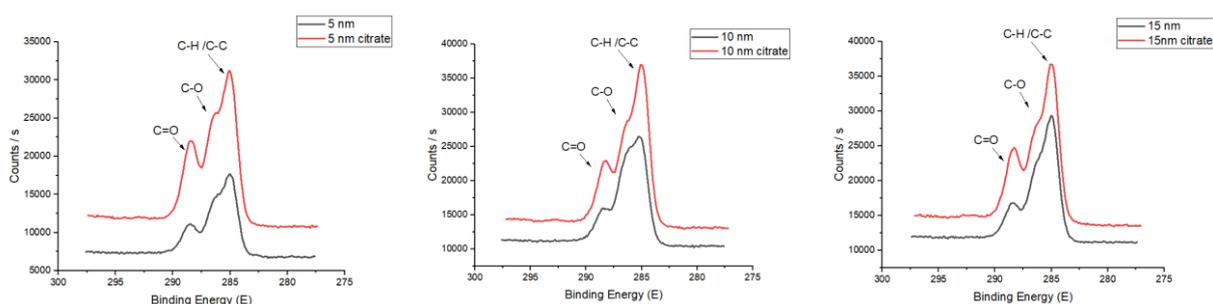


Figure 2.29: Analyses XPS haute résolution de l'élément carbone C1s des nanoparticules de maghémite de trois tailles différentes (5 nm, 10 nm, et 15 nm) avant et après fonctionnalisation par citrate

Un point d'intérêt particulier est le changement dans les pourcentages atomiques de carbone après la fonctionnalisation à des énergies de liaison spécifiques (284.96 eV, 286.40 eV, et 288.51 eV). Les modifications à 284.96 eV, passant de 9.70% à 10.88%, de 8.88% à 11.26%, et de 10.56% à 11.27% pour les NPs de 5 nm, 10 nm, et 15 nm respectivement, peuvent

signaler une incorporation substantielle de carbone au cours de la fonctionnalisation. L'interaction du citrate avec les nanoparticules pourrait varier en fonction de leur taille en raison des différences dans l'énergie de surface et la densité des sites de liaison. Les NPs plus petites, comme celles de 5 nm, possèdent généralement une énergie de surface plus élevée, ce qui pourrait expliquer une modification plus prononcée de la composition de surface comparativement à celles de tailles plus grandes. Les interactions au niveau des énergies de liaison de 286.40 eV et 288.51 eV, en revanche, sont probablement révélatrices des différentes configurations et environnements électroniques des atomes de carbone dans les molécules de citrate attachées.

En termes plus simples, le rapport C/Fe est une mesure relative de la quantité de carbone par rapport au fer dans nos échantillons. Des augmentations de ce rapport, de 0.674 à 1.04, de 0.78 à 0.96, et de 0.72 à 0.99 pour les échantillons A, B et C respectivement, corroborent l'idée que les groupes fonctionnels du citrate ont été intégrés à la surface des nanoparticules. Cela introduit effectivement du carbone sur les nanoparticules, modifiant ainsi leur environnement chimique de surface.

D'autre part, le rapport O/Fe, reflétant la proportion relative d'oxygène et de fer, a également augmenté de 1.69 à 2.27, de 1.92 à 2.27, et de 1.83 à 2.16 respectivement après la fonctionnalisation pour les échantillons A, B et C. Cette élévation peut être interprétée comme indicatrice d'une augmentation de l'oxygène chimiquement lié à la surface des particules, ce qui suggère la formation de nouveaux groupes fonctionnels oxygénés sur la surface des nanoparticules et la possibilité de réactions chimiques spécifiques se produisant lors de la fonctionnalisation.

Ainsi, les augmentations dans les rapports C/Fe et O/Fe constituent des indices robustes d'une modification chimique de la surface des nanoparticules, validant l'efficacité de la fonctionnalisation par le citrate.

Atome	Energie de liaison (ev)	Echantillon					
		A (5nm)		B (10 nm)		C (15 nm)	
		Avant fonc	Après fonc	Avant fonc	Après fonc	Avant fonc	Après fonc
<i>C1s</i>	284.96	9.70	10.88	8.88	11.26	10.56	11.27
<i>C1sA</i>	286.40	6.63	6.67	9.12	5.73	6.17	5.70
<i>C1sB</i>	288.51	4.04	6.22	3.10	4.84	3.56	5.57
<b><i>C1s totale</i></b>		20.37	23.77	21.1	21.83	20.29	22.54
<i>Fe2p</i>	710.72	30.22	22.9	26.74	22.62	28.12	22.76
<i>O1s</i>	530.1	51.14	52.15	51.56	51.56	51.59	49.31
<i>Na1s</i>	1071.55	0	2.18	0	4	0	5.40
<b><i>C/Fe</i></b>		<b>0.674</b>	<b>1.04</b>	<b>0.78</b>	<b>0.96</b>	<b>0.72</b>	<b>0.99</b>
<b><i>O/Fe</i></b>		<b>1.69</b>	<b>2.27</b>	<b>1.92</b>	<b>2.27</b>	<b>1.83</b>	<b>2.16</b>

Tableau 2.9: Pourcentage atomique des éléments C1s, C1s A, C1s B, Fe2p et Na1s dans les différentes tailles de nanoparticules d'oxyde de fer avant (Nanoparticules nues) et après la fonctionnalisation avec citrate. Le tableau présente les variations de la composition chimique résultant de la fonctionnalisation pour chaque taille de nanoparticules.

En conclusion, l'augmentation observé des rapports carbone/fer et oxygène/fer illustre des modifications substantielles dans l'interaction des ligands avec les nanoparticules d'oxyde de fer lors de la fonctionnalisation. Cela révèle l'impact des réactions chimiques et des changements superficiels, validant la modification de la chimie de surface des nanoparticules par le processus de fonctionnalisation avec le citrate.

### 3.2. Taille des NPs fonctionnalisées.

#### 3.2.1. NPs@APPA et NPs@Dopa

La Figure 2.22 illustre les résultats obtenus par microscopie électronique à balayage pour deux types de nanoparticules : celles de maghémite de 10 nm enrobées avec l'acide aminopropylphosphonique (NPs@APPA) et avec la dopamine (NPs@Dopa). Les NPs@APPA, présentées en Figure 2.22-a, révèlent des tailles variant entre 30 et 256 nm et exposent une morphologie non uniforme. D'autre part, les NPs@Dopa, illustrées en Figure 2.22-b, affichent des dimensions oscillant entre 60 et 200 nm, présentant également une répartition de taille inhomogène et une tendance à l'agrégation.

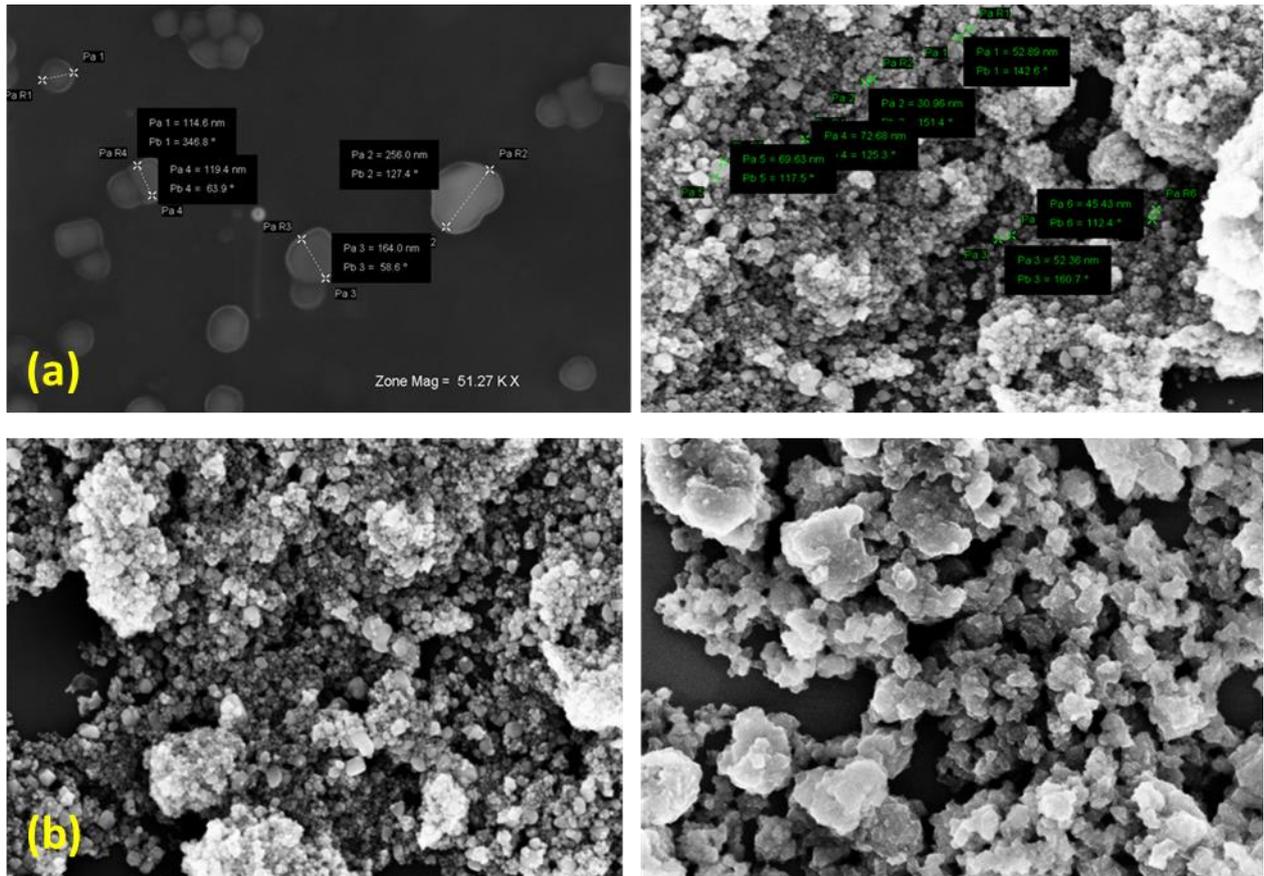


Figure 2.30: Images de Microscopie Électronique à Balayage (MEB) représentant les nanoparticules d'oxyde de fer fonctionnalisées avec APPA (a) et avec dopamine (b). Les images illustrent la formation de gros agrégats suite à la fonctionnalisation avec dopamine et APPA.

L'analyse par DLS apporte des éclaircissements quant à la polydispersité des NPs@APPA. Comme illustré dans la Figure 2.23, l'examen détaille la présence de deux populations de particules distinctes, ayant des tailles approximatives de 200 nm et 2000 nm respectivement. Malgré la fonctionnalisation par APPA, les NPs ne manifestent aucune dispersion notable par rapport à leur état initial non-fonctionnalisé, se traduisant par une conservation du même rayon hydrodynamique observé avant le processus de fonctionnalisation.

En plus, la présence d'une population de taille d'environ 2000 nm signale la formation d'agrégats incompatible avec une utilisation dans des milieux biologiques. Les agrégats de cette taille peuvent, en effet, poser des défis significatifs en termes de biocompatibilité et de distribution dans les systèmes biologiques, rendant ainsi leur utilisation problématique ou même non viable dans de tels contextes.

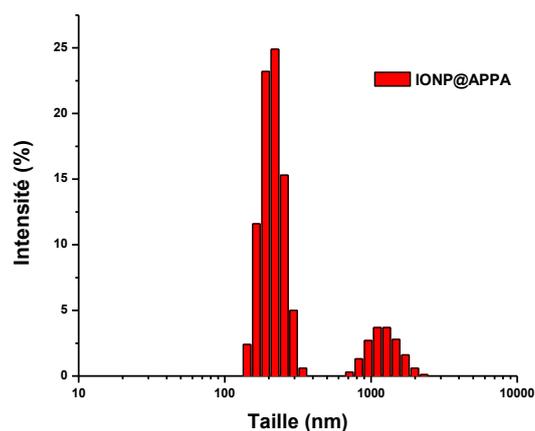


Figure 2.31: Répartition de la taille hydrodynamique des nanoparticules de 10 nm en suspension fonctionnalisées avec APPA.

Une dispersion réussie des particules NPs@Dopa dans l'eau sous forme de colloïdes a été réalisée à la suite de leur fonctionnalisation avec la dopamine, un processus analysé en utilisant la DLS (Figure 2.24). Les données obtenues mettent en évidence que cette fonctionnalisation a conduit à une réduction notable de la taille hydrodynamique des nanoparticules, passant de 245 nm à une taille considérablement plus réduite de 45 nm. Ce changement signifie une modification appréciable de la surface des nanoparticules synthétisées.

Cependant, malgré ce succès dans la réduction de la taille, les NPs@Dopa présentent une dimension qui demeure plus importante que prévu, posant ainsi un obstacle tangible pour notre objectif

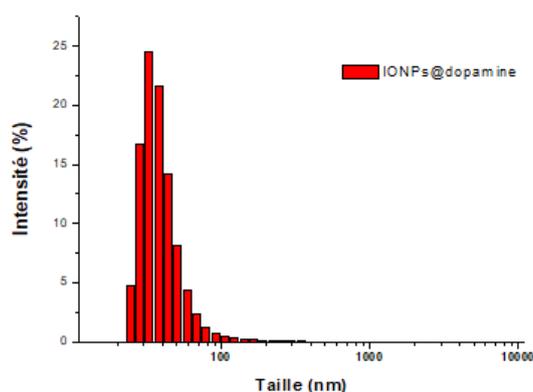


Figure 2.32: Distribution de taille des nanoparticules de 10 nm fonctionnalisées avec DOPA en suspension.

Les tests sur les nanoparticules, avec deux différents types de recouvrement, dopamine (@Dopa) et acide aminopropylphosphonique (@APPA), nous ont donné des résultats mixtes.

Le but était de contrôler la taille des nanoparticules et d'empêcher qu'elles ne s'agglomèrent, mais cela n'a pas vraiment fonctionné comme nous l'espérions. En utilisant APPA, nous avons obtenu de gros agrégats de particules, ce qui n'est pas idéal. D'un autre côté, avec la Dopa, les choses se sont un peu mieux passées, mais ce n'était pas parfait non plus.

Dans les deux cas, notre idée d'utiliser ces nanoparticules à greffer sur la surface du virus, qui est assez petit avec une taille de 28 nm, ne va pas fonctionner à cause de ces problèmes de taille et d'agglomération. Les particules ne sont pas de taille constante et s'assemblent en gros paquets, ce qui pourrait être dû à la méthode de fabrication ou au manque d'efficacité du recouvrement. Puisque nous ne pouvons pas obtenir les particules de la taille et forme que nous voulons, nous avons décidé de ne pas les utiliser pour la suite de notre projet.

### Stabilité

L'analyse et la caractérisation des interfaces après la fonctionnalisation avec des groupes fonctionnels sont d'une importance capitale dans divers domaines scientifiques et technologiques. Une métrique clé dans ce processus est le potentiel zêta, une mesure électrocinétique fondamentale pour comprendre les propriétés électriques et la stabilité des interfaces. Il donne une indication de la charge électrique présente à la surface d'une particule ou interface, facilitant ainsi l'évaluation des interactions électrostatiques, de la stabilité colloïdale, et de la chimie de surface. En illustrant ceci, l'analyse du potentiel zêta après fonctionnalisation avec un groupe fonctionnel amine spécifique, la Dopamine, a révélé une valeur de +35 mV pour les NPs@Dopa de 10 nm, suggérant une stabilité modérée, comme le montre la Figure 2.25.

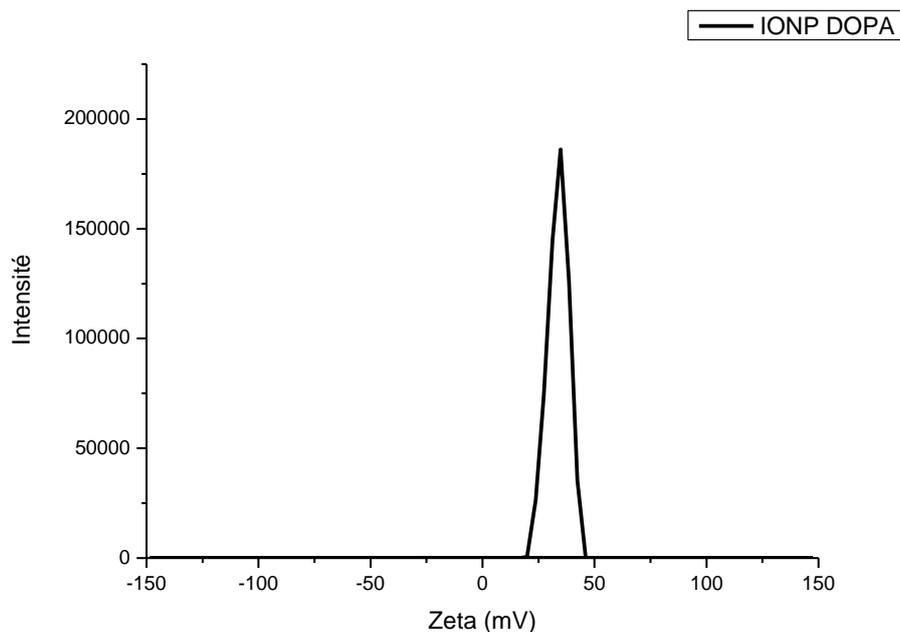


Figure 2.33: Le graphique de distribution du potentiel zêta montrant la valeur positive du potentiel zêta pour les nanoparticules d'oxyde de fer recouvertes de dopamine dans de l'eau distillée.

Cela est cohérent avec les études antérieures d'O'Brien [33] et Hanaor et al. [34], qui ont déterminé que les colloïdes ayant des potentiels zêta faibles tendent à former des agrégats, alors que ceux avec des potentiels zêta élevés démontrent une stabilité électrique, tel qu'illustré dans le Tableau 2.7.

Potentiel zêta [mV]	Comportement de stabilité du colloïde
de 0 à $\pm 5$	Coagulation ou floculation rapide
de $\pm 10$ à $\pm 20$	Début d'instabilité
de $\pm 20$ à $\pm 40$	Stabilité modérée
de $\pm 40$ à $\pm 60$	Excellente stabilité

Tableau 2.10: Les comportements de stabilité du colloïde en fonction des valeurs de potentiel zêta mesuré d'après Hanaor et al.

### 3.2.2. NPs@Citrate

Les images obtenues par microscopie électronique à transmission (MET) des trois échantillons de nanoparticules, désignés NPs@Citrate A, B et C, révèlent que ces dernières manifestent une faible hétérogénéité tant en termes de forme que de taille. Plus précisément, elles exhibent une morphologie approximativement sphérique et une taille ne dépassant pas les 20 nm. L'analyse des dimensions des NPs@Citrate a été réalisée en utilisant le logiciel ImageJ, révélant des tailles moyennes de 7.0 nm, 12.0 nm et 15.0 nm pour les échantillons A, B et C respectivement.

Quant aux mesures granulométriques des NPs@Citrate, présentées dans la Figure 2.26, elles indiquent des tailles maximales de nanoparticules de 10 nm, 15 nm et 20 nm pour les échantillons A, B et C respectivement, tout en soulignant la présence de plusieurs populations de nanoparticules avec des distributions de taille assez restreintes. Cela met en évidence l'efficacité de la modification de surface avec le citrate pour prévenir l'agrégation et préserver la structure initiale des nanoparticules, en partie grâce à la répulsion entre les particules induites par les groupes citrates. Ces nanoparticules semblent ainsi pertinentes pour être greffées sur les capsides de virus. En conséquence, ces NPs@Citrate ont été intégralement caractérisées par diverses techniques disponibles au laboratoire.

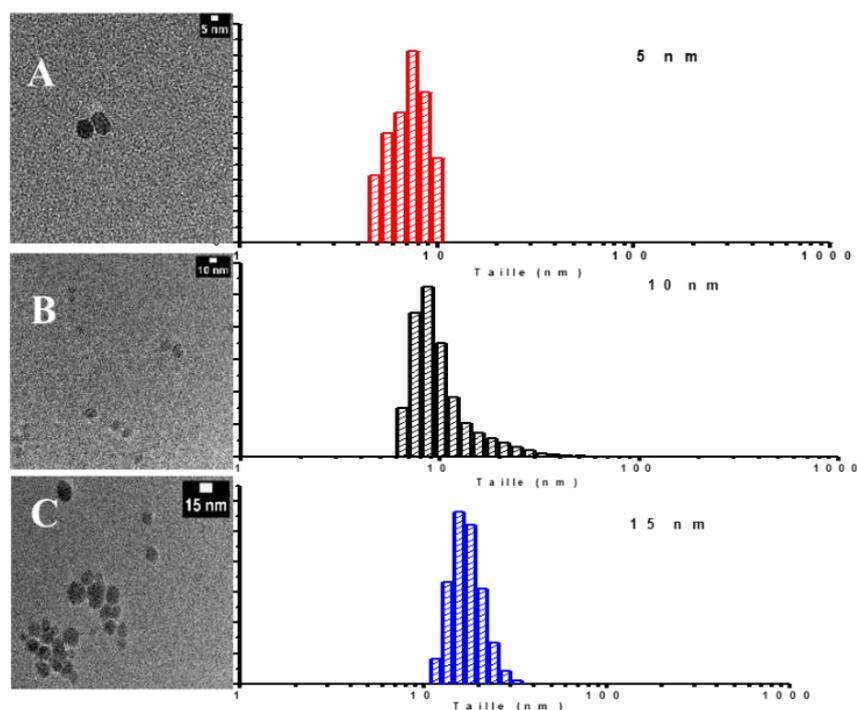


Figure 2.34: Visualisation MET et répartition des tailles hydrodynamiques des nanoparticules fonctionnalisées avec citrate par voie polyol.

### 3.3. Caractérisation des NPs@Citrate

#### 3.3.1. Stabilité.

Comme démontré dans la section précédente via la spectroscopie de photoélectrons X (XPS), les NPs ont été fonctionnalisées efficacement avec du citrate. Cette fonctionnalisation a été également validée par DLS, où nous avons observé des colloïdes présentant les diamètres hydrodynamiques souhaités. La stabilité colloïdale est cruciale pour l'utilisation des nanoparticules dans des applications biomédicales, rendant impératif l'obtention de colloïdes magnétiques stables.

Le recouvrement des nanoparticules avec des groupes fonctionnels carboxylate, comme le citrate, favorise leur suspension dans l'eau, en raison des interactions électrostatiques répulsives entre particules. Cela est illustré à la Figure 2.27, où les NPs@Citrate forment une solution homogène, à la différence des NPs nues qui précipitent.



Figure 2.35: Visualisation en suspension des nanoparticules synthétisées par voie polyol, avant et après la fonctionnalisation avec l'acide citrique.

Par ailleurs, les mesures de potentiel zêta pour les nanoparticules de maghémite enveloppées de citrate affichent une valeur de -60 mV pour les NPs@Citrate A, B et C (de tailles 5 nm, 10 nm et 15 nm, respectivement), traduisant une stabilité élevée, comme discuté auparavant (Figure 2.28).

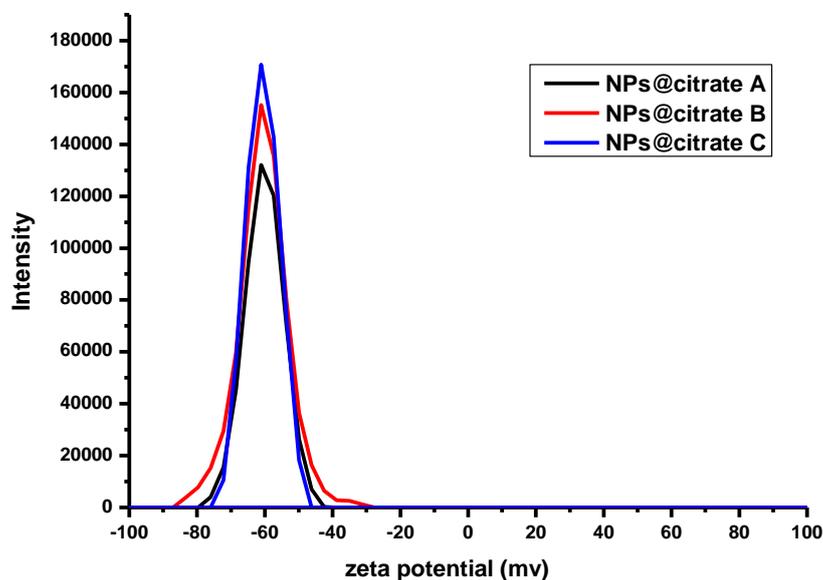


Figure 2.36: Mesure du potentiel Zeta sur des nanoparticules d'oxyde de fer fonctionnalisées avec citrate de différentes tailles.

### 3.3.2. Structure cristalline

La figure 2.29 présente les diffractogrammes des nanoparticules d'oxyde de fer de 5 nm, 10 nm et 15 nm avant et après la fonctionnalisation (A, B, C, NPs@Citrate A, NPs@Citrate B et NPs@Citrate C respectivement).

Pour analyser la modification structurale des particules après la fonctionnalisation, les paramètres de maille des nanoparticules ont été calculés en utilisant la relation de Bragg pour estimer la distance interplanaire au sein de la structure cristallite (Éq 3):

$$2d_{hkl} \cdot \sin\theta = n \lambda \quad (1) \quad (\text{Éq 3})$$

Dans laquelle  $n$  est l'ordre de diffraction,  $\lambda$  la longueur d'onde du rayonnement ( $\lambda_{\text{Co}} = 0.17890$  nm),  $\theta$  l'angle d'incidence du faisceau et  $d$  la distance inter-réticulaire entre deux plans d'une même famille (hkl), qui est exprimé par (Éq. 4):

$$\frac{1}{d_{hkl}^2} = \frac{h^2 + k^2 + l^2}{a^2} \quad (\text{Éq. 4})$$

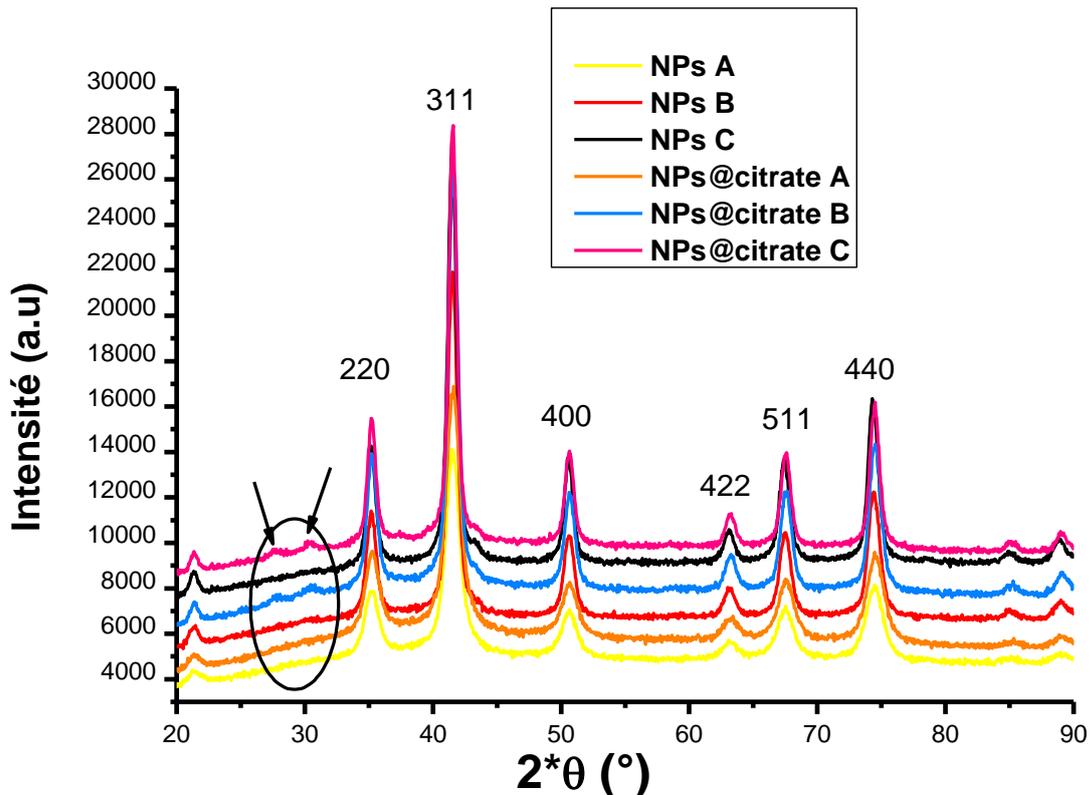


Figure 2.37: Spectres de diffraction des rayons X des nanoparticules d'oxyde de fer sans et avec fonctionnalisation de A, B et C, ayant respectivement des tailles de 5 nm, 10 nm et 15 nm.

Suite à la fonctionnalisation, où des molécules organiques sont attachées à la surface des nanoparticules, une modification notable dans les diffractogrammes est observée, notamment une augmentation de l'intensité des pics à 27° et 31°. Cela indique que l'acide citrique se fixe sur des plans cristallographiques spécifiques, influençant principalement les plans 203, 106, 210, 116, et 213. Ces plans, qui correspondent à la maghémite, semblent être significativement impactés par la fonctionnalisation.

	2 $\Theta$	21,38	35,26	41,58	50,68	63,24	67,57
NPs@Citrate A	d (nm)	0,482	0,295	0,252	0,209	0,171	0,161
	(hkl)	(111)	(220)	(311)	(400)	(422)	(511)
	a <sub>exp</sub>	0,835	0,835	0,836	0,836	0,836	0,836
NPs@Citrate B	d (nm)	0,483	0,296	0,252	0,209	0,171	0,161
	(hkl)	(111)	(220)	(311)	(400)	(422)	(511)
	a <sub>exp</sub>	0,837	0,837	0,836	0,836	0,836	0,836
NPs@Citrate C	d (nm)	0,481	0,295	0,252	0,210	0,171	0,161
	(hkl)	(111)	(220)	(311)	(400)	(422)	(511)
	a <sub>exp</sub>	0,833	0,835	0,835	0,840	0,836	0,835

Tableau 2.11: Tableau des paramètres de maille calculés pour les nanoparticules d'oxyde de fer fonctionnalisées avec citrate, en mesurant  $d_{hkl}$  pour tous les plans diffractants, selon différentes tailles.

En considérant que les échantillons sont cubiques à faces centrées, les valeurs des paramètres de maille moyen calculées pour les échantillons NPs@Citrate A, B et C sont respectivement de  $0,8357 \pm 0,0003$  nm,  $0,8364 \pm 0,0004$  nm et  $0,836 \pm 0,002$  nm. La variation des paramètres de maille relatif des nanoparticules synthétisées par rapport aux paramètres de maille théorique ( $a_{théo} = 0,837$  nm) a été calculée à partir de l'équation (Éq. 4) :

$$\frac{a_{moyen} - a_{théo}}{a_{théo}} * 100 \quad (\text{Éq. 4})$$

La variation des paramètres de maille révèle une diminution d'environ 0.44 %, 0.36 % et 0.44 % respectivement, indiquant que les plans cristallographiques sont modifiés par la liaison avec le citrate, indépendamment de la taille des nanoparticules. On suppose que la contraction observée est due à la liaison Fe-citrate dans les plans mentionnés. Le citrate semble ainsi inhiber la croissance selon ces plans et modifier les structures cristallines.

L'analyse par DRX et par MET révèle que, la fonctionnalisation avec le citrate modifie la structure cristallographique des nanoparticules d'oxyde de fer, elle ne semble pas affecter leur taille moyenne ni la distribution de taille cristalline. Cela signifie que, le citrate influence de manière appréciable la structure cristalline, permet de maintenir la stabilité dimensionnelle des nanoparticules.

### 3.3.3. Spectroscopie Infrarouge à transformée de Fourier FT-IR :

Pour valider la fonctionnalisation des nanoparticules par citrate et identifier les bandes représentatives des fonctions chimiques du citrate, une analyse par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR) a été effectuée. La Figure 2.30 présente les spectres FTIR des NPs nues de 10 nm synthétisées, du citrate pur, et des NPs@citrate.

Dans le cas des NPs nues, plusieurs caractéristiques spectrales ont été identifiées : une bande à  $585\text{ cm}^{-1}$ , attribuable à la vibration d'étirement Fe-O en phase cristalline de maghémite ; des bandes entre  $1000\text{ cm}^{-1}$  et  $1100\text{ cm}^{-1}$ , indiquant la présence de groupes polyol liés à la surface des NPs via des vibrations d'élongation C-O-C ; et une bande à  $1381\text{ cm}^{-1}$ , révélatrice des vibrations d'étirement C-O des résidus acétates, persistants malgré les étapes de lavage. En outre, la bande à  $1627\text{ cm}^{-1}$  pourrait refléter soit des vibrations de l'eau, soit des vibrations C=O de résidus d'acétate, en tenant compte du recours à l'acétate de fer en tant que précurseur dans la synthèse. La bande proche de  $3400\text{ cm}^{-1}$  est, quant à elle, associée aux vibrations d'étirement O-H, soit des groupes hydroxyle de surface ou d'eau adsorbée ou de polyols.

Concernant le citrate pur, ses principales bandes d'absorption FTIR à  $1300\text{ cm}^{-1}$  et  $1585\text{ cm}^{-1}$  sont attribuées respectivement aux élongations symétriques et asymétriques des groupements carboxylates. Les vibrations O-H des fonctions hydroxyles sont également manifestes dans la plage de  $3000$  à  $3500\text{ cm}^{-1}$ .

À la suite de la fonctionnalisation avec le citrate, une intensification de la bande à  $585\text{ cm}^{-1}$  est observée, suggérant un changement dans l'environnement chimique de la surface, lié probablement à la liaison du citrate. Des bandes à  $1560\text{ cm}^{-1}$  et  $1390\text{ cm}^{-1}$ , imputables aux vibrations des groupes carboxylate dans le citrate, confirment l'ancrage moléculaire. Plus précisément, la bande à  $1560\text{ cm}^{-1}$  est associée à la vibration de déformation symétrique, et celle à  $1390\text{ cm}^{-1}$  à la vibration de déformation asymétrique des groupes carboxylate [35] [36]. Enfin, le déplacement de la bande d'étirement O-H de  $3400\text{ cm}^{-1}$  à  $3416\text{ cm}^{-1}$  lors de la fonctionnalisation indique une modification des interactions chimiques au niveau des groupes hydroxyle en surface.

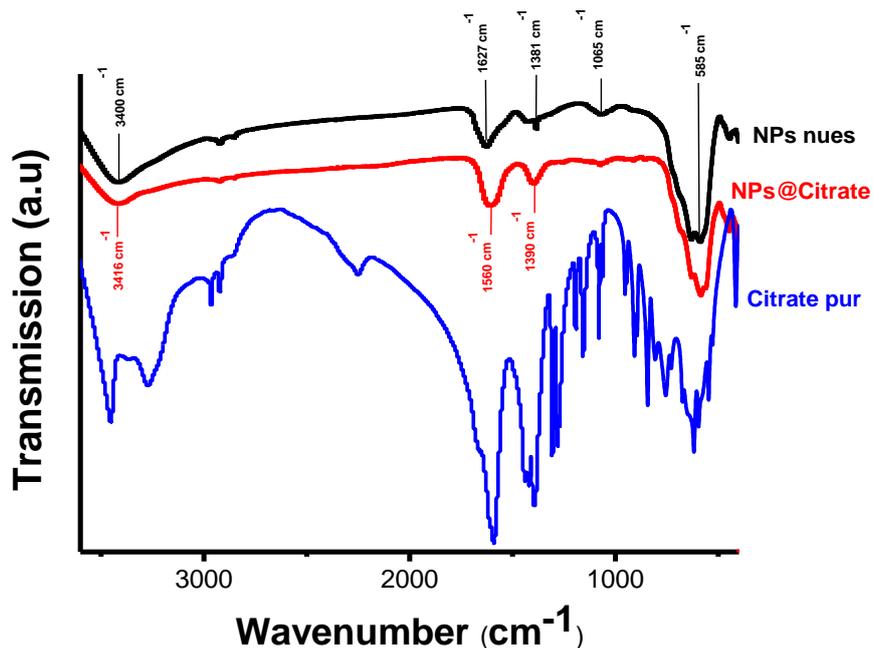


Figure 2.38: Comparaison des spectres FT-IR d'acide citrique pur, des nanoparticules de 10 nm synthétisées, et fonctionnalisées avec citrate.

Cette étude spectroscopique confirme la présence des molécules de citrate, dotées de groupements carboxylates et hydroxyles, à la surface des NPs, illustrant la réussite de la fonctionnalisation.

### 3.3.4. Analyse thermogravimétrique (ATG) :

L'analyse thermogravimétrique (ATG) constitue une méthode essentielle pour examiner l'évolution de la masse d'un échantillon, que celui-ci soit un élément, un composé ou un mélange, en fonction du temps ou de la température, facilitant ainsi la caractérisation de sa stabilité thermique. En réalisant des expériences ATG dans un intervalle de température de 20 à 800 °C, il est possible de quantifier le taux d'eau et de ligand adsorbés en étudiant le pourcentage de perte de masse des échantillons.

Les figures 2.31 a, b, c, et d révèlent des comportements de perte de masse distinctes pour les NPs nues et celles fonctionnalisées avec du citrate, de tailles respectives 5 nm (A), 10 nm (B), et 15 nm (C), au cours d'un échauffement progressif jusqu'à 800°C. Les NPs non revêtues enregistrent une perte massique globale de 1,4 %, potentiellement due à la désorption d'eau. D'autre part, les NPs fonctionnalisées affichent des dynamiques variables : NPs@Citrate A perdent 8,123 % de leur masse, suggérant une désorption d'eau de 2,157 % et une

décomposition notable de citrate de 5,966 % ; les NPs@Citrate B enregistrent une perte de 5,44 %, avec 2,279 % attribués à la désorption d'eau et 2,65 % à la décomposition de citrate, indiquant possiblement une modification des interactions ou une moindre disponibilité des sites d'adsorption ; enfin, les NPs@Citrate C révèlent une perte de 3,55 %, décomposée en 1,231 % de désorption d'eau et 2,318 % de décomposition de citrate, illustrant l'impact possible de la réduction de la surface spécifique sur l'adsorption du citrate. La première étape thermique est mise en évidence dans la dérivée de la perte de masse en fonction de la température, confirmant la déshydratation des poudres, avec une perte d'eau associée oscillant entre 1 et 2,5 %, selon l'échantillon. La seconde étape, également perceptible, est attribuée à un phénomène de décarbonatation où, si des éléments organiques (résidus carbonés) dus aux ligands, précurseurs ou solvants sont présents, ils généreront du CO ou CO<sub>2</sub> lors de la chauffe sous air, représentant une perte de masse de 2 à 5%.

Ces variations majeures dans la perte de masse selon la taille des nanoparticules lors de la fonctionnalisation avec le citrate révèlent l'influence notable de la taille des nanoparticules sur leurs interactions avec les molécules de citrate, et par conséquent, sur leur stabilité thermique. À partir de 300 °C, les NPs nues stabilisent leur masse, assurant la phase maghémite (Figure 2.31-a). Alors qu'à partir de 450 °C, les échantillons NPs@Citrate A, B et C (Figure 2.31-b, c et d) approchent d'une masse stable, transformant le  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> métastable en hématite stable ( $\alpha$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>), caractérisée par une disposition hexagonale compacte des atomes d'oxygène. Les variations de perte de masse entre les échantillons sont dues à des différences dans la quantité d'échantillon analysée dans chaque cas.

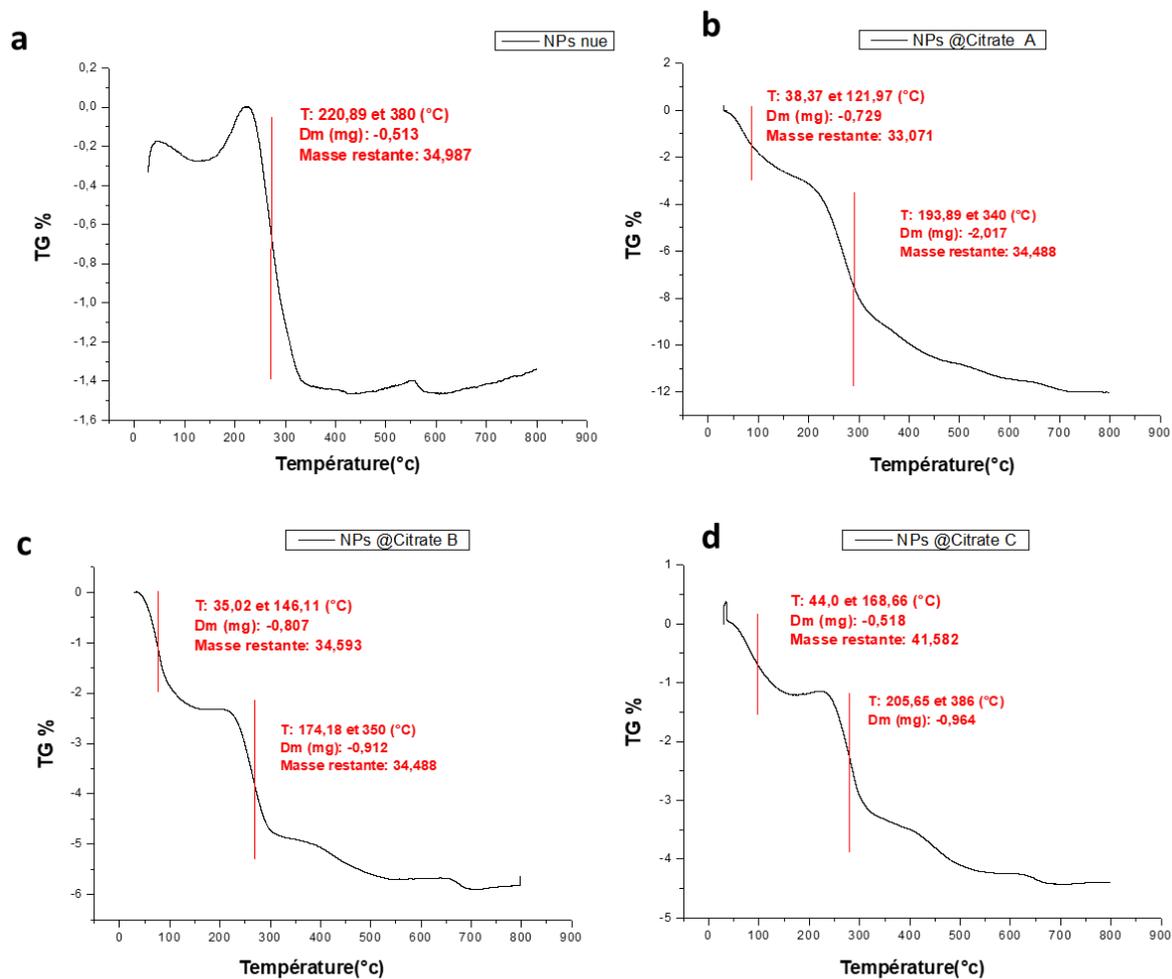


Figure 2.39: Analyse thermogravimétrique (ATG) des nanoparticules de 10 nm nues et fonctionnalisées avec les citrates A, B et C, correspondant aux tailles de 5 nm, 10 nm et 15 nm respectivement.

## 4. Conclusions

Dans cette partie de thèse, nous avons synthétisé des nanoparticules d'oxyde de fer par la voie polyol. Les analyses XPS et DRX ont montré que les nanoparticules sont constituées majoritairement de maghémite. Les images TEM indiquent une morphologie sphérique avec des tailles de 5, 10 et 15 nm environ, selon le polyol utilisé. Cependant ces NPs ne sont pas solubles dans l'eau et forment des agrégats, les rendant inutilisables dans un contexte biomédical.

Dans une étape ultérieure, nous avons fonctionnalisé les NPs de 10 nm pour améliorer leur solubilité et stabilité dans l'eau et introduire des fonctions amine ou carboxylate à leur surface. Trois agents de fonctionnalisation ont été testés : le citrate (@Citrate), l'acide (3-aminopropyl) phosphonique (APPA) et la dopamine (@Dopa). La fonctionnalisation avec le citrate s'est avérée être un succès, atteignant les propriétés désirées. Bien que la dopamine ait été fonctionnellement efficace, elle ne répondait pas à nos objectifs de recherche. D'autre part, les essais avec l'APPA n'ont pas abouti.

Par conséquent, nos efforts ont été réorientés exclusivement vers l'utilisation des NPs fonctionnalisées avec le citrate. Nous avons déterminé la nature chimique, la taille, caractériser la surface par les méthodes classiques du laboratoire. Ces NPs sont alors des groupes fonctionnels à leur surface, ce qui va permettre de les greffer sur la surface des capsides de virus de plantes, sujet qui sera exploré dans le chapitre suivant. Les propriétés magnétiques seront discutées dans le dernier chapitre en comparaison avec celles des assemblages des NPs.

## 5. Références

- [1] F. Herranz, J. Pellico, and J. Ruiz-Cabello, “Covalent functionalization of magnetic nanoparticles for biomedical imaging,” *SPIE Newsroom*, no. June 2014, 2012, doi: 10.1117/2.1201209.004473.
- [2] K. Hola, Z. Markova, G. Zoppellaro, J. Tucek, and R. Zboril, “Tailored functionalization of iron oxide nanoparticles for MRI, drug delivery, magnetic separation and immobilization of biosubstances,” *Biotechnology Advances*, vol. 33, no. 6, 2015. doi: 10.1016/j.biotechadv.2015.02.003.
- [3] R. Hachani *et al.*, “Polyol synthesis, functionalisation, and biocompatibility studies of superparamagnetic iron oxide nanoparticles as potential MRI contrast agents,” *Nanoscale*, vol. 8, no. 6, pp. 3278–3287, 2016, doi: 10.1039/c5nr03867g.
- [4] F. Fievet *et al.*, “The polyol process: a unique method for easy access to metal nanoparticles with tailored sizes, shapes and compositions,” *Chem. Soc. Rev.*, vol. 47, no. 14, pp. 5187–5233, 2018, doi: 10.1039/c7cs00777a.
- [5] C. Cheng, F. Xu, and H. Gu, “Facile synthesis and morphology evolution of magnetic iron oxide nanoparticles in different polyol processes,” *New J. Chem.*, vol. 35, no. 5, pp. 1072–1079, 2011, doi: 10.1039/c0nj00986e.
- [6] F. Fievet, J. P. Lagier, and M. Figlarz, “Preparing Monodisperse Metal Powders in Micrometer and Submicrometer Sizes by the Polyol Process,” *MRS Bull.*, vol. 14, no. 12, pp. 29–34, 1989, doi: 10.1557/S0883769400060930.
- [7] R. Hachani, M. Lowdell, M. Birchall, A. Hervault, D. Mertz, and S. Begin-colin, “iron oxide nanoparticles as potential MRI,” pp. 3278–3287, 2016, doi: 10.1039/c5nr03867g.
- [8] L. Poul, S. Ammar, N. Jouini, F. Fievet, and F. Villain, “Synthesis of inorganic compounds (metal, oxide and hydroxide) in polyol medium: A versatile route related to the sol-gel process,” *J. Sol-Gel Sci. Technol.*, vol. 26, no. 1–3, pp. 261–265, 2003, doi: 10.1023/A:1020763402390.
- [9] F. Application, P. Data, and P. E. Stallard, “United States Patent ( 19 ),” no. 19, 1985.
- [10] L. Poul, S. Ammar, N. Jouini, F. Fievet, and F. Villain, “Metastable solid solutions in the system ZnO-CoO: Synthesis by hydrolysis in polyol medium and study of the morphological characteristics,” *Solid State Sci.*, vol. 3, no. 1–2, pp. 31–42, 2001, doi:

10.1016/S1293-2558(00)01129-8.

- [11] A. Schmidt, M. Schneiders, M. Döpfner, and G. Lehmkuhl, “Störungskonzepte für psychische probleme bei Jugendlichen. Pilotstudie zur validierung eines fragebogens zu störungskonzepten bei psychischen problemen von Jugendlichen (SSPJ),” *Z. Kinder. Jugendpsychiatr. Psychother.*, vol. 31, no. 2, pp. 111–121, 2003, doi: 10.1024/1422-4917.31.2.111.
- [12] D. Press, “Superparamagnetic iron oxide nanoparticles : magnetic nanoplatforms as drug carriers,” pp. 3445–3471, 2012.
- [13] T. D. Schladt and K. Schneider, “Synthesis and bio-functionalization of magnetic nanoparticles for medical diagnosis and treatment”, doi: 10.1039/c0dt00689k.
- [14] C. J. J. den Ouden and R. W. Thompson, “Analysis of the formation of monodisperse populations by homogeneous nucleation,” *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 143, no. 1, pp. 77–84, 1991, doi: 10.1016/0021-9797(91)90438-E.
- [15] M. Artus *et al.*, “Size-dependent magnetic properties of CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles prepared in polyol,” *J. Phys. Condens. Matter*, vol. 23, no. 50, 2011, doi: 10.1088/0953-8984/23/50/506001.
- [16] N. T. K. Thanh, N. Maclean, and S. Mahiddine, “Mechanisms of nucleation and growth of nanoparticles in solution,” *Chem. Rev.*, vol. 114, no. 15, pp. 7610–7630, 2014, doi: 10.1021/cr400544s.
- [17] B. W. Chieng and Y. Y. Loo, “Synthesis of ZnO nanoparticles by modified polyol method,” *Mater. Lett.*, vol. 73, pp. 78–82, 2012, doi: 10.1016/j.matlet.2012.01.004.
- [18] H. Liu, E. Y. Jiang, R. K. Zheng, and H. L. Bai, “Structure and magnetic properties of polycrystalline Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> films deposited by reactive sputtering at room temperature,” *Phys. Status Solidi Appl. Res.*, vol. 201, no. 4, pp. 739–744, 2004, doi: 10.1002/pssa.200306762.
- [19] J. H. Xia, H. Shen, W. Zhang, Y. Liu, J. Dong, and G. Bernd, “Surface chemistry of nanoscale Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> dispersed in magnetic fluids,” *Sci. China, Ser. B Chem.*, vol. 50, no. 6, pp. 754–758, 2007, doi: 10.1007/s11426-007-0136-3.
- [20] S. Lefebure, E. Dubois, V. Cabuil, S. Neveu, and R. Massart, “Monodisperse magnetic nanoparticles : Preparation and dispersion in water and oils,” pp. 2975–2981, 1998.

- [21] J. Lee, T. Isobe, and M. Senna, "Preparation of ultrafine Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> particles by precipitation in the presence of PVA at high pH," *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 177, no. 2, pp. 490–494, 1996, doi: 10.1006/jcis.1996.0062.
- [22] J. C. Bacri, R. Perzynski, D. Salin, V. Cabuil, and R. Massart, "Ionic ferrofluids: A crossing of chemistry and physics," *J. Magn. Magn. Mater.*, vol. 85, no. 1–3, pp. 27–32, 1990, doi: 10.1016/0304-8853(90)90010-N.
- [23] K. Andreas *et al.*, "Highly efficient magnetic stem cell labeling with citrate-coated superparamagnetic iron oxide nanoparticles for MRI tracking," *Biomaterials*, vol. 33, no. 18, pp. 4515–4525, 2012, doi: 10.1016/j.biomaterials.2012.02.064.
- [24] Y. Sahoo *et al.*, "Alkyl phosphonate/phosphate coating on magnetite nanoparticles: A comparison with fatty acids," *Langmuir*, vol. 17, no. 25, pp. 7907–7911, 2001, doi: 10.1021/la010703+.
- [25] H. Eskandari and M. R. Shariati, "Dodecylbenzene sulfonate-coated magnetite nanoparticles as a new adsorbent for solid phase extraction-spectrophotometric determination of ultra trace amounts of ammonium in water samples," *Anal. Chim. Acta*, vol. 704, no. 1–2, pp. 146–153, 2011, doi: 10.1016/j.aca.2011.07.005.
- [26] H. M. Liu *et al.*, "Mesoporous silica nanoparticles improve magnetic labeling efficiency in human stem cells," *Small*, vol. 4, no. 5, pp. 619–626, 2008, doi: 10.1002/sml.200700493.
- [27] Z. Xu, Y. Hou, and S. Sun, "Magnetic core/shell Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/Au and Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/Au/Ag nanoparticles with tunable plasmonic properties," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 129, no. 28, pp. 8698–8699, 2007, doi: 10.1021/ja073057v.
- [28] W. Jiang *et al.*, "Preparation and properties of superparamagnetic nanoparticles with narrow size distribution and biocompatible," *J. Magn. Magn. Mater.*, vol. 283, no. 2–3, pp. 210–214, 2004, doi: 10.1016/j.jmmm.2004.05.022.
- [29] M. Mahmoudi, A. Simchi, M. Imani, A. S. Milani, and P. Stroeve, "Optimal design and characterization of superparamagnetic iron oxide nanoparticles coated with polyvinyl alcohol for targeted delivery and imaging," *J. Phys. Chem. B*, vol. 112, no. 46, pp. 14470–14481, 2008, doi: 10.1021/jp803016n.
- [30] G. Unsoy, S. Yalcin, R. Khodadust, G. Gunduz, and U. Gunduz, "Synthesis

- optimization and characterization of chitosancoated iron oxide nanoparticles produced for biomedical applications,” *J. Nanoparticle Res.*, vol. 14, no. 11, 2012, doi: 10.1007/s11051-012-0964-8.
- [31] I. Gouzman, M. Dubey, M. D. Carolus, J. Schwartz, and S. L. Bernasek, “Monolayer vs. multilayer self-assembled alkylphosphonate films: X-ray photoelectron spectroscopy studies,” *Surf. Sci.*, vol. 600, no. 4, pp. 773–781, 2006, doi: 10.1016/j.susc.2005.11.030.
- [32] C. T. Vogelson, A. Keys, C. L. Edwards, and A. R. Barron, “Molecular coupling layers formed by reactions of epoxy resins with self-assembled carboxylate monolayers grown on the native oxide of aluminium,” *J. Mater. Chem.*, vol. 13, no. 2, pp. 291–296, 2003, doi: 10.1039/b205834k.
- [33] R. W. O’Brien, B. R. Midmore, A. Lamb, and R. J. Hunter, “Electroacoustic studies of moderately concentrated colloidal suspensions,” *Faraday Discuss. Chem. Soc.*, vol. 90, pp. 301–312, 1990, doi: 10.1039/DC9909000301.
- [34] D. Hanaor, M. Michelazzi, C. Leonelli, and C. C. Sorrell, “The effects of carboxylic acids on the aqueous dispersion and electrophoretic deposition of ZrO<sub>2</sub>,” *J. Eur. Ceram. Soc.*, vol. 32, no. 1, pp. 235–244, 2012, doi: 10.1016/j.jeurceramsoc.2011.08.015.
- [35] J. Jing *et al.*, “One-step reverse precipitation synthesis of water-dispersible superparamagnetic magnetite nanoparticles,” *J. Nanoparticle Res.*, vol. 14, no. 4, pp. 1–8, 2012, doi: 10.1007/s11051-012-0827-3.
- [36] E. Da Silva Nunes, M. L. B. Carneiro, R. G. S. De Oliveira, S. N. Bao, and A. R. De Souza, “Colloidal stability, surface characterisation and intracellular accumulation of Rhodium(II) citrate coated superparamagnetic iron oxide nanoparticles in breast tumour: A promising platform for cancer therapy,” *J. Nanoparticle Res.*, vol. 15, no. 6, 2013, doi: 10.1007/s11051-013-1683-5.

---

# Chapitre III

---

## Assemblage 3D des nanoparticules sur la capsid de virus

### 1. Introduction

Les matériaux à base de virus suscitent un intérêt de plus en plus croissant notamment grâce à leur taille appropriée, leur homogénéité, la facilité de fonctionnaliser leur surface. Toute sorte d'objets peut être greffée dans la cavité interne ou/et sur la surface externe et ainsi aboutir à des nanomatériaux présentant de nombreuses applications comme la catalyse, la photonique, l'énergie, la nanomédecine ... (Figure 3.1) [1]

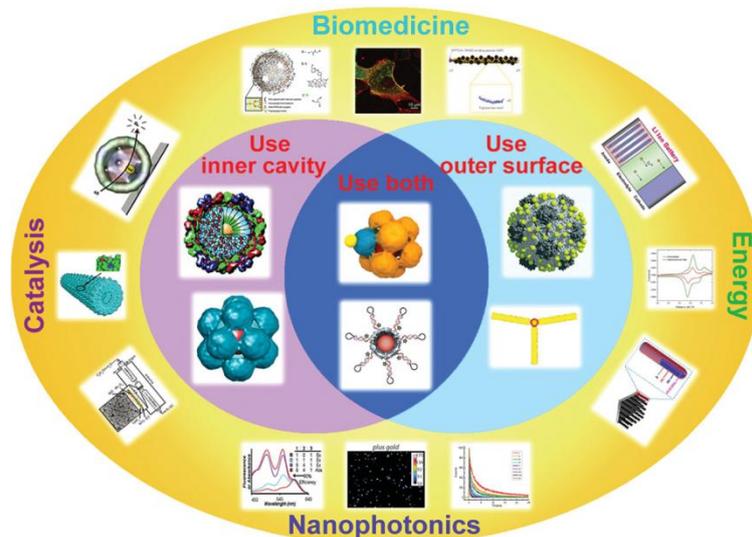


Figure 3.40: Principales applications des matériaux à base de virus.

Dans ce chapitre, j'exposerai quelques exemples de matériaux à base de virus de plantes, après avoir décrit ces entités biologiques, puis je détaillerai les résultats expérimentaux du greffage des nanoparticules d'oxyde de fer obtenues précédemment sur deux virus de plantes : le Turnip yellow mosaic virus (TYMV) et le Rice yellow mottle virus (RYMV).

## 1.1. Matériaux à base de virus

### 1.1.1. Capsides de virus de plantes et leur fonctionnalisation

Les virus sont des assemblages supramoléculaires hybrides protéine-nucléotide de formes variés et de taille variant de 10 à quelques centaines de nanomètres [2]. Un virus est composé d'un matériel génétique (ADN ou ARN) protégé par une coquille protéique, appelée capsid. Cette capsid est constituée de protéines auto-assemblées présentant une symétrie icosaédrique ou hélicoïdale (Figure 3.2). Le nombre de protéines nécessaires à l'assemblage d'une capsid icosaédrique est donné par le nombre de triangulation  $T$ , il faut  $T \times 60$  sous-unités pour former la capsid [3]. Par exemple, pour  $T = 3$ , il y a 180 protéines auto-assemblées par capsid. L'auto-assemblage de ces sous-unités présente des axes de symétrie d'ordre 2, 3 et 5 (Figure 3.2).

Certains virus sont dits enveloppés, c'est-à-dire qu'ils possèdent en plus une membrane phospholipidique entourant leur capsid. D'autres sont non-enveloppés. En comparaison avec des nanoparticules synthétiques, les nanoparticules virales sont parfaitement monodisperses. Comme le rôle de la capsid est de protéger et délivrer efficacement le matériel génétique, cette capsid présente une stabilité importante et est capable de supporter de nombreuses modifications chimiques, afin de décorer la cavité interne ou de fonctionnaliser la surface externe de la capsid, ou dans certains les deux surfaces peuvent être modifiées simultanément. Cette capsid est ainsi une boîte à outil extraordinaire en ingénierie de nano-bio-matériaux, elle permet la synthèse à façon d'une grande variété de matériaux, dont les propriétés découlent directement de la nature chimique des nano-objets encapsulés ou greffés sur la surface externe, mais aussi de leur organisation spatiale [3].

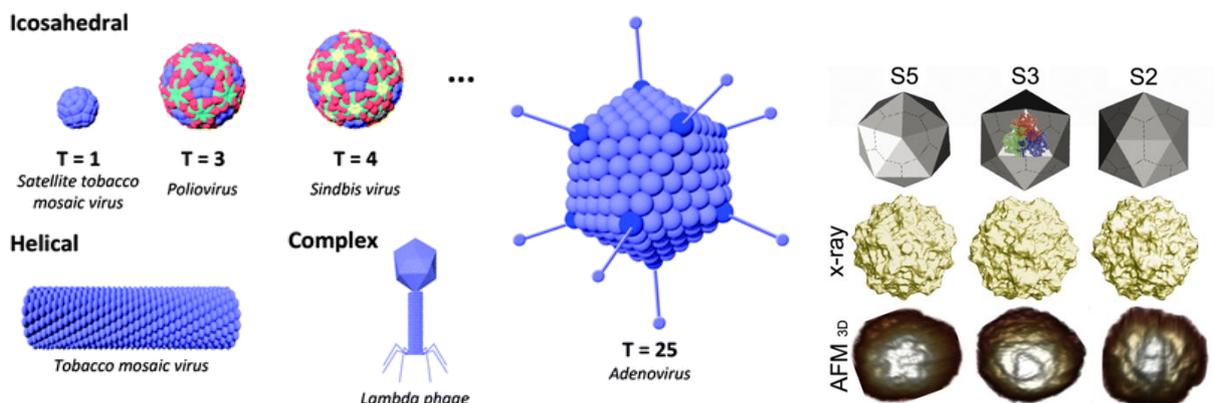


Figure 3.41 : Principales architectures des virus. Axes de symétrie d'ordre 2, 3 et 5 des virus icosaédriques.

Les techniques de modifications de la capside sont illustrées dans la Figure 3.3 et résumées ci-dessous.

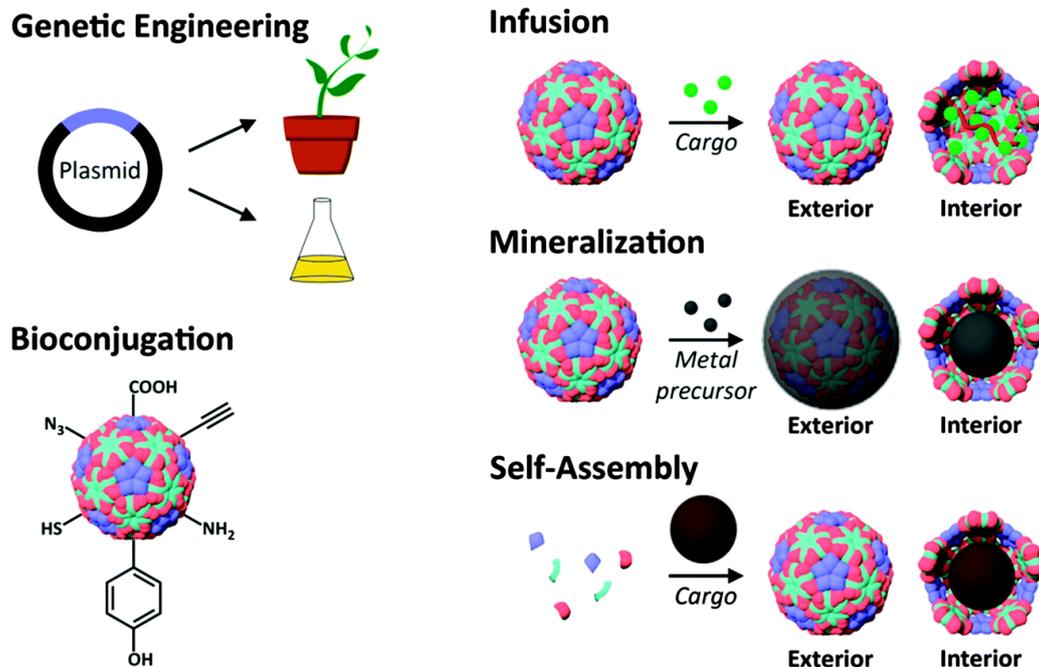


Figure 42.3 Techniques de modifications des surfaces des virus.

- Les protéines de la capside sont codées par la séquence nucléique du virus. Comme celles-ci sont relativement courtes, la plupart du génome des virus a été séquencée et bien caractérisée. Il est donc relativement facile par **ingénierie génétique** d'insérer ou de remplacer un acide aminé de surface par un autre pour présenter à la surface des groupes fonctionnels, comme des cystéines (thiols), des lysines (amines) ou des aspartates ou glutamates (carboxylate).
- L'intérieur de la capside peut être utilisé comme cage protéique pour encapsuler des objets (médicaments, agent de contraste...). Comme la capside est composée de protéines auto-assemblées, celle-ci est flexible et peut former dans certaines conditions (pH, concentration en ions métalliques) des trous permettant la diffusion de petites molécules (**infusion**). Les molécules sont alors retenues par interaction électrostatique ou par affinité avec l'acide nucléique ou la capside.
- Les particules virales peuvent servir d'échafaudage pour la **biominéralisation**. La réduction d'un sel métallique directement sur la capside, que ce soit à l'intérieur ou l'extérieur de la capside permet d'obtenir des matériaux hybrides inorganique-organique avec des applications en semi-conducteurs, plasmonique ou agents de contrastes.
- In vitro* et dans certaines conditions de température, de force ionique et de pH, la capside de virus peut se **désassembler**, puis se **réassembler** autour de son matériel

génétique ou d'un cargo. De cette façon, des nanoparticules d'or, quantum dots ou photosensibilisateurs ont pu être encapsulés dans une cage protéique afin d'être protégés de l'environnement extérieur.

- e) Enfin, grâce aux groupes fonctionnels présents à la surface de la capsid, il est possible de greffer par **voie chimique** une variété importante de molécules ou nano-objets. Les principales réactions de bioconjugaison sont indiquées dans la Figure 3.4.

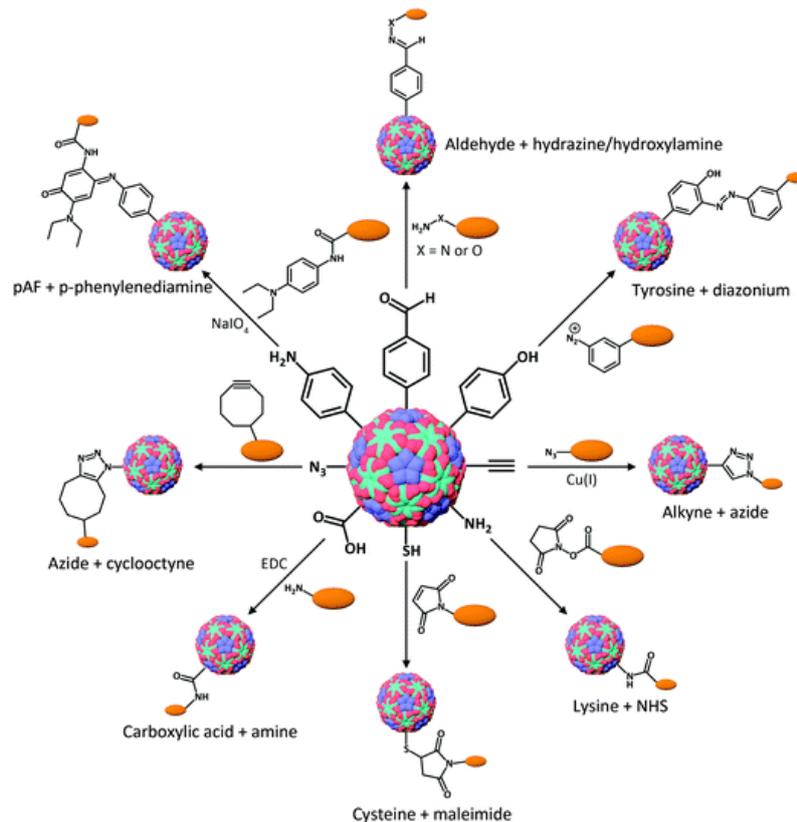


Figure 3.43 : Principales réactions de bioconjugaison pour la modification de la surface des virus.

### 1.1.2. Exemples pour la nanomédecine

La stabilité de la capsid des virus de plantes vis-à-vis des conditions variables en pH, température et de la présence de solvant organique dépend des interactions protéine-protéine, protéine-acide nucléique, et parfois de la présence d'ions divalents. Néanmoins, les virus de plantes utilisés pour le diagnostic ou la thérapie doivent être suffisamment robuste pour supporter les conditions des circulations sanguines, du système gastro-intestinale (pH ~2) sans être bien sûr pathogènes pour l'homme [4]. Dans ce paragraphe, je donnerai quelques

exemples d'utilisation de virus de plantes dans la délivrance de médicaments, et dans le diagnostic et thérapeutique (théranostique).

### 1.1.2.1. Délivrance de molécules pour le traitement du cancer.

Actuellement, la chimiothérapie est l'un des traitements les plus utilisés contre le cancer. Cependant la résistance, le taux de récurrence, l'administration non ciblée des médicaments conduisent à des toxicités aiguës et limitent leurs applications cliniques. Le système de délivrance de médicaments (« Drug-delivery system ») permet un ciblage et une délivrance cellulaire, une accumulation des pro-drogues dans les tissus tumoraux et minimisent ainsi la dose nécessaire au traitement. Les capsides de virus de plantes sont ainsi des candidates de choix pour la délivrance de médicaments car ils peuvent encapsuler un certain nombre de molécules et leur surface externe peut être fonctionnalisée pour le ciblage cellulaire.

De nombreux systèmes de virus ou nanoparticules virales ont été utilisés pour la délivrance de la doxorubicine (DOX), un anticancéreux [5]. Cette molécule peut à la fois se lier à la surface externe du RCNMV (Red clover necrotic mosaic virus) par interactions électrostatiques, et être encapsulée dans la capside virale par gonflement du virus (Figure 3.5). Les auteurs ont montré que cela permettait un relargage rapide de DOX de la surface externe puis une libération plus lente des molécules encapsulées [6].

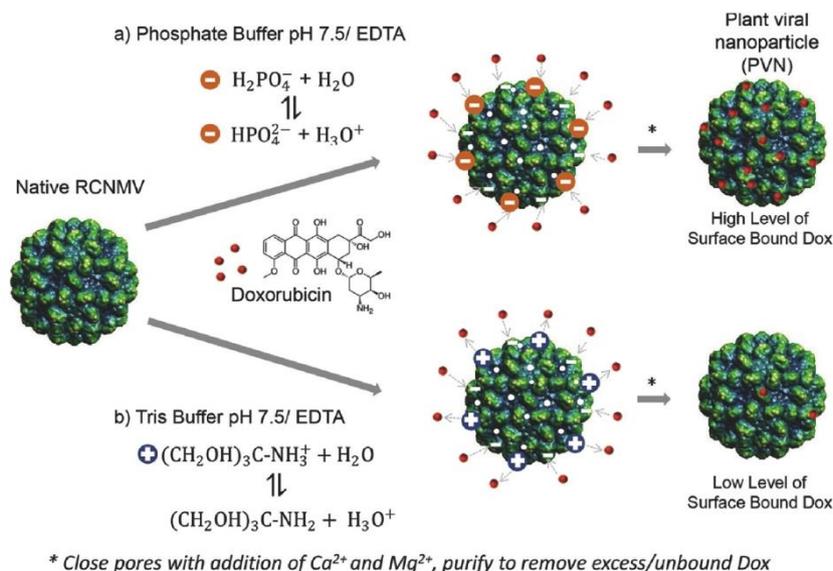


Figure 3.44: Utilisation de RCNMV pour la délivrance de la doxorubicine [6].

Un autre exemple est l'encapsulation du cis-platine ou de son analogue, le phenanthriplatine, dans la cavité du virus du tabac (TMV) par liaisons électrostatique ou liaison covalente. Les

complexes TMV-cisplatine ont été transporté efficacement vers les cellules cancéreuses et ont une cytotoxicité supérieure comparé au cis-platine libre. Ce complexe a été également fonctionnalisé à l'extérieur par du mannose ou lactose, ce qui a permis une délivrance ciblée de ce nanomédicament via la reconnaissance spécifique des sucres par le récepteur asialoglycoprotéine. Ce système multifonctionnel présente une cytotoxicité accrue pour les cellules MCF-7 et HepG2 [7][8][9].

#### 1.1.2.2. Théranostique.

La théranostique est une nouvelle approche médicale qui allie le diagnostic et la thérapie. Les particules virales sont parfaitement adaptées pour transporter des agents de contraste ou fluorophores pour l'imagerie optique, tomographie, imagerie de résonance magnétique, tomoscintigraphie par émission de positons (PET)... La cavité peut simultanément contenir des molécules pour l'imagerie et les médicaments afin d'obtenir des agents pour la théranostique. De plus, l'addition de d'aptamères, peptides ou anticorps à leur surface améliore le ciblage de ces nano-objets vers les cellules ou tissus particuliers.

Par exemple, la capsid hélicoïdale du virus du tabac a été chargée en complexes de Gadolinium et fonctionnalisé par la polydopamine (PDA). En IRM, les particules Gd-TMV sans PDA produisent un taux de relaxation  $r_1$  de  $13 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$ , alors qu'en présence de PDA (Gd-TMV-PDA) cette valeur atteint  $80 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$ . Cette augmentation serait due au fait que le PDA piège les molécules d'eau à la surface du TMV et améliore ainsi les propriétés magnétiques et les interactions du centre Gd avec l'eau. De plus, ces nano-objets présentent une forte absorption dans le proche infra-rouge (NIR) avec une conversion photothermique élevée (28.9 %) [10]. Ces nanoparticules présentent une cytotoxicité minimale sans irradiation, alors que sous irradiation, elles sont efficaces pour le traitement photothermique vis-à-vis des cellules PC-3 et 4T1 des cancers de la prostate et du sein, respectivement.

#### 1.1.3. Nano-hybrides

Les capsides de virus sont également utilisées comme échafaudage pour fabriquer des nano-architectures à base de nanoparticules inorganiques. En effet, comme on l'a vu précédemment, contrairement aux macromolécules synthétiques, les capsides sont homogènes en tailles, facilement fonctionnalisables, faciles à produire avec un faible coût, et de manière écologique [1]. On peut encapsuler les nanoparticules dans la cavité et/ou organiser des nanoparticules à l'extérieure de la capsid en profitant de la symétrie de cette capsid.

### 1.1.3.1. À l'intérieur de la cavité

En encapsulant les sels métalliques précurseurs dans la cavité des virus, il est possible de synthétiser par minéralisation des nanoparticules d'oxyde de fer dans le virus icosaédrique CCMV (cowpea chlorotic mottle virus) [11]. Il est également possible d'obtenir des nanobâtonnets magnétiques en faisant croquer les nano-objets dans la cavité de virus hélicoïdaux, comme par exemple le virus de la mosaïque de la tomate (ToMV) [12].

L'encapsulation de nanoparticules déjà synthétisées est une alternative à la minéralisation pour placer des nanomatériaux dans les particules virales sphériques. Les nanoparticules d'or dont la surface est chargée négativement, pour mimer la charge de l'acide nucléique, peuvent induire l'assemblage des protéines de la capsid de BMV (Brome mosaic virus) autour de la nanoparticule (Figure 3.6) [2]. Selon la taille de la nanoparticule, le nombre de triangulation  $T$  peut être de 1, 2 ou 3. Les auteurs ont également montré que l'auto-assemblage de ces protéines de la capsid peut se faire autour de plusieurs quantum dots.

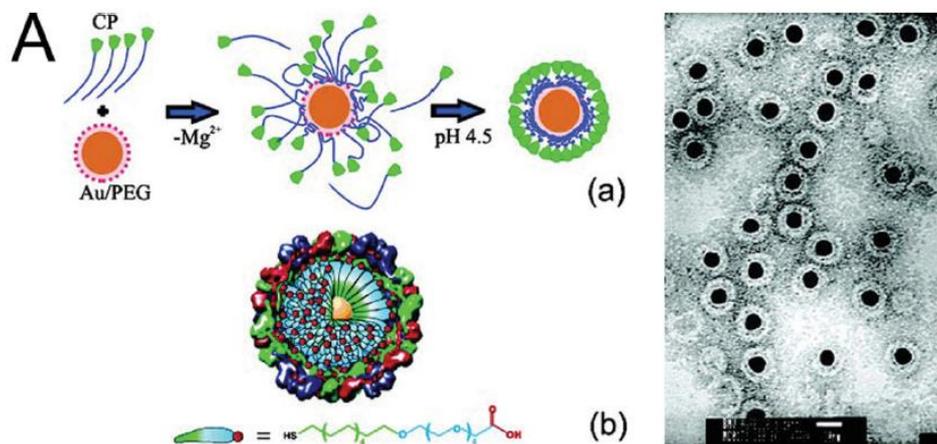


Figure 3.45: (a) Mécanisme proposé de la formation de complexes CPs-nanoparticules d'or. (b) Images TEM typiques de VNPs de BMV avec des cœurs en or de 12 nm.

Une autre stratégie consiste à exploiter les interactions entre biomolécules pour initier l'encapsulation des Np dans les capsides. Par exemple, le groupe de Franzen a décoré les Np par des séquences d'ADN de 20 bases, qui interagissent avec une séquence courte d'ARN. Ce complexe d'acide nucléique permet de recruter la protéine de la capsid de RCNMV et d'initier l'encapsulation autour de la nanoparticule. Ils ont ainsi réussi à encapsuler dans le

RCNMV des Np de taille comprise entre 3 à 15 nm et de nature différentes : or, quantum dot CdSe, ou magnétique  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$ ) [13].

### 1.1.3.2. À l'extérieur de la capsid

Dans ces exemples, la capsid sert d'échafaudage pour organiser les nanoparticules en 3 dimensions. Le virus CPMV (Cowpea mosaic virus) a été décoré par des nanoparticules de tailles différentes (Figure 3.7) permettant un contrôle sur la distance interparticulaire. Au sein de ces regroupements, ces nanoparticules peuvent être interconnectées conduisant à des réseaux conducteurs, qui sont très prometteurs pour les dispositifs de stockage de bit [14]. Il est également possible d'obtenir des nano-hybrides par biominéralisation de précurseur métallique à la surface des virus, comme par exemple sur le TMV [15].

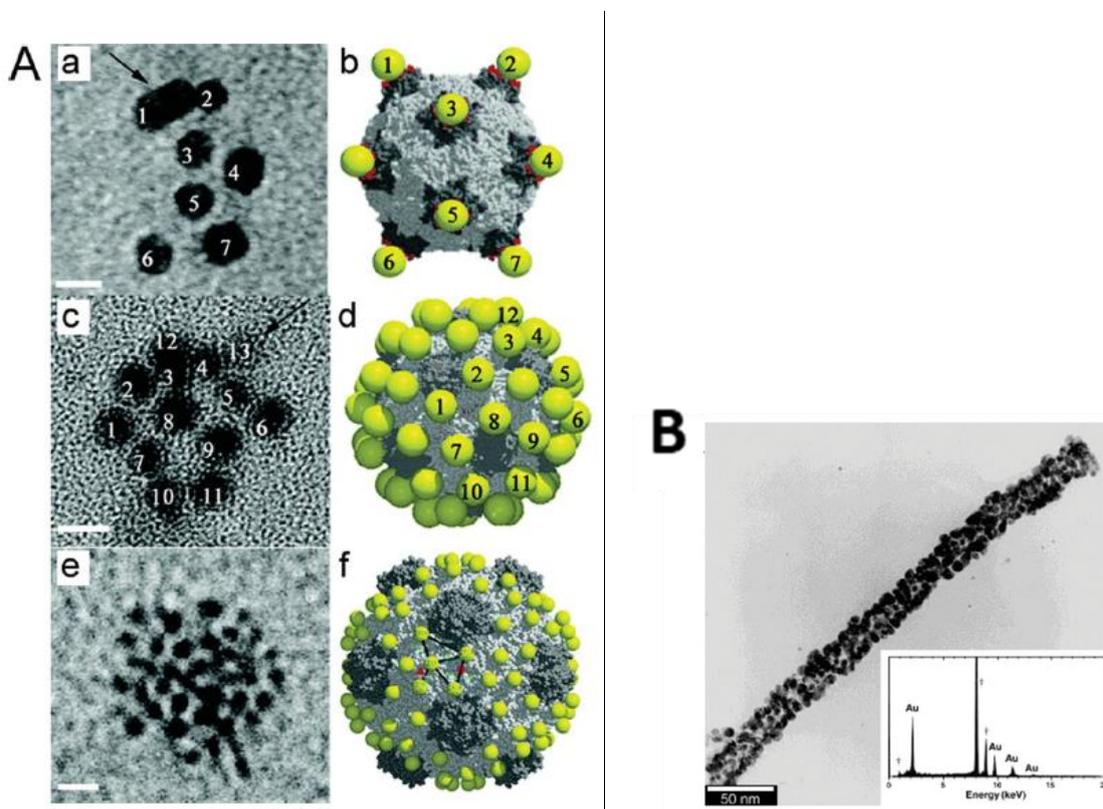


Figure 3.46: (A) Le virus de la mosaïque du niébé (CPMV) peut être modifié pour se lier aux nanoparticules d'or (AuNPs). Les images TEM non colorées (a), (c) et (e) montrent des AuNPs liées à différents mutants de cystéine du CPMV, avec les AuNPs visibles sous forme de cercles noirs. Les barres d'échelle mesurent 5 nm. Les modèles (b), (d) et (f) représentent le CPMV avec des AuNPs liées à des sites modifiés. (B) Tige individuelle de TMV avec une couche dense de nanoparticules d'or discrètes ; l'échelle utilisé est de 50 nm. En encart : le spectre EDXA correspondant montrant la présence d'or et de cuivre (provenant de la grille de support).

Plus récemment, dans notre groupe, nous avons réussi à assembler des AuNPs de taille 5-10 et 20 nm sur la capsid du virus du chou (Turnip yellow mosaic virus, TYVM) sans former d'aggrégats (Figure 3.8). Ces objets sont stables et solubles dans l'eau et présentent des facteurs d'exaltation analytique en SERS que les nanoparticules isolées [16].

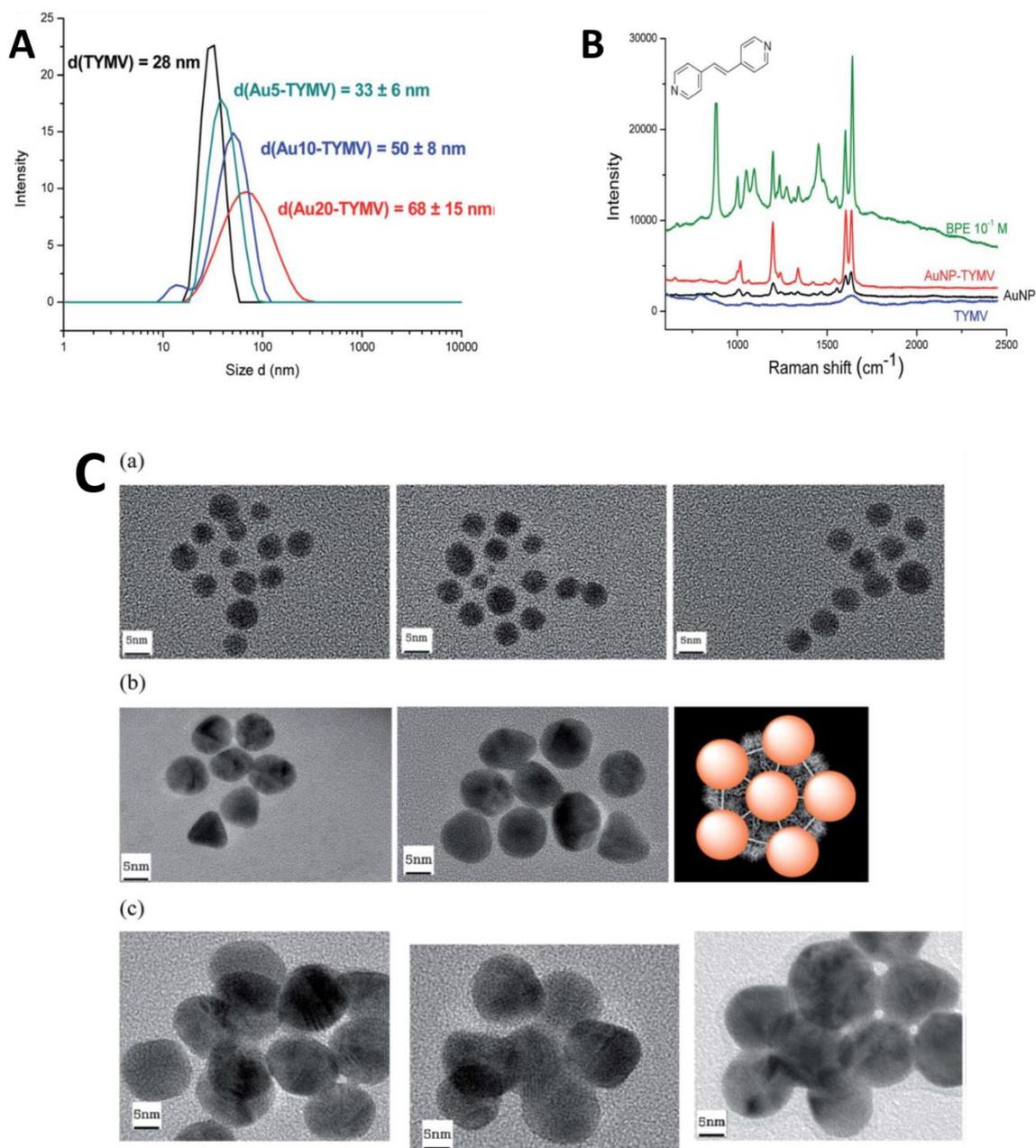


Figure 3.47 : (A) Expériences de DLS. Distribution de la taille des particules de TYMV (noir), TYMV greffé avec des AuNP de 5 nm (vert), 10 nm (bleu) et 20 nm (rouge). (B) Expériences de SERS. Spectres Raman du BPE à  $10^{-1} \text{ M}$  en solution dans de l'éthanol (vert) et à  $10^{-5} \text{ M}$  en présence de TYMV (bleu), de 20 nm-AuNP (noir) et de TYMV greffé sur des 20 nm-AuNP (rouge). (C) Images TEM des AuNP de 5 nm (a), 10 nm (b) et 20 nm (c) greffées sur TYMV.

Enfin, nous avons réussi à obtenir une biominéralisation homogène des TMV grâce à des observations concomitantes à l'échelle individuelle en TEM-liquide et dans le bêcher en spectroscopie d'absorption et TEM (Figure 3.9). Cela nous a permis de proposer un mécanisme de croissance des nanoparticules d'or à la surface du TMV [17].

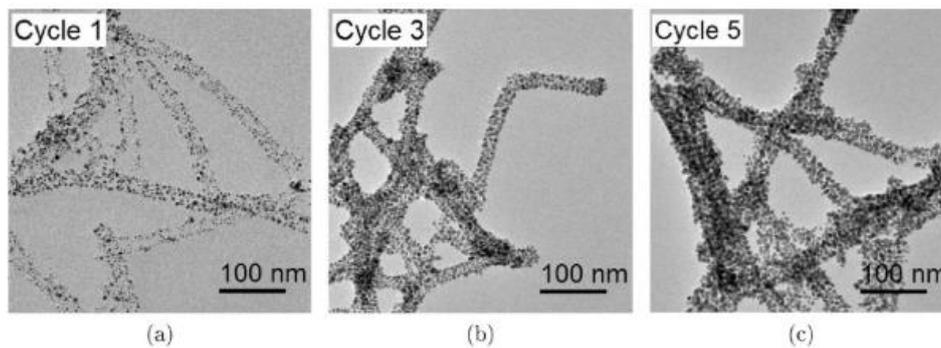


Figure 3.48: Images TEM des nanoparticules d'or post-cycles de réduction 1, 3, 5 avec une concentration constante de  $[NaBH_4] = 5 \text{ mM}$  et incubation de 2h dont 15 min en bain ultrasonore avant le 1er cycle.

Beaucoup de résultats montrent l'organisation de nanoparticules d'or autour de biomolécules, comme les capsides de virus, mais peu de choses ont été faites sur l'utilisation de ces échafaudages naturels pour organiser des nanoparticules d'oxyde de fer. Cela constitue mon travail de thèse, que je vais exposer dans les parties suivantes. Après avoir synthétisé des nanoparticules d'oxyde de fer stables et solubles dans l'eau (chapitre 2), j'ai réussi à greffer sur deux virus le TYMV (Turnip yellow mosaic virus) et le RYMV (Rice yellow mosaic virus).

## 1.2. Caractérisation de virus de plantes

### 1.2.1. Turnip yellow mosaic virus (TYMV)

Le virus du chou TYMV fait partie de la famille des *Tymovirus* [18], qui infectent de nombreuses espèces de plantes dicotylédones et causent des pigmentations jaune clair sur les feuilles et réduisent leur croissance. Son génome, un ARN simple brin de 6318 bases, est protégé par une capsidie protéique composée de 180 sous-unités identiques : A, B et C, de 189 acide aminés et de 20 kDa.

Les sous-unités A forment des pentamères avec une symétrie axiale d'ordre 5, tandis que les sous-unités B et C forment des hexamères (Figure 3.10). La symétrie de la capsidie est icosaédrique, avec un nombre de triangulation  $T = 3$  [19], avec un diamètre de 28 nm (Figure 3.8-A).

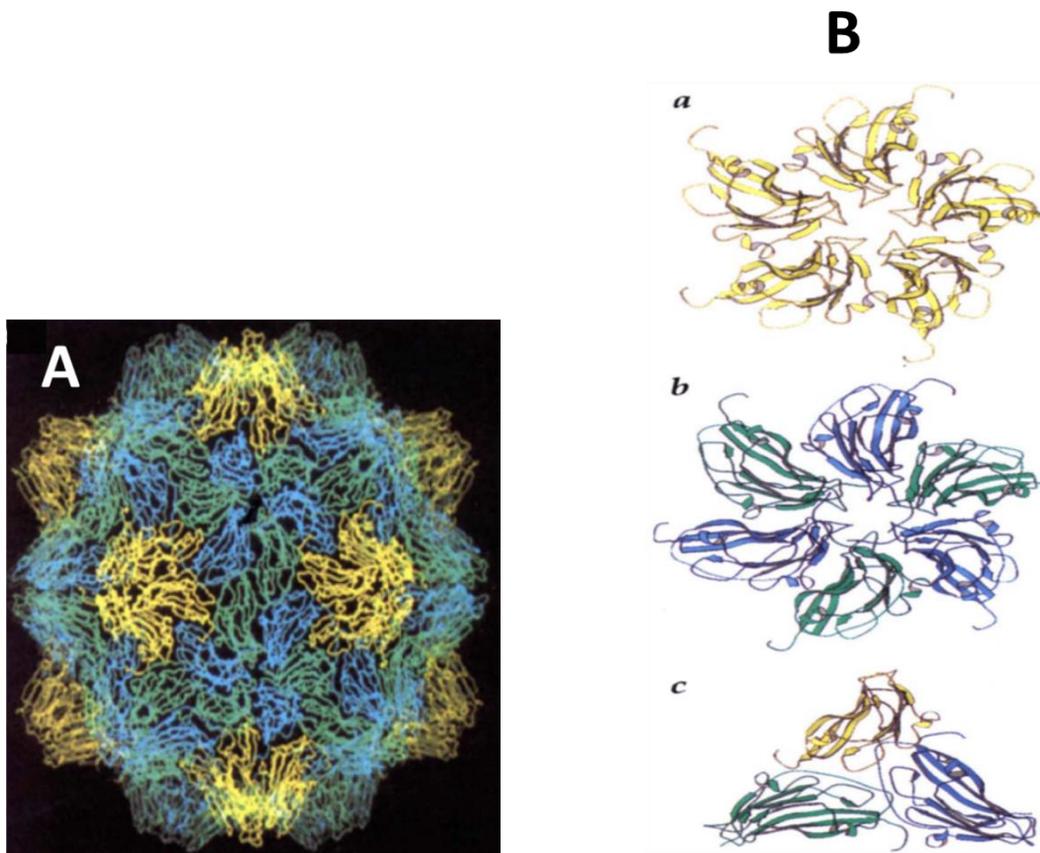


Figure 3.49: Structure de la capside du TYMV. (A) Image stéréo de l'extérieur de la capside du TYMV. Les sous-unités A (jaunes) forment des grappes pentamériques, les sous-unités B (bleues) et C (vertes) forment des grappes hexamériques. (B) Un schéma stéréo schématique des sous-unités A (jaunes), B (bleues), et C (vertes) du TYMV telles qu'elles apparaissent à l'extérieur de la capside, aux axes *a* (cinq fois), *b* (quasi six fois), et *c* (quasi trois fois) [19].

La structure secondaire et tertiaires des sous-unités sont très similaires avec 9 % d'hélices  $\alpha$ , 43 % de feuillets  $\beta$  et 48 % de chaînes polypeptidiques désordonnées. Canady et al., ont décrit que la chaîne polypeptidique forme un feuillet  $\beta$  de 8 brins antiparallèles, et une partie C-terminale à l'extérieur de la capside. La partie N-terminale de la sous-unité A est désordonnée, tandis que celles des sous-unités B et C sont à l'extérieur et interagissent avec l'acide aminé 5 de l'autre sous-unité pour former un anneau dans le centre des hexamères (Figure 3.10).

La séquence peptidique de la sous-unité B est présentée Figure 3.10 -C, ainsi que les interactions au sein de cette même sous-unité ou avec les autres sous-unités. Ces interactions assurent la cohérence de la capside et sa stabilité. En effet, la capside de TYMV est stable entre 4 et 60 °C, à des pH compris entre 4 et 10 et en présence de solvant organique [20]. Cette robustesse permet de modifier chimiquement cette capside. Sur la figure 3.11, on peut notamment voir en orange les acides aminés accessibles sur la surface externe, comme des lysines, acide glutamique ou aspartique. Ces résidus portent des groupements fonctionnels (-

NH<sub>2</sub> ou -COOH) qui peuvent être bioconjugués avec d'autres molécules [19][21], comme des fluorophores, des peptides ou même des nanoparticules d'or comme on l'a montré précédemment [16].

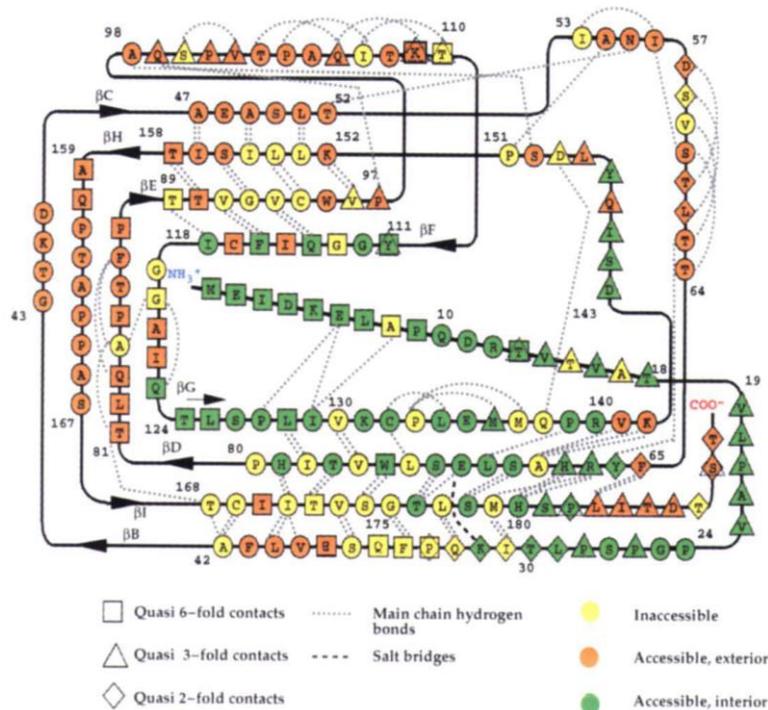


Figure 3.50: Diagramme représentant les liaisons hydrogène, les contacts entre les sous-unités et l'accessibilité de la sous-unité B du TYMV, ainsi que leurs interactions Quasi 6-fold : B-C. Quasi 3-fold : A-B-C. Quasi 2-fold : A-B.. Les atomes ont été considérés en contact pour les interactions de van der Waals, les liaisons hydrogène et les ponts salins. Les résidus ont été jugés inaccessibles en fonction de leur surface accessible.

## 1.2.2. Rice yellow mottle virus (RYMV)

### 1.2.2.1. Structure

Le virus de la panachure jaune du riz (*Rice yellow mottle virus*, RYMV) appartient à la famille des *Sobemovirus* [22]. Ce virus est responsable de pertes économiques importantes sur la production de riz en Afrique de l'est et de l'ouest. Les symptômes caractéristiques de la panachure se manifestent par des jaunissements de feuilles et des rabougrissements de plante qui apparaissent 2 à 3 semaines après inoculation. RYMV contient un ARN simple brin de 4450 nucléotides. Sa capsid est composée de 180 sous-unités, de 26 kDa, assemblées selon une symétrie icosaédrique, avec un nombre de triangulation  $T = 3$ . Son diamètre est estimé par cryo-TEM à 28 nm [23]. Comme dans le cas de TYMV, les sous-unités A forment un pentamère, tandis que les sous-unités B et C forment des hexamères (Figure 3.12). Les protéines ont une structure de deux feuilletts  $\beta$  de 4 brins (« Jelly roll beta sandwich »). Pour

les sous-unités A et B, la partie N-terminale est désordonnée (1-49), tandis que pour la sous-unité C, une séquence (27-48) forme un brin  $\beta$  supplémentaire appelé «  $\beta A$  arm » proche de l'interface entre les sous-unités B et C et qui confère à la capsidie une plus grande stabilité à haute pression et pH élevé [24].

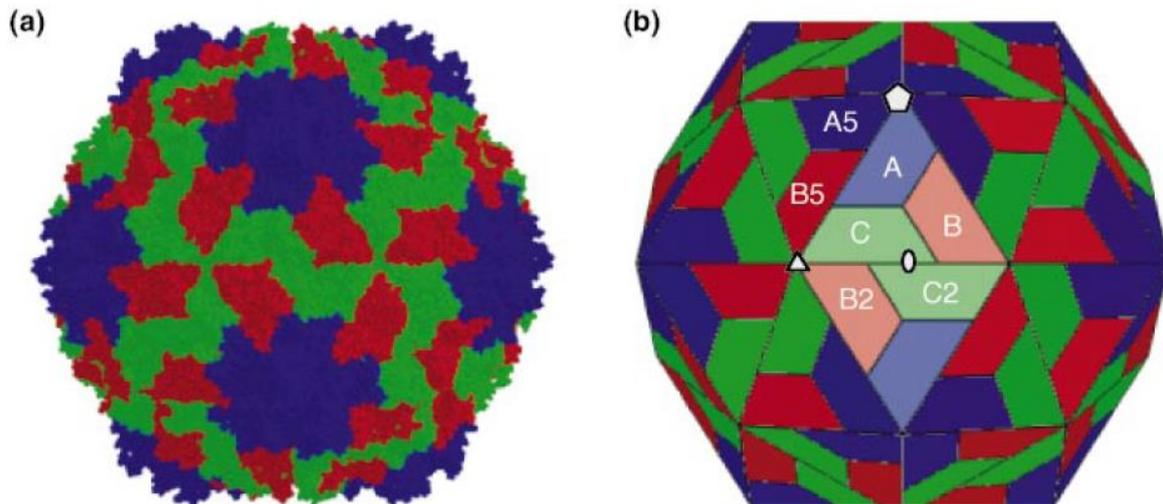


Figure 3.51: Structure de la Capsidie du RYMV, Cartes de densité ombrées en trois dimensions de RYMV obtenues par cryo-microscopie électronique. La capsidie est composée de 180 copies d'un seul type de polypeptide organisées selon une symétrie quasi-équivalente  $T=3$ . L'unité asymétrique icosaédrique contient trois sous-unités : A (en bleu), B (en rouge) et C (en vert). Chacune de ces trois sous-unités possède la même séquence d'acides aminés, mais elles occupent des environnements chimiques légèrement différents. (a) Modèle en remplissage d'espace de la capsidie. Tous les atomes sont représentés comme des sphères d'un diamètre de 1,8 Å. (b) Représentation schématique de la capsidie. Chaque trapèze représente un sandwich bêta avec une topologie en "rouleau de gelée" du même polypeptide. Les désignations des lettres sont typiques pour les virus avec une symétrie quasi-équivalente  $T=3$ . Les axes de symétrie de l'icosaédre sont également indiqués (en blanc) : un pentagone pour l'axe à 5 côtés, un triangle pour l'axe à 3 côtés et un ovale pour l'axe à 2 côtés. Les types de sous-unités sélectionnés sont étiquetés comme A, B ou C ; les numéros suivant la lettre indiquent des positions liées par la symétrie icosaédrique à A, B et C.

Les capsides de virus de la famille des Sobemovirus sont stabilisées en présence d'ions divalents comme le  $Ca^{2+}$  et grâce aux interactions protéine-protéine dépendantes du pH et aux interactions électrostatiques protéine-ARN. La capsidie de RYMV, en absence de  $Ca^{2+}$  et dans des milieux légèrement basiques peut gonfler, cependant la fonction biologique de ce virus gonflé est encore inconnue [25], (Figure 3.13).

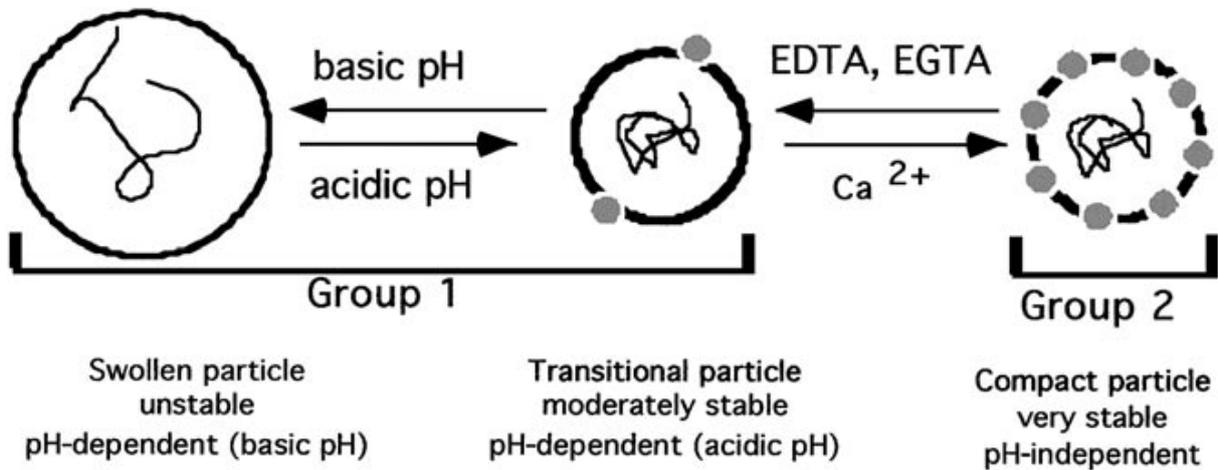


Figure 3.52: Un modèle schématique des relations entre les particules de RYMV, groupe 1 (gonflées et de transition) et du groupe 2 (compactes) et qui peuvent être interconverties par des variations de pH et de Ca<sup>2+</sup>.

La capside de RYMV présente un point isoélectrique d'environ 6 [26], avec à la surface plusieurs acides aminés chargés : sur les 3 sous-unités A-B-C, il y a 11 aspartates (74, 79 et 215 sur les 3 sous-unités et 65A et 65B), 3 arginines (102A, 133A, 133B) et 10 lysines (67, 180 et 210 sur les 3 sous-unités et 99B) (Figure 3.14).

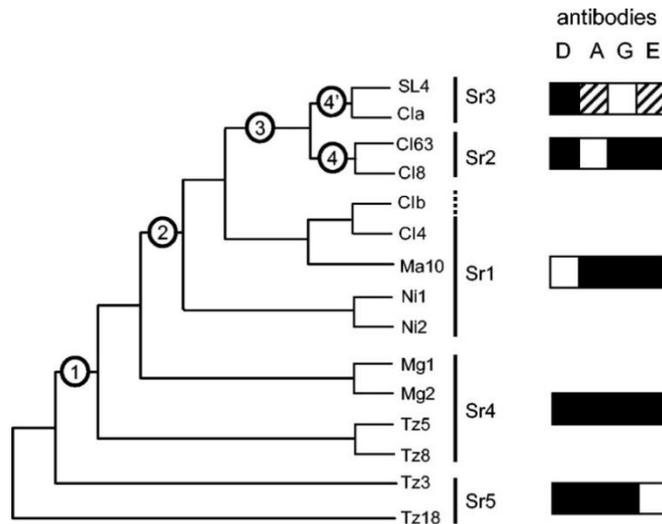
```

MARKGKKTNS  NQGQQGKRKS  RRPRGRSAEP  QLQRAPVAQA  SRISGTVPGP
LSSNTWPLHS  VEFLADFKRS  STSADATTYD  CVPFNLPRVW  SLARCYSMWK
PTRWVVVYLP  EVSATVAGSI  EMCFLYDYAD  TIPRYTGKMS  RTAGFVTSSV
WYGAEGCHLL  SGGsARNAVv  ASMDCSRvGW  KRVTSSIPSS  VDPNVVNTIL
PARLAVRSSI  KPTVSDTPGK  LYVIASMLR  DPVDPTLNT
  
```

Figure 3.53: Séquence de la protéine de la capside de RYMV. Les acides aminés soulignés et en gras sont à la surface externe de la capside, avec en rouge ceux qui sont chargés positivement, et en bleu négativement.

#### 1.2.2.2. Isolats

Nos collaborateurs du laboratoire PHIM (Plant Health Institut Montpellier) nous ont fourni trois isolats du virus RYMV : Tz3, Mg1 et CI63, provenant de différentes parties d'Afrique. En effet, RYMV est classé en 5 sérotypes majeurs, avec des diversités dans la protéine de la capside. Ces différents sérotypes sont apparues lors d'études immunologiques. Un schéma de l'arbre phytogénétique et les séquences des protéines de la capside des différents isolats étudiés sont indiqués sur la figure 3.15 [27]. Les isolats Tz3, Mg1 et CI63 appartiennent aux familles Sr5, Sr4 et Sr2, respectivement.



- ① Change(s) to E+ : D178G
- ② Change(s) to D- : A70S ; A114T ; T115V
- ③ Change(s) to D+ : S70A ; T114A ; V115A
- ④ Change(s) to A- : A190T
- ④' Change(s) to G- : N53K ; R180T ; L198M ; I209V

Figure 3.54: Cladogramme de 15 isolats représentatifs inféré à partir d'une analyse de parcimonie maximale des séquences complètes. Les sérotypes des isolats ainsi que leur profil antigénique avec les anticorps monoclonaux sont indiqués à droite de la figure. Les nœuds associés aux changements dans la reconnaissance des anticorps monoclonaux sont numérotés sur le cladogramme. Les modifications sérospécifiques correspondantes sont indiquées en bas de la figure. La numérotation des résidus était celle de l'isolat Clb utilisé pour résoudre la structure tridimensionnelle de la CP.

Le virus de la mosaïque jaune du riz est classé en cinq principaux sérotypes ; la diversité moléculaire de la protéine de capsid (CP) est bien établie (Figure 3.16).

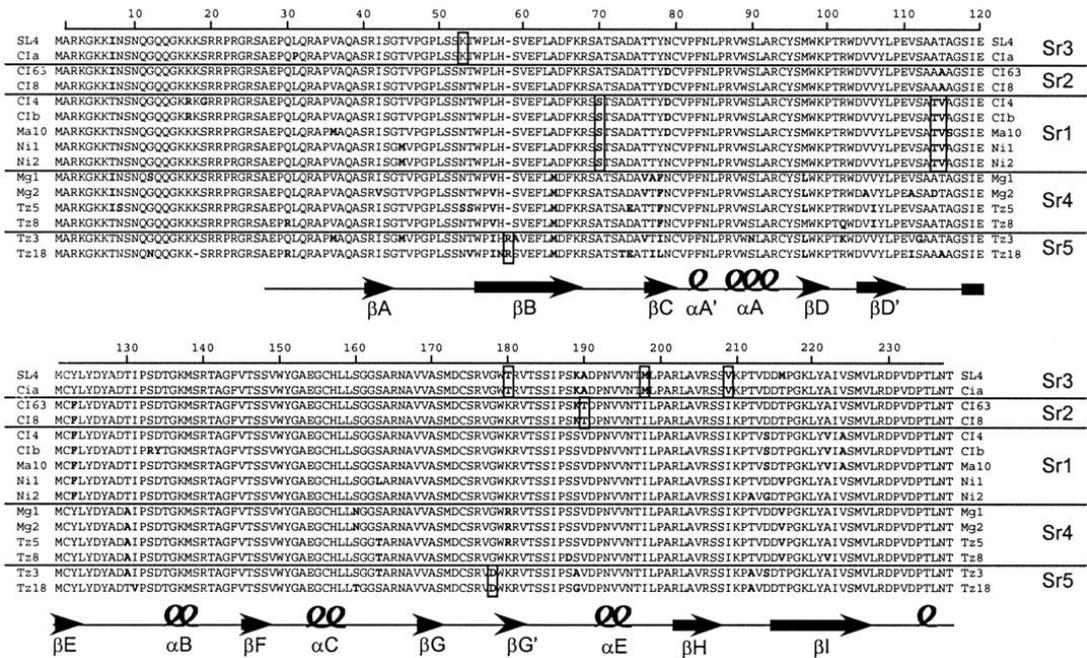


Figure 3.55: Alignement des séquences d'acides aminés de la protéine de capsid de 15 isolats de RYMV. Les séquences sont listées dans le même ordre que celui de l'arbre phylogénétique. Les sérotypes sont indiqués à droite de la figure. Pour chaque position variable par rapport à la séquence consensus, les différences d'acides aminés sont mises en gras. Les positions sérospécifiques (acides aminés conservés dans tous les isolats d'un sérotype mais différents dans les autres sérotypes) sont encadrées. Les emplacements des feuillettes  $\beta$  (flèches noires) et des hélices  $\alpha$  (ressorts noirs) sont basés sur leur position dans la structure cristalline aux rayons X de la chaîne A de RYMV C1b.

Les différences en acides aminés entre les trois isolats sont indiquées dans le tableau 3.1. Les acides aminés 115, 180, 190, 212 et 214 sont sur la surface externe de la capsid.

Position	C163	Mg1	Tz3
115	A	T	T
123	F	Y	Y
160	S	N	S
180	K	R	K
190	T	V	V
212	T	T	A
214	D	D	S

Tableau 3.12: Variations des acides aminés entre les trois isolats C163, Mg1 et Tz3 en fonction des positions stéréospécifiques identifiées dans la structure cristalline de la capsid.

La suite de ce travail a porté uniquement sur l'isolat Tz3 car les autres isolats n'étaient pas stables au cours du temps, et souvent l'ARN était relargué (Figure 3.17).



Figure 3.56: L'instabilité et la dégradation de l'ARN des isolats Mg1 dans l'eppendorf au fil du Temps.

### 1.2.2.3. Étude de la stabilité in-vitro de RYMV isolat Tz3

Je disposais de deux lots de RYMV, un qui avait été congelé  $-20^{\circ}\text{C}$  et l'autre non. Ces virus étaient conservés dans une solution contenant des ions  $\text{Ca}^{2+}$ . J'ai dialysé ces solutions à pH 5 en présence d'EDTA afin d'éliminer le  $\text{Ca}^{2+}$  à la surface des virus et tester leur stabilité, en fonction de différents paramètres comme le pH, la température et la présence de dénaturants. J'ai donc 4 échantillons dont la dénomination est indiquée dans le tableau suivant (Tableau 3.2):

<b><i>RYMV-1</i></b>	<b><i>RYMV-2</i></b>	<b><i>RYMV-3</i></b>	<b><i>RYMV-4</i></b>
<i>RYMV non congelé et avant dialyse</i>	<i>RYMV non congelé et après dialyse</i>	<i>RYMV congelé et avant dialyse</i>	<i>RYMV congelé et après dialyse</i>

Tableau 3.13 : les quatre échantillons de deux lots de RYMV (RYMV-1, RYMV-2, RYMV-3, RYMV-4) soumis ou non à la congélation et à la dialyse, utilisés pour analyser la stabilité.

Le spectre d'absorption des virus présente un maximum à 260 nm, caractéristique de l'absorbance des ARN. L'absorbance à 280 nm est plus caractéristique des protéines de la capsid. L'indice de pureté du virus  $r$  est le rapport  $A_{260}/A_{280}$  des deux absorbances à 260 et 280 nm. Plus le  $r$  est proche de  $r$  théorique d'une valeur de 1,5, plus le virus est considéré comme pur avec son ARN dans sa capsid. Les 4 échantillons ont donné des valeurs de  $r$  compris entre 1,24 et 1,37, proche du  $r$  théorique. Les mesures en DLS menées sur RYMV en présence de  $\text{Ca}^{2+}$  (RYMV-1) à pH 5 montre un seul pic avec un diamètre de  $28 \pm 1$  nm (Figure 3.18) comme décrit dans la littérature [23].

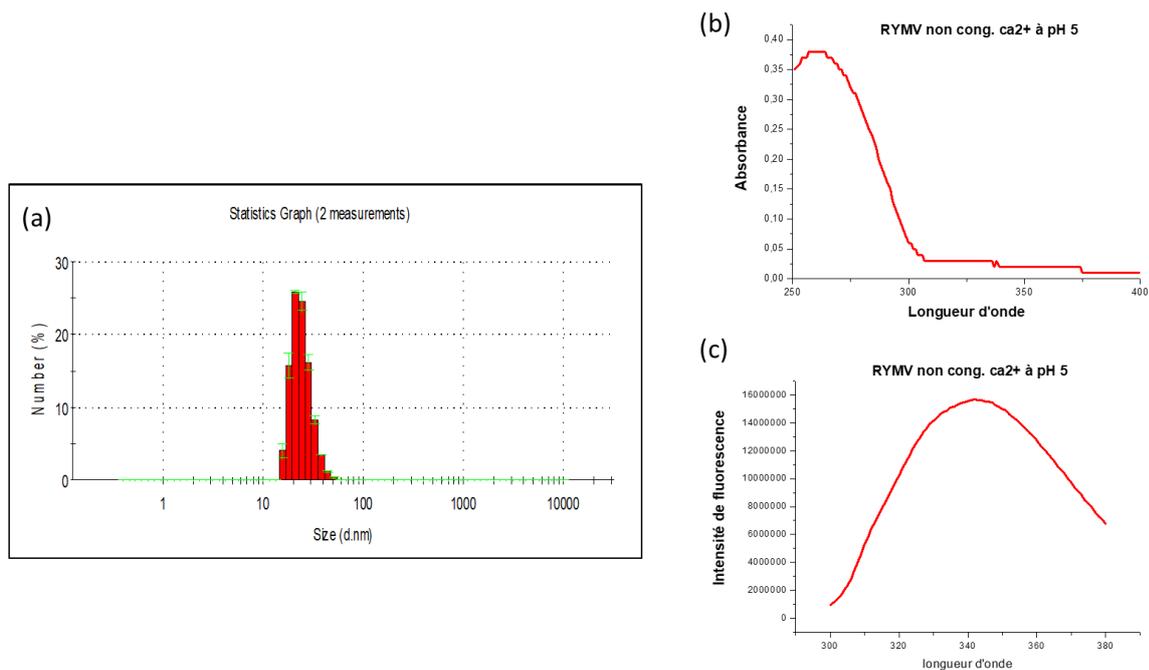


Figure 3.57: Caractérisation de RYMV en présence de Ca<sup>2+</sup> à pH 5 (RYMV-1). (a) Mesures DLS, (b) Analyses d'absorbance et (c) Études de fluorescence.

Pour étudier la stabilité des 4 échantillons, nous avons utilisé la spectroscopie de fluorescence, et la DLS. La DLS permet de déterminer le rayon hydrodynamique de la capsid et la présence d'agrégat ou s'il y a désassemblage de celle-ci. En fluorescence, la longueur d'onde d'excitation est de 280 nm correspond au maximum d'absorption de la capsid protéique. La variation de la longueur d'onde maximale d'émission du virus est étudiée. Un déplacement bathochrome correspond à une dénaturation des protéines de la capsid tandis qu'un déplacement hypsochrome à une agglomération des particules virales (Figure 3.19).

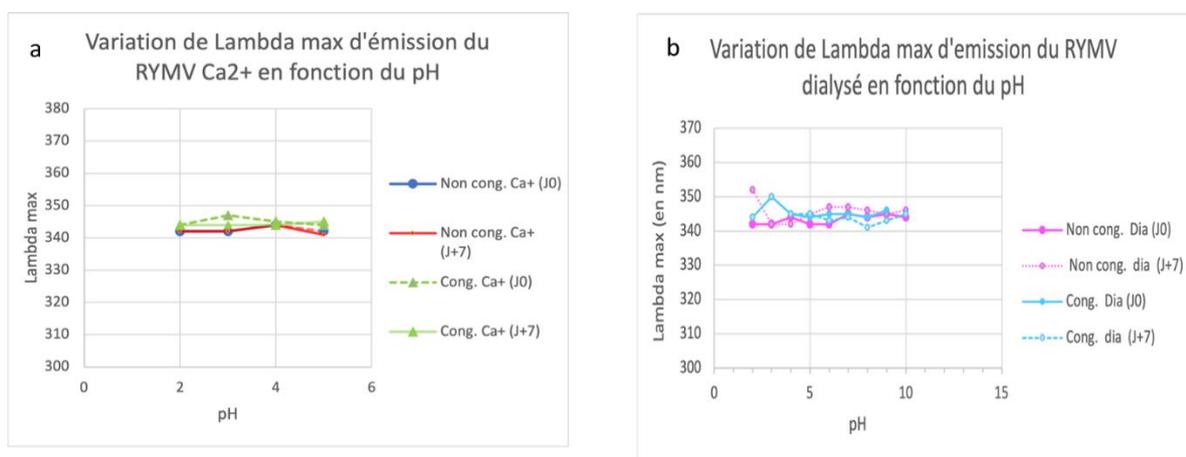


Figure 3.58: Variations de la longueur d'onde maximale d'émission de RYMV à 0,1 mg/ml : comparaison entre les états congelé et non congelé, en présence de Ca<sup>2+</sup> (a) et dialysé (b) à Jour 0 et Après 7 Jours en fonction du pH.

En présence de  $\text{Ca}^{2+}$ , il n'est pas possible de travailler à des pH élevés, car celui-ci précipite. Dans la gamme de pH étudié (2 à 6) aucune modification spectrale n'a été observée pour RYMV-1 ou RYMV-3, même après plusieurs jours à ces pH, confirmant le rôle du calcium dans la stabilité de la capsidie à dans des milieux légèrement acides ou très acide. Des mesures en DLS confirment la stabilité de la capsidie. En revanche, après dialyse en présence d'EDTA, c'est-à-dire sans  $\text{Ca}^{2+}$  dans le milieu, les mesures de DLS indiquent un diamètre hydrodynamique constant quel que soit le pH au début, puis ce diamètre augmente au bout de 7j et à partir de pH 6 (35 nm). Cependant les spectres de fluorescence ne semblent pas être affectés, nous supposons donc que la capsidie a gonflée (à pH 6) sans que les protéines soient dénaturées. A pH 2, la longueur d'onde maximum d'émission se déplace de 10 nm vers le rouge, signifiant un début de dénaturation des protéines de la capsidie, sans désassemblage car le diamètre hydrodynamique reste inchangé.

En augmentant la température de 20 à 80 °C, on observe une diminution de l'intensité de fluorescence, et des déplacements légèrement bathochromes du maximum d'émission, indiquant un début de dénaturation de la capsidie. Cette dénaturation est réversible pour RYMV-1 et RYMV-4, car après refroidissement à température ambiante, on retrouve les spectres initiaux. Dans le cas de RYMV-2 et RYMV-3, la dénaturation thermique semble irréversible, car le maximum d'émission augmente de 8 et 32 nm, respectivement, après retour à température ambiante (Figure 3.20).

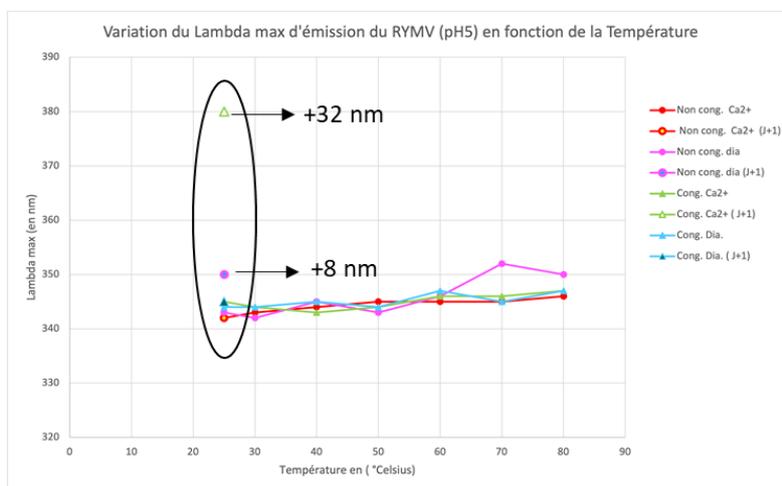


Figure 3.59: Influence de la température sur la variation de la longueur d'onde maximale d'émission du RYMV-1 (en rouge), du RYMV-2 (en rose), du RYMV-3 (en vert) et du RYMV-4 (en bleu).

J'ai également étudié la dénaturation de RYMV en présence de SDS, guanidine ou DTT. L'expérience de dénaturation en présence de SDS a été effectuée sur l'échantillon RYMV-4 à pH 6. On observe une diminution de l'intensité de fluorescence avec un déplacement bathochrome faible de 5 nm (Figure 3.21- a). La concentration finale de SDS étant de 11 mM,

elle semble insuffisante pour dénaturer la capside. La Figure 3.21- b montre que la guanidine même à des concentrations élevées, n'est pas capable de dénaturer ou désassembler la capside. En revanche en présence d'une concentration d'environ 70 mM en DTT (Figure 3.21- c) on observe un déplacement bathochrome de 13 et 11 nm pour RYMV-2 et RYMV-4, respectivement. La concentration de DTT utilisée étant faible, nous n'avons pu observer le désassemblage de la capside.

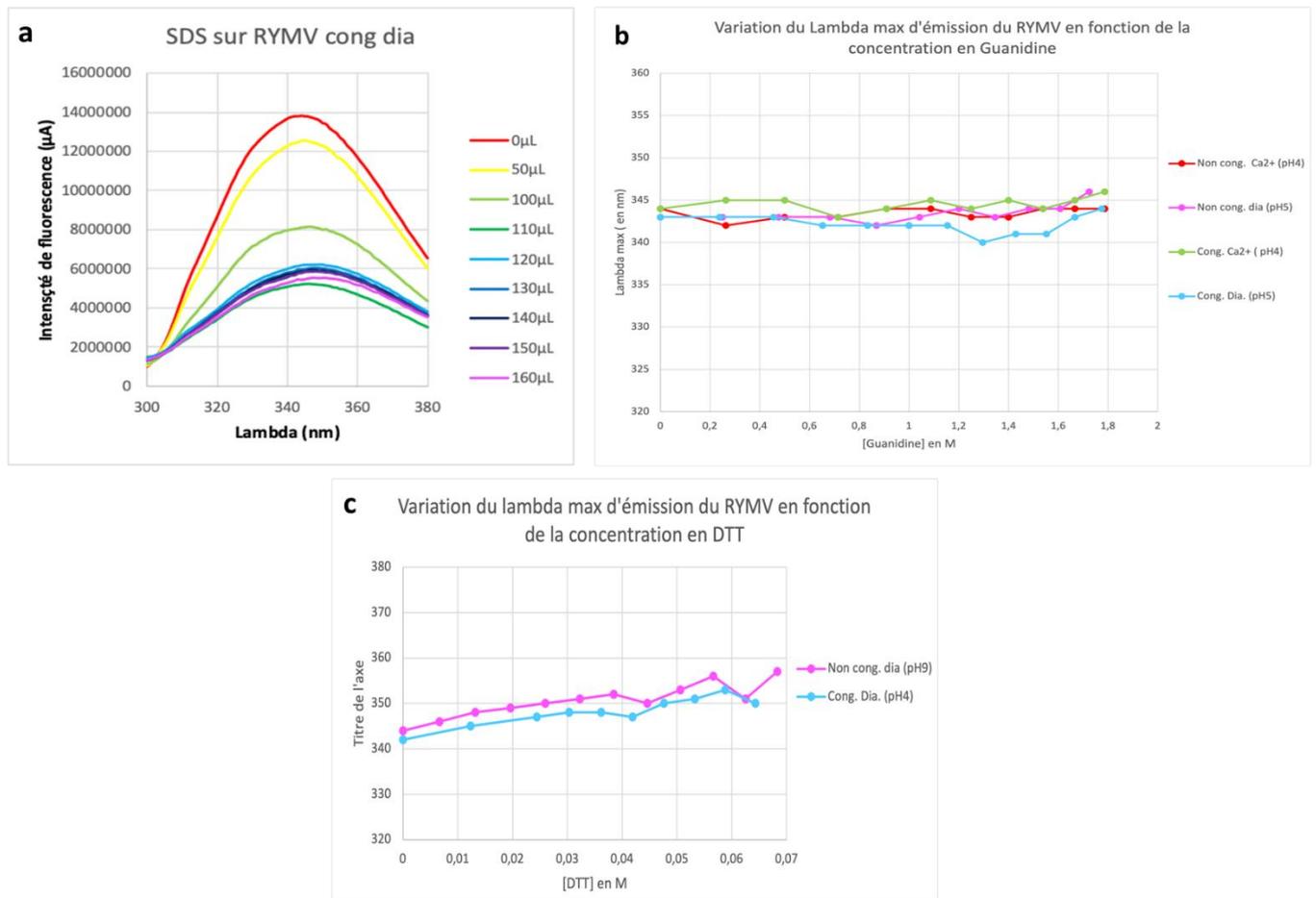


Figure 3.60: (a) Spectre d'émission du RYMV congelé et dialysé à un pH de 6 en fonction du volume de SDS ajouté à 0,2%. (b) Influence de la concentration de Guanidine sur la variation de la longueur d'onde maximale d'émission du RYMV-1 (en rouge), du RYMV-2 (en rose), du RYMV-3 (en vert) et du RYMV-4 (en bleu). (c) Variation de la longueur d'onde maximale d'émission pour le RYMV-2 (en rose) et le RYMV-4 (en bleu) en fonction de la concentration de DTT.

Nous avons étudié la stabilité de plusieurs lots de RYMV en présence ou absence de  $\text{Ca}^{2+}$ , selon plusieurs paramètres physico-chimiques (T, pH, agents dénaturants). Nous avons confirmé le rôle de  $\text{Ca}^{2+}$  dans la stabilité de la capside et ce quel que soit le pH. On peut envisager de fonctionnaliser le virus en augmentant la température puisque sa capside semble résister aux variations de température. Cependant, dans les conditions expérimentales utilisées, nous n'avons pas pu désassembler entièrement la capside.

## **2. Assemblage des nanoparticules magnétiques sur différents échafaudages par Couplage EDC/NHS**

Dans la littérature scientifique, il a été documenté précédemment que des nanoparticules d'or (AuNPs) ont été greffées à la surface du CPMV, un virus de forme icosaédrique. Cette modification a été rendue possible par une mutation de la protéine de la capsid, qui a permis la substitution par un résidu de cystéine à la surface de cette capsid, offrant ainsi plusieurs sites pour une liaison covalente avec les AuNPs [28][29][30][31]. De plus, une récente étude a montré aussi le greffage des AuNPs sur le TYMV en utilisant différentes stratégies chimiques pour permettre une fixation covalente, en vue de développer de nouveaux nano-bio-hybrides [16].

La surface du virus TYMV est riche en groupes carboxylates issus des résidus d'acides aminés comme l'aspartate ou le glutamate. Elle contient également des groupes amines provenant de la lysine ou de l'arginine. Ces groupes sont cruciaux pour diverses réactions chimiques, y compris la modification de la surface virale ou sa liaison à d'autres molécules, offrant des opportunités de réactions avec d'autres groupes fonctionnels pour former des liaisons amides ou d'autres types de liaisons chimiques.

Au cours de mes recherches doctorales, j'ai utilisé deux approches chimiques pour fixer de manière covalente des nanoparticules magnétiques, des oxydes de fer de type maghémite (NPs), qui avaient été synthétisées et fonctionnalisées avec du citrate (comme expliqué au chapitre 2), à la surface du TYMV afin de développer de nouveaux nano-biohybrides magnétiques à base de virus et j'ai également évalué l'efficacité de ces stratégies.

La première méthode consiste à établir une liaison amide entre les NPs fonctionnalisées avec des groupes carboxylates (NPs@Citrate) et la protéine de la capsid (Figure 3.22, 1<sup>ère</sup> stratégie). La seconde méthode résulte de la modification de la capsid du TYMV, de manière à introduire des catéchols à sa surface (Figure 3.22, 2<sup>ème</sup> stratégie) pour que les catéchols forment une liaison de coordination avec le fer.

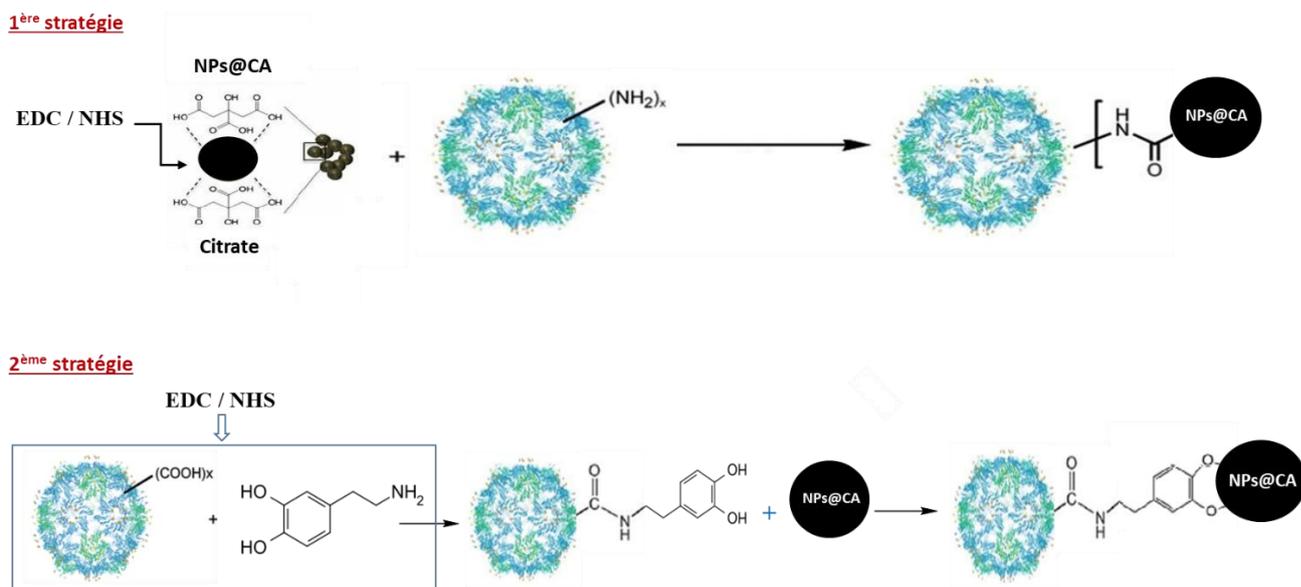


Figure 3.61 : Représentation schématique des deux stratégies chimiques utilisées pour lier des nanoparticules d'oxyde de fer (NPs) à la surface de TYMV

## 2.1. TYMV

### 2.1.1. Première stratégie

Dans le cadre de la première stratégie (Figure 3.22, 1<sup>ère</sup> stratégie), les groupes amines présents en surface permettent de réagir avec les groupes carboxylates des NPs@Citrate par le biais d'une réaction EDC/NHS. Cela conduit à la formation de liaisons amides, ce qui permet de fixer les NPs@Citrate à la surface du virus TYMV.

Dans un premier temps, j'ai utilisé les paramètres expérimentaux, identiques à ceux utilisés précédemment pour les nanoparticules d'or [16]. Cela implique l'utilisation d'une concentration finale de 2 mM d'EDC (carbodiimide éthylènediamine) et de 5 mM de NHS (N-hydroxysuccinimide), avec une période d'incubation de 24 heures dans un tampon MES à pH 6 et un ratio Nanoparticules/ TYMV : 100/1.

Par la suite, les nano-biohybrides résultants de ce greffage ont été séparés des autres composants par l'électrophorèse sur gel d'agarose. La migration du TYMV et du système greffé va de la cathode (-) à l'anode (+) sous l'influence du champ électrique, dans un tampon TBE à pH 8,0. Cette migration correspond à la charge négative du virus et des nouveaux nano-biohybrides à ce pH. Pour mettre en évidence cette migration, le gel a ensuite été coloré avec du Bleu de Coomassie, un colorant couramment utilisé pour la détection des protéines. Pour chaque électrophorèse sur gel d'agarose, trois bandes sont apparues. La bande 1

représente les NPs@Citrate greffés au TYMV, la bande 2 les NPs@Citrate non greffés et la bande 3 la capsidie native du TYMV coloré avec bleu de Coomassie, respectivement.

Avant purification, des mesures de diffusion de lumière dynamique (DLS) ont également été effectuées pour évaluer les modifications de la taille hydrodynamique post-greffage, incluant les analyses de taille des nanoparticules, du virus et après le greffage NPs@Citrate-TYMV, sans digestion avec agarase, afin d'évaluer le succès du greffage (Figure 3.23). L'observation des résultats a révélé une migration plus lente de la bande 1 comparativement à la bande 2, reflétant leurs différences de taille (Figure 3.23-a).

L'analyse par DLS (Figure 3.23 -b) a indiqué des tailles de 10 nm pour les nanoparticules seules, de 28 nm pour le virus seul, et de 90 nm pour le système NP-Citrate@TYMV post-greffage. Ces observations, tant en électrophorèse qu'en DLS, confirment le succès du greffage des NPs@Citrate sur la capsidie de TYMV.

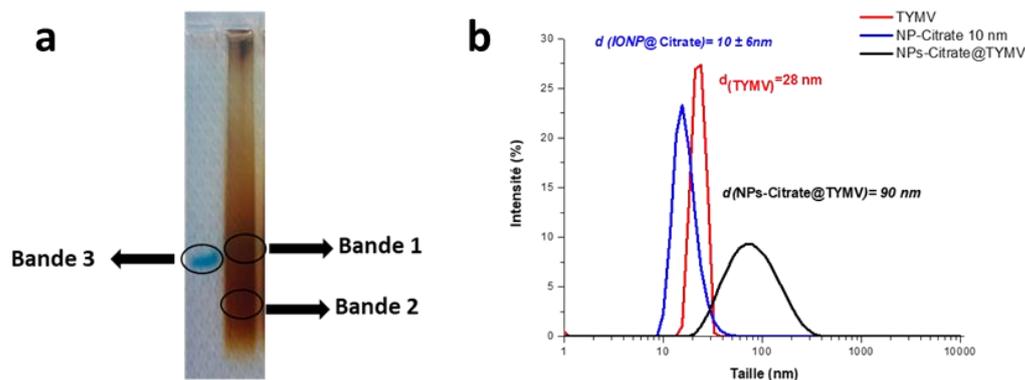


Figure 3.62: (a) Électrophorèse sur agarose du TYMV greffé avec des NPs@Citrate de 10 nm dans tampon MES de 0.5 M (pH 6) en utilisant la première stratégie. Bande 1 : TYMV greffé, Bande 2 : NPs@Citrate libre et Bande 3 : TYMV seul. (b) Mesure de DLS. Distribution de la taille des particules du TYMV (rouge), Nps@citrate de 10 nm (bleu) du TYMV greffé avec des NPs@Citrate de 10 nm (noir).

Le greffage a été effectué avec succès ; néanmoins, la recherche des conditions expérimentales optimales se poursuit, en variant plusieurs paramètres pour greffer les NPs@Citrate de 10 nm au virus TYMV, dans l'objectif d'affiner l'efficacité du processus de greffage.

#### 2.1.1.1. NHS : présence ou absence à divers pH

Dans la première approche, j'ai greffé des NPs@Citrate sur la capsidie du virus en utilisant des liaisons amides, en activant le réactif EDC, soit avec, soit sans NHS, dans un même tampon à différents pH. Le ratio entre les NPs@Citrate et le TYMV était de 25/1.

La formation optimale des liaisons amides se situe entre un pH de 4,0 et 6,0 [32][33]. En se basant sur cette information, des expériences de greffage ont été menées à des pH de 4,5, 6,0 et 10,0, en utilisant l'EDC comme unique activateur. Sur le gel d'électrophorèse, les puits sont définis ainsi : puits 1 dans un tampon MES 0,5 M pH 4,5, puits 2 dans un tampon MES 0,5 M pH 6,5, et puits 3 dans un tampon MES 0,5 M pH 10. Pour améliorer le rendement de la réaction, le NHS a été ajouté à la réaction avec l'EDC, menant aux puits 4, 5 et 6, effectués respectivement dans les mêmes solutions tampons.

Selon les résultats de l'électrophorèse, aucune bande correspondant au greffage NPs@Citrate-TYMV n'a été détectée, indiquant des mauvaises conditions de greffage. Par ailleurs, des agrégats ont été observés dans les puits 3, 4 et 6, particulièrement lors de l'utilisation de NHS dans un tampon à pH 4 et avec ou sans NHS dans un tampon à pH 10 (Figure 3.24). Ces résultats suggèrent que le milieu acide bloque l'activation du NHS, menant à l'agrégation, et le milieu basique favorise aussi l'agrégation des NPs@Citrate lors des réactions de greffage. Il apparaît donc que le pH du milieu réactionnel joue un rôle crucial dans la formation d'agrégats.

Mes expériences n'ont pas conduit à des améliorations significatives du greffage. Cette observation soulève des interrogations sur les paramètres à ajuster pour un greffage efficace et souligne la nécessité d'expérimentations supplémentaires pour optimiser les conditions de greffage. Pour les essais suivants, le milieu sera donc modifié, choisissant un environnement à base d'eau.

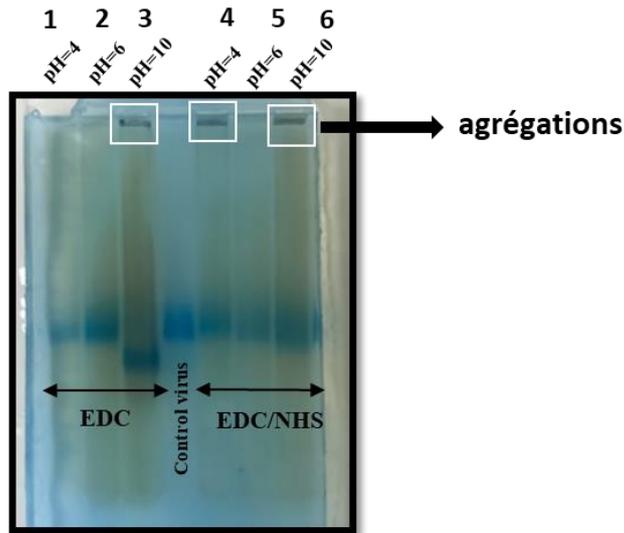


Figure 3.63: Électrophorèse sur agarose du TYMV greffé avec des NPs@Citrate de 10 nm, traité à différents pH, et coloré avec le Bleu de Coomassie en utilisant le réactif EDC, soit avec l'ajout de NHS, soit sans celui-ci, dans un tampon MES 0,5 M. puits 1 et 4 : pH 4,5 ; puits 2 et 5 : pH 6 ; puits 3 et 6 : pH 10.

#### 2.1.1.2. De la solution tampon à l'eau pure

L'expérience a été réalisée de nouveau avec l'eau M-Q (ou Milli-Q, une eau ultrapure, débarrassée de la plupart de ses impuretés comme les ions, les matières organiques et les micro-organismes) comme solvant, tout en conservant les mêmes paramètres que précédemment : concentrations finales de 2 mM pour l'EDC et 5 mM pour le NHS, un temps d'incubation de 24h mais en augmentant le rapport NPs@Citrate/virus à 100/1. L'électrophorèse sur gel d'agarose a mis en évidence trois bandes distinctes. La bande 1, en migrant plus lentement comparée à la bande 2, révèle une taille supérieure. La bande 3, situant entre les deux premières, présente un léger décalage par rapport à la bande 1 (Figure 3.25-a).

L'analyse par DLS (Figure 3.25-b) a confirmé un changement de taille après le greffage : 10 nm pour les nanoparticules seules, 28 nm pour le virus seul et 90 nm pour le système NP-Citrate@TYMV, des valeurs similaires à la première expérience. Les résultats étant identiques dans les milieux MES ou eau, l'eau a été retenue par commodité pour les prochains essais.

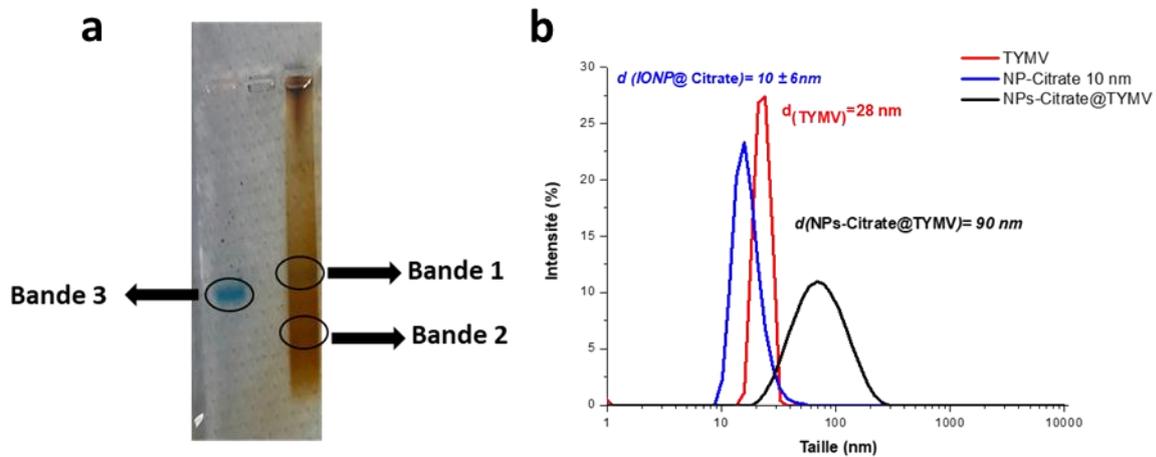


Figure 3.64: (a) Électrophorèse sur agarose du TYMV greffé avec des NPs@Citrate de 10 nm dans de l'eau M-Q. Bande 1 : NPs@Citrate-TYMV, Bande 2 : NPs@Citrate libres, Bande 3 : TYMV seul. (b) Analyse par DLS. Distribution de la taille des particules pour le TYMV (en rouge), les NPs@Citrate de 10 nm (en bleu) et le TYMV greffé avec des NPs@Citrate de 10 nm (en noir).

### 2.1.1.3. Ajustement du rapport NPs@Citrate/Virus

Pour examiner le rapport optimal entre les NP@Citrate et le TYMV, et maximiser le rendement de la synthèse de nouveaux matériaux, des expériences ont été réalisées avec un rapport NPs@Citrate/TYMV de 50/1, tout en conservant la même quantité de TYMV. La Figure 3.26 -a montre un gel d'agarose indiquant trois bandes, similaires aux expériences précédentes, avec une séparation légère entre la bande 1 et la bande 3, confirmant une différence de taille. Aucune agrégation n'a été observée dans le puits du gel. Les mesures de DLS ont révélé une taille hydrodynamique accrue de NPs@Citrate-TYMV comparativement aux nanoparticules et au virus seuls, atteignant 69 nm (Figure 3.26 -b). Bien que cette taille soit inférieure aux 90 nm observés dans les expériences précédentes, elle indique toujours un succès de greffage, sans infirmer la réussite des tentatives antérieures.

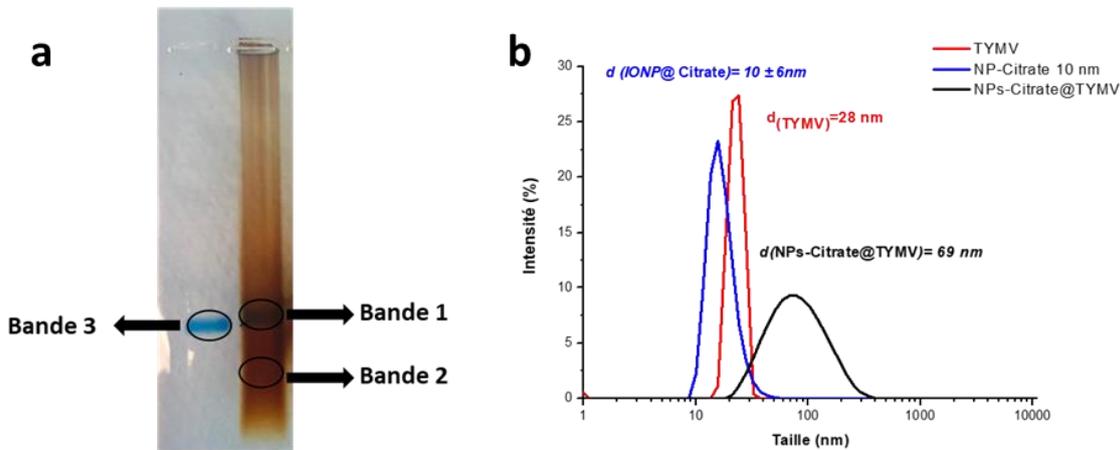


Figure 3.65: (a) Électrophorèse sur agarose du TYMV greffé avec des NPs@Citrate de 10 nm dans de l'eau M-Q avec un rapport NPs@Citrate/TYMV de 50 :1. Bande 1 : NPs@Citrate-TYMV, Bande 2 : NPs@Citrate libres, Bande 3 : TYMV seul. (b) Analyse par DLS. Distribution de la taille des particules pour le TYMV (en rouge), les NPs@Citrate de 10 nm (en bleu) et le TYMV greffé avec des NPs@Citrate de 10 nm (en noir).

Cependant, il est possible de conclure que l'augmentation de la quantité de NPs@Citrate (rapport 100/1) entraîne la formation d'agrégats de nanoparticules lors de l'étape de concentration dans le puits du gel (Figure 3.25). Bien que ce phénomène ne signifie pas nécessairement un échec du greffage (car la bande 1 demeure distincte de la bande 3), il affecte néanmoins la migration. En conséquence, la condition optimale de greffage identifiée implique l'utilisation de l'eau M-Q comme solvant. Bien qu'il n'y ait pas de différence significative observée sur le gel d'agarose entre les rapports NPs@Citrate/TYMV de 50/1 et 100/1 mais une différence est notée au niveau des mesures DLS. Néanmoins, les deux rapports peuvent être utilisés pour un greffage réussi.

#### 2.1.1.4. Modification de la concentration d'EDC/NHS

Cette expérience, menée avec des ajustements de la concentration d'EDC et de NHS, révèle des résultats significatifs. Choisisant une concentration finale de 1,5 mM pour l'EDC et 3,75 mM pour le NHS, une bande distincte (Bande 1) a été observée lors de l'électrophorèse sur gel d'agarose, indiquant un greffage réussi des NPs@Citrate sur la capsid du TYMV. Cette bande est nettement séparée des bandes représentant le TYMV et les NPs@Citrate seuls (Figure 3.27 -a), une conséquence de la taille accrue des nano-objets greffés.

Les mesures DLS ont aussi montré que la taille des NPs@Citrate-TYMV a augmenté pour atteindre 80 nm, comparée aux 28 nm pour le virus seul et 10 nm pour les NPs@Citrate (Figure 3.27 -b). Bien que la taille hydrodynamique de ce greffage est proche de la valeur de

l'expérience de base de 90 nm, ces résultats confirment que le greffage a bien fonctionné dans ces nouvelles conditions.

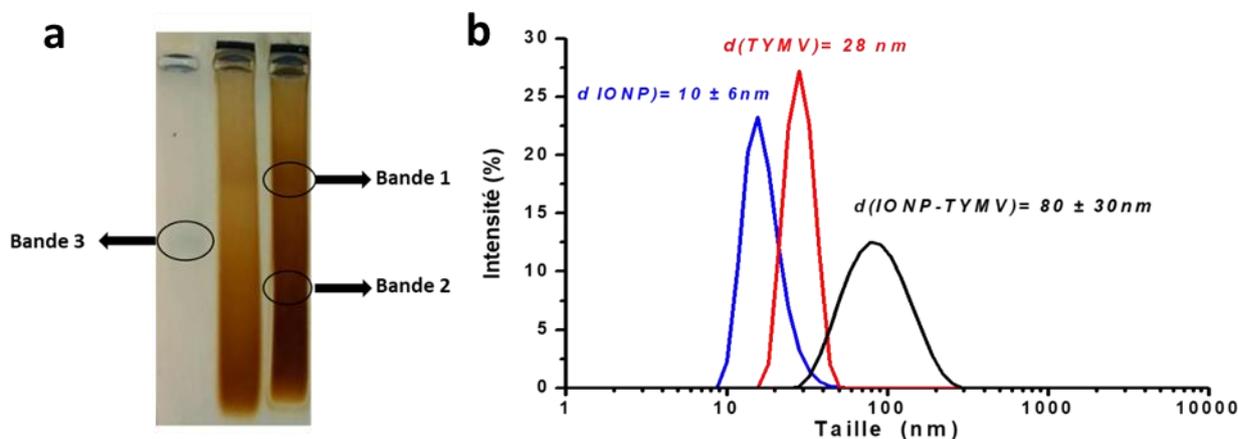


Figure 3.66 : (a) Électrophorèse sur agarose du TYMV greffé avec des NPs@Citrate de 10 nm dans les conditions optimales avec un rapport NPs@Citrate/TYMV de 50 :1. Bande 1 : NPs@Citrate-TYMV, Bande 2 : NPs@Citrate libres, Bande 3 : TYMV seul. (b) Analyse par DLS. Distribution de la taille des particules pour le TYMV (en rouge), les NPs@Citrate de 10 nm (en bleu) et le TYMV greffé avec des NPs@Citrate de 10 nm (en noir).

Pour conclure, les conditions expérimentales retenues pour un greffage optimal incluent l'utilisation de l'eau M-Q comme solvant, des concentrations finales d'EDC/NHS de 1,5 et 3,75 mM, et un rapport NP@Citrate/virus maintenu à 100/1 ou 50/1.

### 2.1.2. Deuxième stratégie

Dans cette méthode, le groupe amine présent à la surface de la dopa réagit avec les groupes carboxylates du virus, et le groupe catéchol avec les nanoparticules d'oxyde de fer, formant une liaison Fe-O (Figure 3.22, 2<sup>ème</sup> stratégie). Plusieurs études ont déjà montré que l'ajout de petites molécules ou même de peptides n'a aucun effet sur la structure protéique de la capsid du virus [20][34]. Avant le greffage des NPs@Citrate, le TYMV modifié est lavé pour éliminer l'excès de DOPA, réalisant la réaction en milieu à base d'eau en raison de la sensibilité des NPs@Citrate au phosphate.

#### 2.1.2.1. Modification du rapport TYMV/ DOPA

L'expérience a été menée en utilisant une concentration finale d'EDC/NHS de 2 mM et 5 mM. Les rapports NPs@Citrate/TYMV ont été définis selon la stratégie précédente afin d'optimiser le rendement, et ils ont été fixés à 1:50, avec un temps d'incubation de 24 h. Cependant, le rapport virus/dopamine a été modifié, allant de 1/10 à 1/200 (Figures 3.28 -a, -b, -c).

L'électrophorèse sur gel d'agarose a validé le greffage, révélant deux bandes distinctes. La bande 1, dans les différentes expériences, représente les NPs@Citrate liés au TYMV @Dopa, et la bande 2, correspond toujours au virus seul.

La mobilité des bandes a aussi apporté des informations importantes. Dans la Figure 3.28 -a, la bande 1 se déplace plus lentement que la bande 2, tandis qu'elle est nettement décalée dans la Figure 3.28 -b. Cependant, la Figure 3.28 -c démontre que les variations du rapport virus/dopamine n'affectent pas significativement le greffage, les bandes étant presque identiques pour les trois rapports.

Les mesures DLS révèlent une augmentation de la taille des NPs@Citrate greffés aux TYMV @Dopa comparé au virus seul, avec des tailles respectives de 75 nm et 90 nm pour les rapports 1/10 et 1/50.

Au vu de ces résultats, considérant le décalage net des bandes et la taille hydrodynamique observée, le rapport virus/dopamine de 1/50 est retenu pour les expériences suivantes de greffage. Ce choix est guidé par la clarté du décalage de la bande et la taille hydrodynamique du complexe greffé.

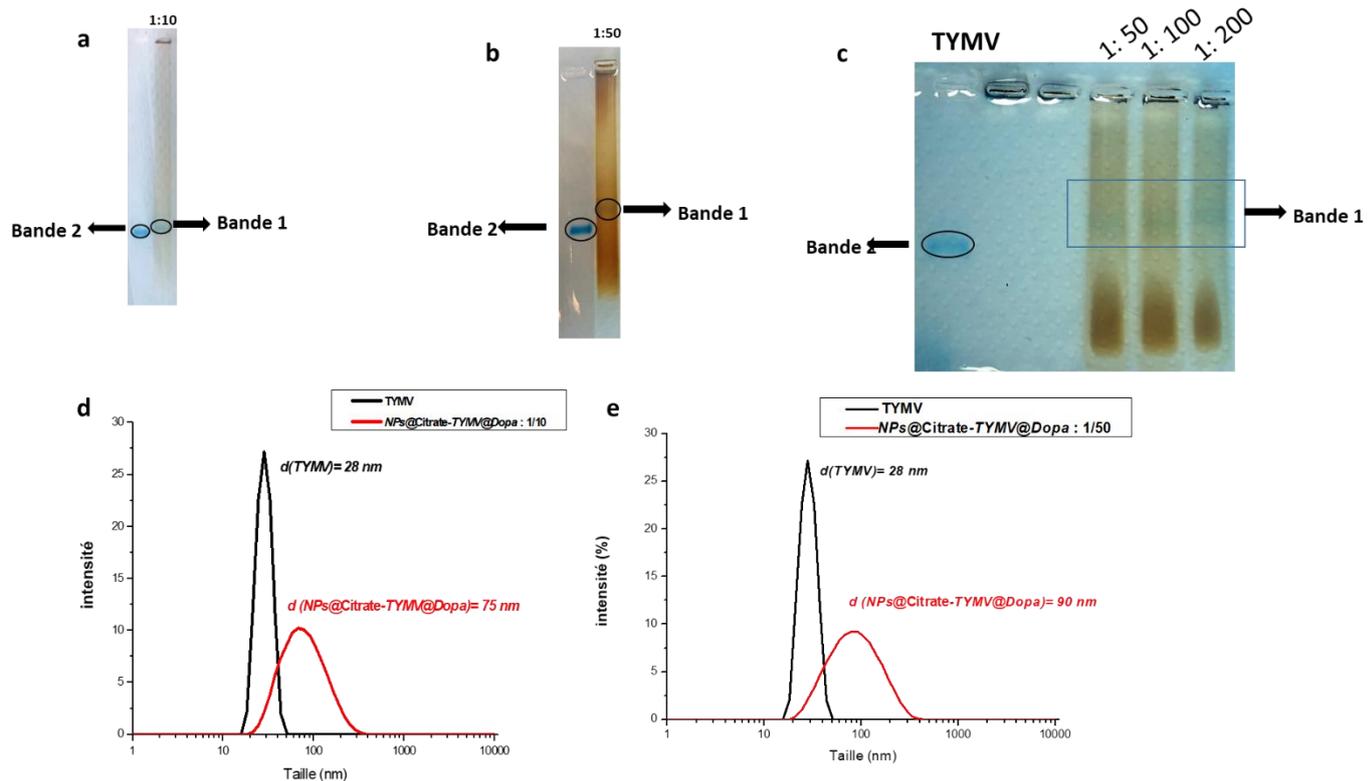


Figure 3.67 : (a) Électrophorèse sur agarose du TYMV modifié avec dopamine greffé avec des NPs@Citrate de 10 nm avec un rapport TYMV/ dopamine de 1 :10. (b) avec un rapport TYMV/ / dopamine de 1 :50. Bande 1 : NPs@Citrate greffé aux TYMV @Dopa, Bande 2 : TYMV seul. (c) avec un rapport TYMV/ dopamine de 1 :50, 1 :100 et 1 :200. (d) Analyse par DLS. Distribution de la taille des particules pour le TYMV (en noir) et le TYMV modifié avec dopamine greffé avec des NPs@Citrate de 10 nm (en noir) avec le rapport TYMV/ dopamine de 1 :10. (e) avec le rapport TYMV/ dopamine de 1 :50.

#### 2.1.2.2. Modification la concentration de EDC/NHS

Une autre expérience a été réalisée en ajustant les paramètres de l'expérience. Le rapport virus/dopamine a été fixé à 1/50, tout comme le ratio virus/nanoparticule, avec une période d'incubation de 24 h. Cette expérience a été réalisée dans un milieu réactionnel aqueux. Les concentrations d'EDC et de NHS ont été révisées à 1,5 mM et 3,75 mM respectivement, remplaçant les concentrations initiales de 2 mM pour l'EDC et de 5 mM pour le NHS. L'analyse par électrophorèse a montré la présence d'une bande distincte (bande 1), témoignant du succès du greffage des NPs@Citrate sur le TYMV modifié (Figure 3.29 -a). Les mesures de DLS ont confirmé ces observations, montrant une taille hydrodynamique d'environ 90 nm par rapport aux échantillons de virus et de NPs@Citrate seuls (Figure 3.29 -b). Ces données confirment la réussite du greffage sous ces nouvelles conditions, désormais établies comme optimales pour le greffage.

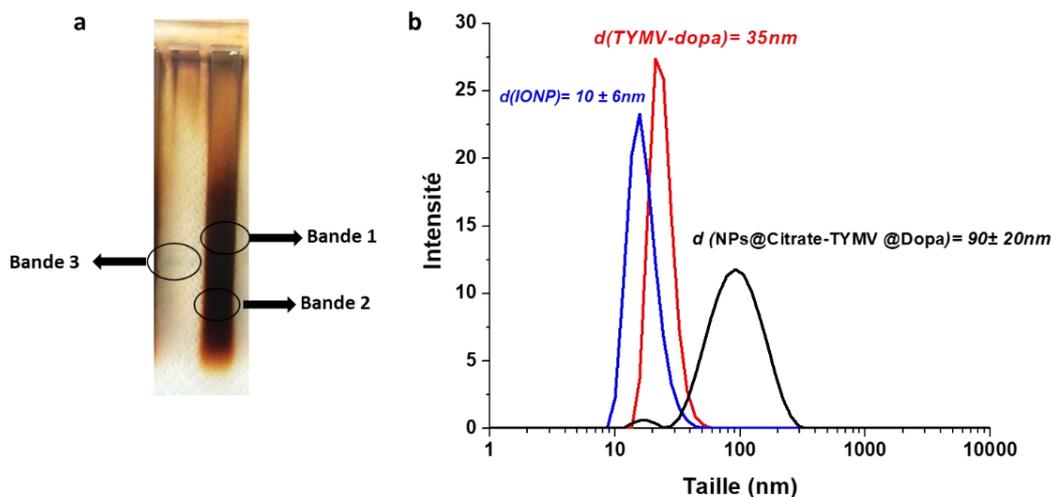


Figure 3.68: (a) Électrophorèse sur agarose du TYMV modifié avec dopamine greffé avec des NPs@Citrate de 10 nm avec une concentration finale d'EDC de 1,5 mM et de NHS de 3,75 mM. Bande 1 : TYMV@Dopa- Nps-Citrate, Bande 2 : Nps-Citrate de 10 nm non greffé, Bande 3 : TYMV@Dopa seul. (b) Distribution de la taille des particules pour le TYMV@dopa (en rouge), les NPs@Citrate de 10 nm (en bleu) et le TYMV modifié avec dopamine greffé avec des NPs@Citrate (en noir).

Après avoir déterminé les conditions expérimentales idéales pour les deux méthodes et noté leur similarité de résultats, j'ai choisi de continuer le greffage avec la première stratégie. Cette décision permet d'éviter une étape supplémentaire, superflue de modification de la surface du virus. Pour valider ces conditions optimales, le greffage a été de nouveau réalisé avec des NPs@Citrate de 5 nm et 15 nm (Figure 3.30 -a). L'électrophorèse a révélé deux bandes nettement distinctes comparées au virus seul. Cependant, des agrégats ont été remarqués avec des NPs@Citrate de 15 nm en raison de leur taille plus grande. Après la purification des bandes récupérées par agarase, les mesures DLS ont confirmé le succès du greffage. Elles indiquent une taille hydrodynamique de 67 nm avec les NPs@Citrate de 5 nm et de 105 nm pour ceux de 15 nm. Ces données sont en accord avec les résultats du greffage des NPs@Citrate de 10 nm, montrant une valeur d'environ 80 nm (Figure 3.30 -b). Ces résultats ont renforcé la validité des conditions expérimentales améliorées.

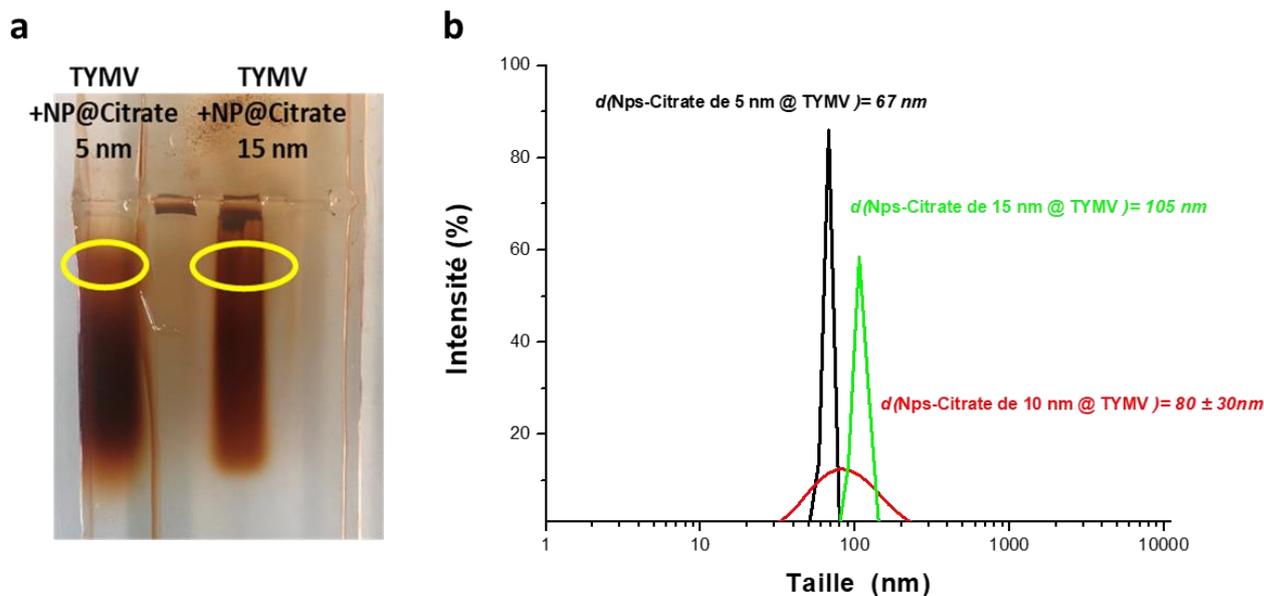


Figure 3.69: (a) Électrophorèse sur agarose du TYMV greffé avec des NPs@Citrate de 5 nm et 15 nm. Cercle jaune 1 représente des Nps-Citrate de 5 nm @ TYMV et Nps-Citrate de 15 nm @ TYMV. (b) Distribution de la taille des particules NPs@Citrate de 5 nm greffé sur TYMV (en noir), NPs@Citrate de 10 nm greffé sur TYMV (en rouge) et NPs@Citrate de 15 nm greffé sur TYMV (en vert).

## 2.2. RYMV

### 2.2.1. Conditions de greffage identiques à celles du TYMV

Pour greffer les NPs@Citrate à la surface du RYMV, j'ai choisi d'utiliser la première stratégie consistant à activer les groupes carboxylates présents à la surface des nanoparticules par la réaction d'activation EDC/NHS. Les conditions expérimentales étaient identiques à celles employées avec le TYMV : une concentration de 2 mM pour l'EDC, 5 mM pour le NHS, un rapport virus/NPs@Citrate de 1 :50 et un temps d'incubation de 24 heures, le tout réalisé dans un milieu réactionnel de phosphate avec une concentration de 20 mM et un pH de 6. Cependant, l'électrophorèse (Figure 3.31 -a) a révélé l'inefficacité de ces conditions de greffage pour le RYMV. Les NPs@Citrate se sont agrégées dans le puits du gel, et la taille hydrodynamique mesurée était de 38 nm (Figure 3.31 -b), se rapprochant fortement de celle du virus seul. Ces observations confirment l'échec du processus de greffage dans ces conditions.

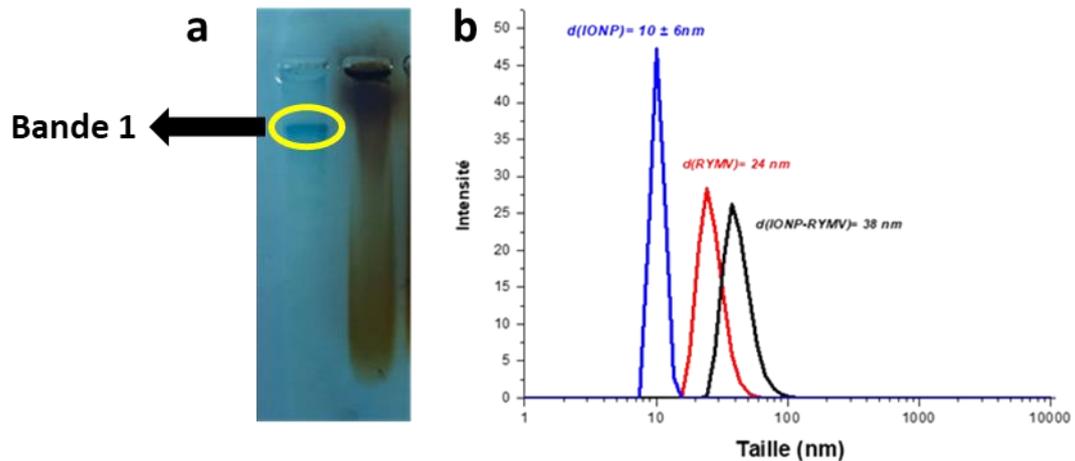


Figure 3.70: (a) Électrophorèse sur agarose du RYMV greffé avec des NPs@Citrate de 10 nm, avec EDC de 2 mM, NHS de 5 mM, un rapport virus/NPs@Citrate de 1 :50, et un temps d'incubation de 24 h. Bande 1 représente RYMV. (b) Distribution de la taille des particules pour le RYMV (en rouge), les NPs@Citrate de 10 nm (en bleu), NPs@Citrate de 10 nm greffé sur RYMV (en noir).

### 2.2.2. Ajustement de la durée d'incubation

Cette expérience a été conduite avec une modification de la durée d'incubation. La réaction a été incubée pendant 48 heures au lieu de 24, tout en maintenant les mêmes conditions expérimentales, avec des concentrations finales de 1,5 mM pour l'EDC et de 3,75 mM pour le NHS et dans milieu réactionnel de phosphate (20 mM et pH 6).

L'électrophorèse a montré une bande 1 plus sombre et plus mobile par rapport à la bande 2, correspondant au virus seul (Figure 3.32 -a). Les mesures de la taille hydrodynamique ont également indiqué une augmentation significative, révélant une taille de 78 nm pour le système NPs@Citrate greffées sur le RYMV (Figure 3.31 -b).

Suite à ces résultats, la durée d'incubation pour le RYMV a été ajustée à 48 heures, qui s'est avérée être une condition plus favorable pour le greffage.

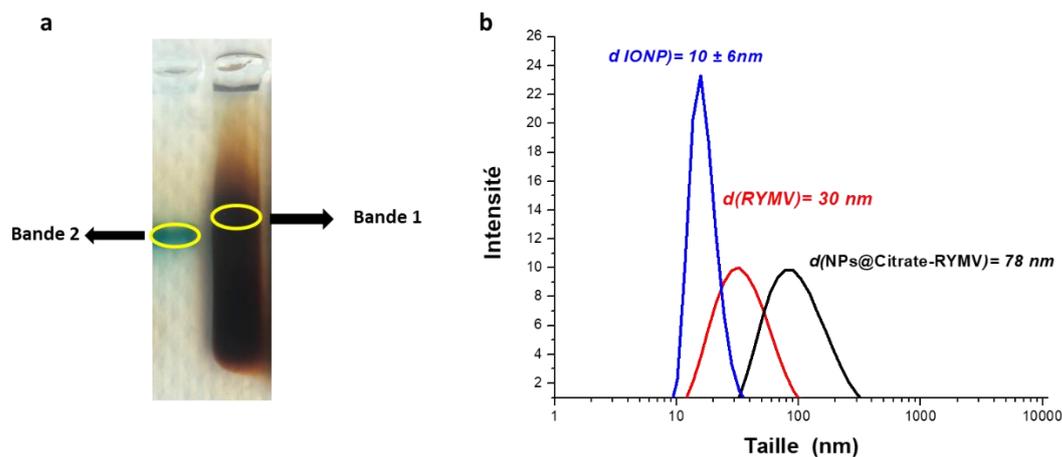


Figure 3.71: (a) Électrophorèse sur agarose du RYMV greffé avec des NPs@Citrate de 10 nm, avec EDC de 1.5 mM, NHS de 3.75 mM, un rapport virus/NPs@Citrate de 1 :50, et un temps d'incubation de 48 h. Bande 1 : représente NPs@Citrate-RYMV et Bande 2 : représente RYMV native. (b) Distribution de la taille des particules pour le RYMV (en rouge), les NPs@Citrate de 10 nm (en bleu), NPs@Citrate de 10 nm greffé sur RYMV (en noir).

### 2.2.3. Ajustement du ratio Virus-Nanoparticule

Dans le cadre de cette expérience, l'objectif principal était de prévenir la formation d'agrégats en modifiant le rapport entre les virus et les nanoparticules. Trois rapports différents ont été testés : 1:25, 1:50 et 1:100. Ces tests ont été réalisés dans des conditions expérimentales constantes, en utilisant des concentrations de 1,5 mM pour l'EDC et de 3,75 mM pour le NHS, et un temps d'incubation de 48 heures. La réaction a été effectuée en milieu de phosphate (20 mM, pH 6).

Malheureusement, les résultats obtenus par électrophorèse ont révélé la formation d'agrégats dans le puits du gel pour chacun des trois rapports testés. Cette formation d'agrégats est probablement due à la présence de sels dans le tampon utilisé, plutôt qu'au rapport entre les virus et les nanoparticules. Néanmoins, le rapport de 1:50 a démontré des résultats légèrement plus positifs. Une petite bande, légèrement plus claire (Bande 1), a été observée, correspondant au greffage des NPs@Citrate à la surface du RYMV (Figure 3.33).

En conséquence, le rapport 1:50 a été retenu comme étant le plus efficace pour cette expérience. La phase suivante du greffage a impliqué un changement du milieu réactionnel, dans le but d'optimiser le greffage et d'éviter la formation d'agrégats indésirables.

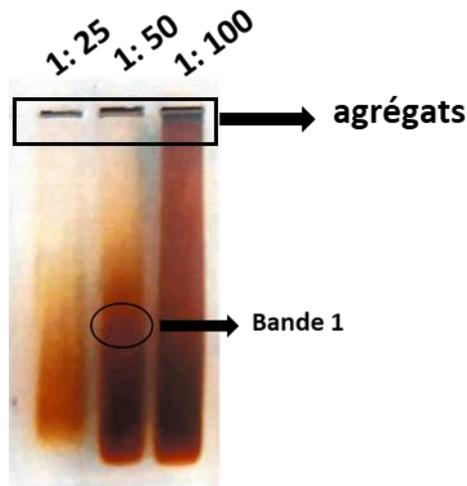


Figure 3.72: Électrophorèse sur agarose du RYMV greffé avec des NPs@Citrate de 10 nm, avec EDC de 1.5 mM, NHS de 3.75 mM, un temps d'incubation de 48 h et trois rapport différents de virus/NPs@Citrate 1 :25, 1 :50 et 1 :100 . Bande 1 : représente NPs@Citrate-RYMV.

#### 2.2.4. Modification du milieu réactionnel

Afin de minimiser la formation d'agrégats dans les puits du gel, et assurer ainsi une migration complète, une expérience de modification du milieu réactionnel a été entreprise. Le greffage a été tenté en utilisant deux milieux différents : de l'eau M-Q et une solution de phosphate à 20 mM (pH 6) pour évaluer et comparer leur efficacité respective.

L'électrophorèse sur gel d'agarose a démontré que le greffage était réussi dans les deux milieux, mais s'est avéré plus efficace dans l'eau M-Q. Dans ce milieu, aucune agrégation n'a été observée dans le puits, et la bande correspondant au greffage était plus nette. En comparaison, le milieu phosphate a montré la présence d'agrégats dans le puits du gel, et une bande de greffage moins distincte (Figure 3.34 -a).

Pour confirmer ces observations, le greffage a été répété dans l'eau M-Q, en maintenant un rapport virus/nanoparticules de 1/50, et des concentrations de 1,5 mM pour l'EDC et de 3,75 mM pour le NHS, avec une période d'incubation de 48 heures. Les résultats ont clairement indiqué une bande distincte (bande 1), témoignant du succès du greffage des NPs@Citrate à la surface du RYMV, avec un décalage notable par rapport à la bande 3 (Figure 3.34 -b).

Les mesures DLS ont approuvé ce succès, indiquant une augmentation de la taille hydrodynamique à 64 nm (Figure 3.34 -c). Suite à cela, la bande correspondant au greffage a été récupérée et analysée en DLS après digestion à l'agarase, confirmant une nouvelle fois le succès du greffage dans l'eau M-Q, avec une taille hydrodynamique de 59 nm (Figure 3.34 -

d). En conséquence, ces conditions expérimentales ont été adoptées comme étant optimales pour le greffage à la surface du RYMV.

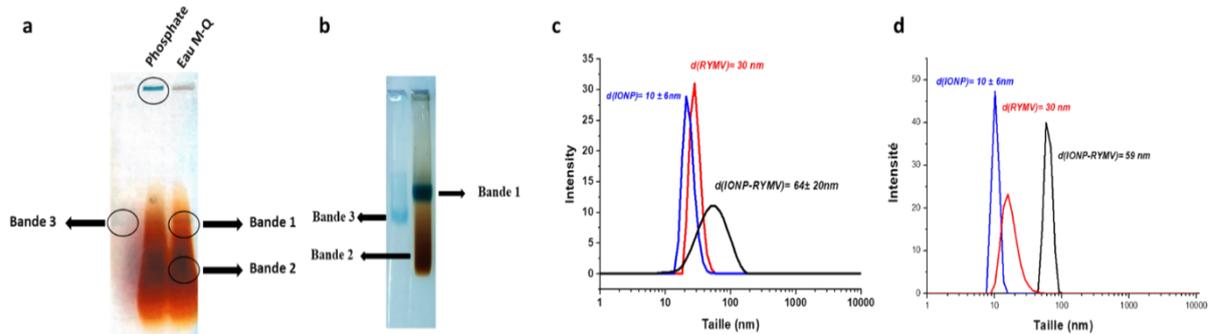


Figure 3.73 : (a) Électrophorèse sur agarose du RYMV greffé avec des NPs@Citrate de 10 nm avec une concentration finale d'EDC de 1,5 mM, de NHS de 3,75 mM, un temps d'incubation de 48 heures, et un rapport virus/NPs@Citrate de 1:50, dans deux milieux réactionnels différents : eau M-Q et tampon phosphate à 20 mM (pH 6). (b) dans l'eau M-Q. Bande 1 : représente les NPs@Citrate-RYMV, Bande 2 : les NPs@Citrate non greffés, et Bande 3 : le RYMV seul. (c) Distribution de la taille des particules pour le RYMV (en rouge), les NPs@Citrate de 10 nm (en bleu), NPs@Citrate de 10 nm greffé sur RYMV (en noir) avant digestion et (d) après digestion.

Après avoir déterminé les paramètres expérimentaux idéaux pour le greffage des NPs@Citrate sur la capsid de RYMV, l'expérimentation a été poursuivie avec des NPs@Citrate de 5 nm et 15 nm pour valider ces conditions optimales.

Les analyses électrophorétiques ont montré un léger décalage de la bande avec les NPs@Citrate de 5 nm par rapport à celle du RYMV non modifié, avec une observation attribuée à des agrégats formés durant la migration électrophorétique (Figure 3.35 -a). En revanche, un greffage avec les NPs@Citrate de 15 nm a révélé une séparation nette et claire. Dans les deux cas de greffage, l'apparition de la bande 1, visible après la coloration au bleu de Coomassie, coïncide avec un greffage réussi, indiquant une augmentation des dimensions des complexes nano-bio-hybrides.

Les mesures DLS ont validé le succès du greffage, mettant en évidence une taille hydrodynamique accrue : 70 nm pour NPs@Citrate de 5 nm-RYMV et 105 nm pour NPs@Citrate de 15 nm-RYMV (Figure 3.35 -b) après la digestion avec agarase. Ces résultats renforcent la fiabilité des conditions expérimentales choisies, établissant ainsi le protocole comme étant optimal pour le greffage sur la surface du RYMV avec les NPs@Citrate de différentes tailles.

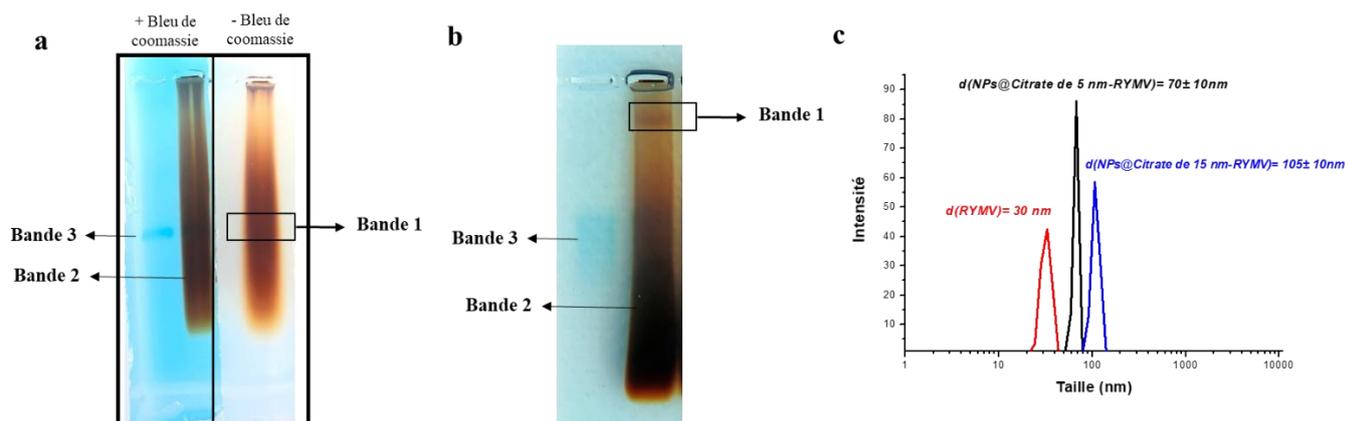


Figure 3.74: Électrophorèse sur agarose du RYMV greffé avec NPs@Citrate (a) de 5 nm et (b) de 15 nm dans les conditions expérimentales optimales. Bande 1 : représente NPs@Citrate-RYMV, Bande 2 : NPs@Citrate non greffé et Bande 3 : RYMV seul. (c) Distribution de la taille des particules pour le RYMV (en rouge), NPs@Citrate de 5 nm greffé sur RYMV (en noir) et NPs@Citrate de 15 nm greffé sur RYMV (en bleu).

En utilisant les conditions optimales préalablement définies, nous avons obtenu des résultats d'électrophorèse exempts d'agrégation, permettant une séparation distincte entre les NPs@Citrate greffées et non greffées, que ce soit pour le virus TYMV ou le virus RYMV. Suite à cela, nous avons procédé à la purification et à la caractérisation de ces nouveaux nano-bio-hybrides magnétiques. Leur analyse approfondie sera réalisée ultérieurement à l'aide de techniques comme la XPS, la TEM et la photothermie.

### 3. Purification et caractérisation des nouveaux nano-bio-matériaux

Après les succès des réactions de greffage, les NPs@Citrate liées de manière covalente aux virus TYMV et RYMV ont été séparés grâce à l'électrophorèse sur gel d'agarose. Les bandes, correspondant aux nouveaux nano-bio-hybrides magnétiques formés, ont été clairement identifiées et digérées avec l'agarase. Après la phase de purification, les solutions contenant les nouveaux nano-bio-hybrides ont été soigneusement stockées à 4°C au réfrigérateur. Ces nano-bio-hybrides, illustrés dans les Figures 3.36 -1 (NPs@Citrate 10 nm -TYMV), -2 (NPs@Citrate 10 nm-TYMV@Dopa), -3 (NPs@Citrate 5 nm -RYMV), -4 (NPs@Citrate 10 nm -RYMV) et -5 (NPs@Citrate 15 nm -RYMV), ont été clairement identifiés.

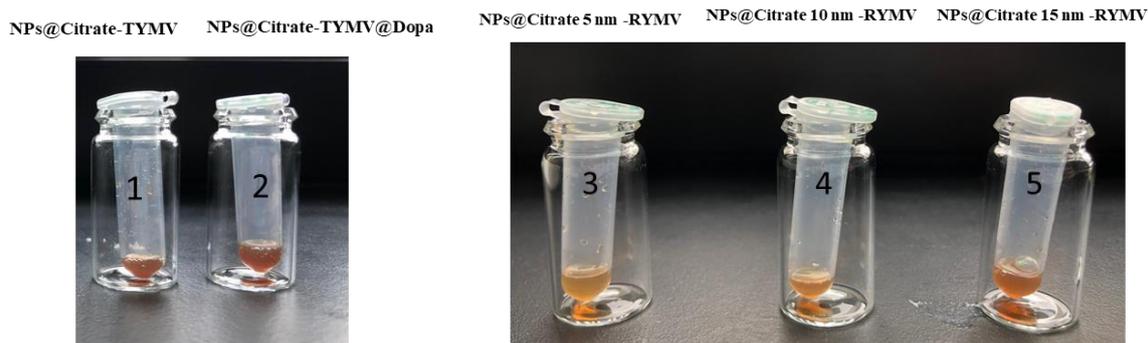


Figure 3.75 : Images suite à la purification sur gel : (1) et (2) représentent les NPs@Citrate de 10 nm greffées sur TYMV via deux stratégies différentes, tandis que (3), (4) et (5) illustrent les NPs@Citrate de 5 nm, 10 nm et 15 nm, respectivement greffées sur RYMV selon la première stratégie.

### 3.1. Analyse des diamètres hydrodynamiques des nouveaux nano-bio-hybrides

Comme mentionné précédemment, les analyses par diffusion dynamique de la lumière (DLS) ont non seulement révélé que les diamètres des nouveaux nano-bio-hybrides sont sensiblement plus grands que ceux des virus TYMV, RYMV non modifiés et des NPs@Citrate seules, mais elles ont également confirmé l'absence d'autres bandes, suggérant que ces nano-bio-hybrides ne présentent pas d'agrégation. Le tableau 3.3 résume les diamètres hydrodynamiques spécifiques mesurés pour les nouveaux nano-bio-hybrides NPs@Citrate-TYMV et NPs@Citrate-RYMV, obtenus avec des NPs@Citrate de différentes tailles (5 nm, 10 nm et 15 nm), ainsi que pour les NPs@Citrate-TYMV@Dopa réalisés avec des NPs@Citrate de 10 nm

	Taille Hydrodynamique (nm)		
	5 ± 5	10 ± 5	15 ± 10
NPs@Citrate	5 ± 5	10 ± 5	15 ± 10
NPs@Citrate -TYMV	67 ± 15	80 ± 30	105 ± 20
NPs@Citrate -RYMV	70 ± 10	64 ± 20	105 ± 10
NPs@Citrate -TYMV@Dopa	-	90 ± 20 nm	-

Tableau 14.3 : Diamètres hydrodynamiques mesurés des hybrides NPs@Citrate-TYMV, NPs@Citrate-RYMV et NPs@Citrate-TYMV@Dopa avec diverses tailles de NPs@Citrate.

### 3.2. Analyse de la nature chimique des nouveaux nano-bio-hybrides

Après le greffage et la purification, nous avons analysé les nouveaux nano-bio-hybrides magnétiques NPs@Citrate-TYMV et NPs@Citrate-TYMV@Dopa par spectroscopie de photoélectrons X (XPS). La détection d'un pic à 710,3 eV sur les échantillons, correspondant à Fe2p et attribué aux NPs@Citrate, confirme le succès de l'attachement sur les

nanoparticules (Figure 3.37- a et c). Ce signal distinctif souligne une intégration réussie avec les virus TYMV.

L'analyse des pics de fer après le greffage pour les deux nano-bio-hybrides (Figures 3.37 –b et d) met en évidence des valeurs constantes pour les pics Fe2p1/2 et Fe2p3/2 à 724,6 eV et 711,0 eV, respectivement. Ces résultats, ainsi que la présence de signatures satellites inchangées, indiquent que l'état d'oxydation du fer reste stable, préservant les propriétés originelles des particules. Cet aspect est essentiel puisqu'il garantit l'absence d'altérations chimiques indésirables dues au processus de greffage.

La stabilité de l'environnement électronique et des états de liaison du fer, vérifiée par XPS, atteste que le greffage n'altère pas significativement les particules. Les résultats cohérents à travers les différentes méthodes de synthèse confirment une modification efficace et spécifique de la surface des virus TYMV par l'ajout de nanoparticules.

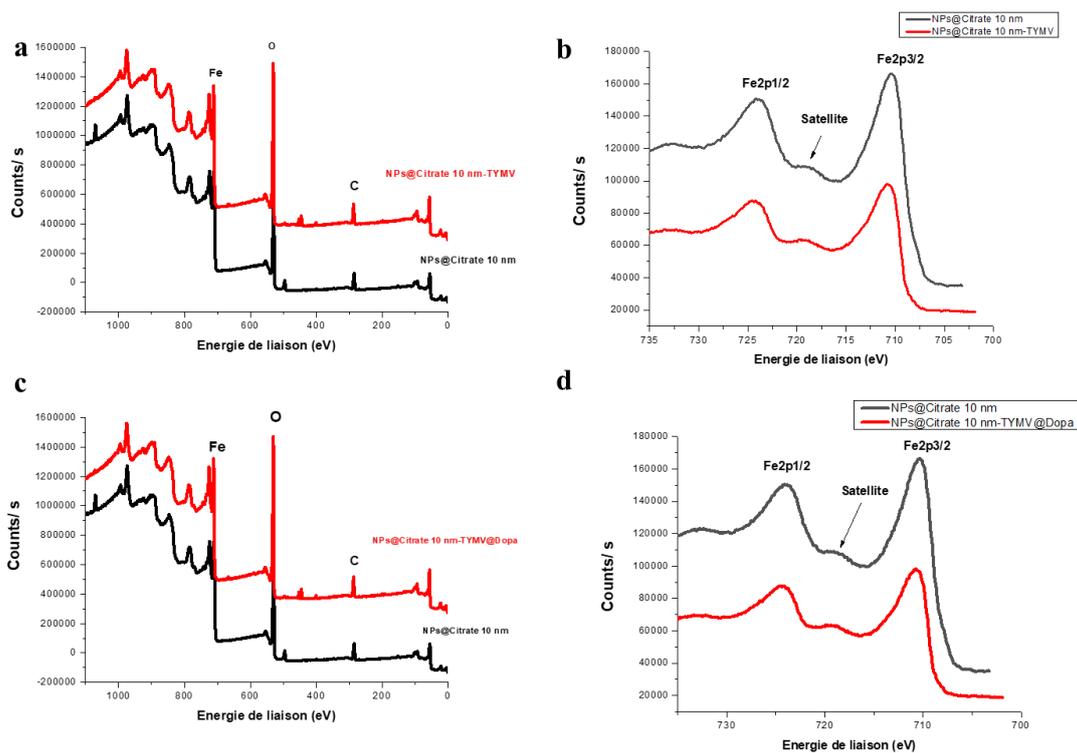


Figure 3.76: Analyse des spectres XPS des NPs@Citrate (représentés en noir) dans les deux figures. Les figures a et c illustrent respectivement les NPs@Citrate-TYMV (en rouge) et les NPs@Citrate-TYMV@Dopa (également en rouge). La figure b et la figure d comparent le spectre haute résolution de Fe2p de NPs@Citrate avant et après le greffage dans NPs@Citrate-TYMV et NPs@Citrate-TYMV@Dopa respectivement

Suite à l'analyse détaillée précédemment, l'analyse XPS a été réitérée pour les nano-bio-hybrides magnétiques NPs@Citrate 5 nm-RYMV et NPs@Citrate 10 nm-RYMV après greffage et purification (Figure 3.38 –a et c). Les résultats XPS confirment le succès du greffage, illustré par une réaction effective des nanoparticules avec les virus RYMV, et manifesté par l'apparition des pics de fer à 710,3 eV sur la surface des nanobiohybrides (Figure 3.38 a et c). Par ailleurs, les valeurs constantes pour les pics du spectre Fe2p, à savoir Fe2p1/2 à 724,6 eV et Fe2p3/2 à 711,0 eV, ainsi que la présence d'un pic satellite à 718,8 eV (Figures 3.38 –b et d), met en évidence une constance remarquable de l'état d'oxydation du fer ainsi que de l'environnement chimique des particules après le greffage. Ces observations assurent le maintien des propriétés et performances originales des nanoparticules de fer.

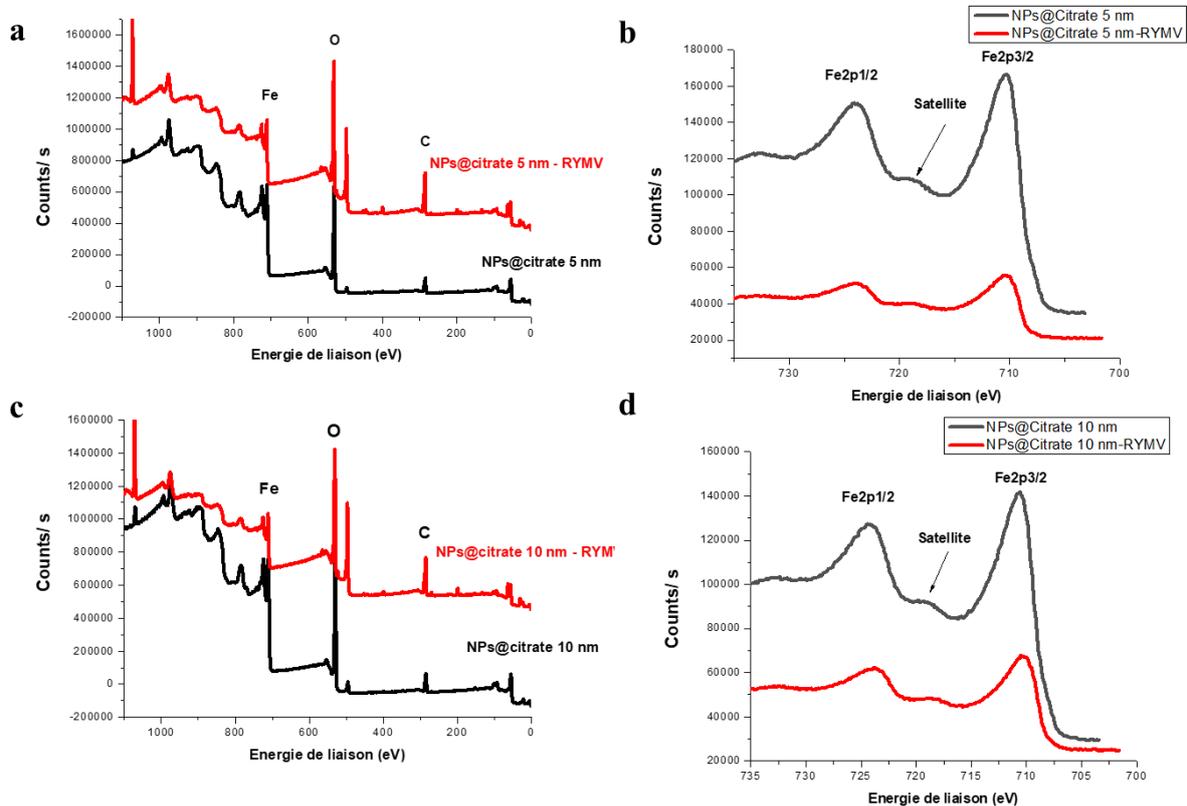


Figure 3.77: L'analyse des spectres XPS des NPs@Citrate, illustrés en noir sur l'ensemble des figures. Les figures a et c révèlent respectivement les spectres XPS des NPs@Citrate 5 nm-RYMV et NPs@Citrate 10 nm-RYMV, chacun étant distinctement marqué en rouge. Une comparaison détaillée des spectres haute résolution Fe2p des NPs@Citrate, avant et après le greffage, est présentée dans les figures b et d pour les NPs@Citrate 5 nm-RYMV et les NPs@Citrate 10 nm-RYMV respectivement.

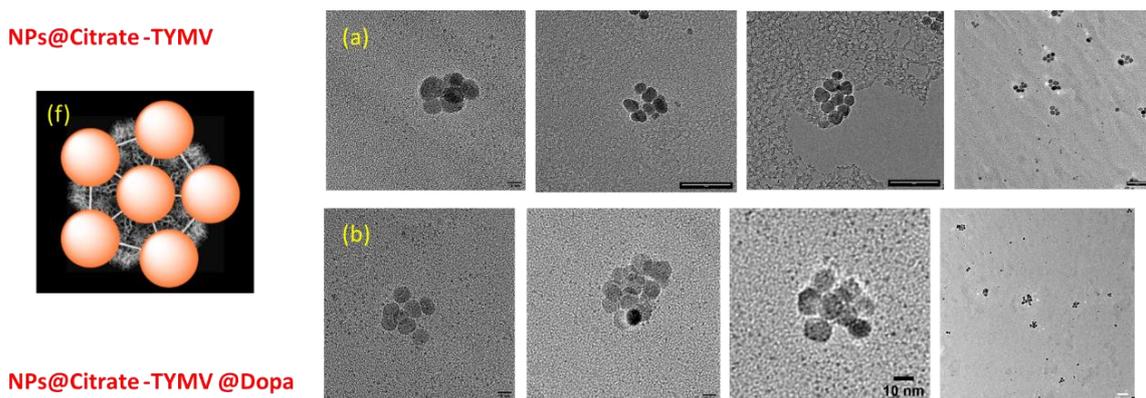
Le processus de greffage s'avère efficace pour modifier la surface des virus RYMV, avec une fixation réussie des NPs@Citrate de différentes tailles. L'environnement électronique et les

états de liaison des atomes de fer dans les particules restent inaltérés, démontrant ainsi la fiabilité et l'efficacité du processus de greffage employé.

### 3.3. Structure et stabilité des nouveaux nano-bio-hybrides après greffage

Les micrographies obtenues par microscopie électronique à transmission (TEM) mettent en évidence une répartition homogène des NPs@Citrate autour des capsides virales, tant pour le TYMV que le RYMV (Figure 3.39 -a, b, c, d et e) sans présence de nanoparticules isolées ni d'agrégats, ce qui souligne la spécificité du greffage. Cette observation suggère une association de 5 à 8 nanoparticules par virus, en accord avec les données de recherches antérieures [28]. Par ailleurs, la distance entre les nanoparticules greffées sur les capsides virales est constante, sans variations notables, confirmant également une organisation orientée selon une symétrie à 5 axes, cohérente avec la symétrie icosaédrique naturelle des capsides virales (Figure 3.39 -f).

La comparaison directe des nano-bio-hybrides avec les NPs@Citrate avant greffage ne révèle aucune formation d'agrégats chez les premiers, à l'opposé des seconds, témoignant de l'efficacité du greffage (Figure 3.39- g). De plus, la sonication n'affecte pas l'intégrité des nano-bio-hybrides, prouvant de leur robustesse dans différentes conditions de manipulation.



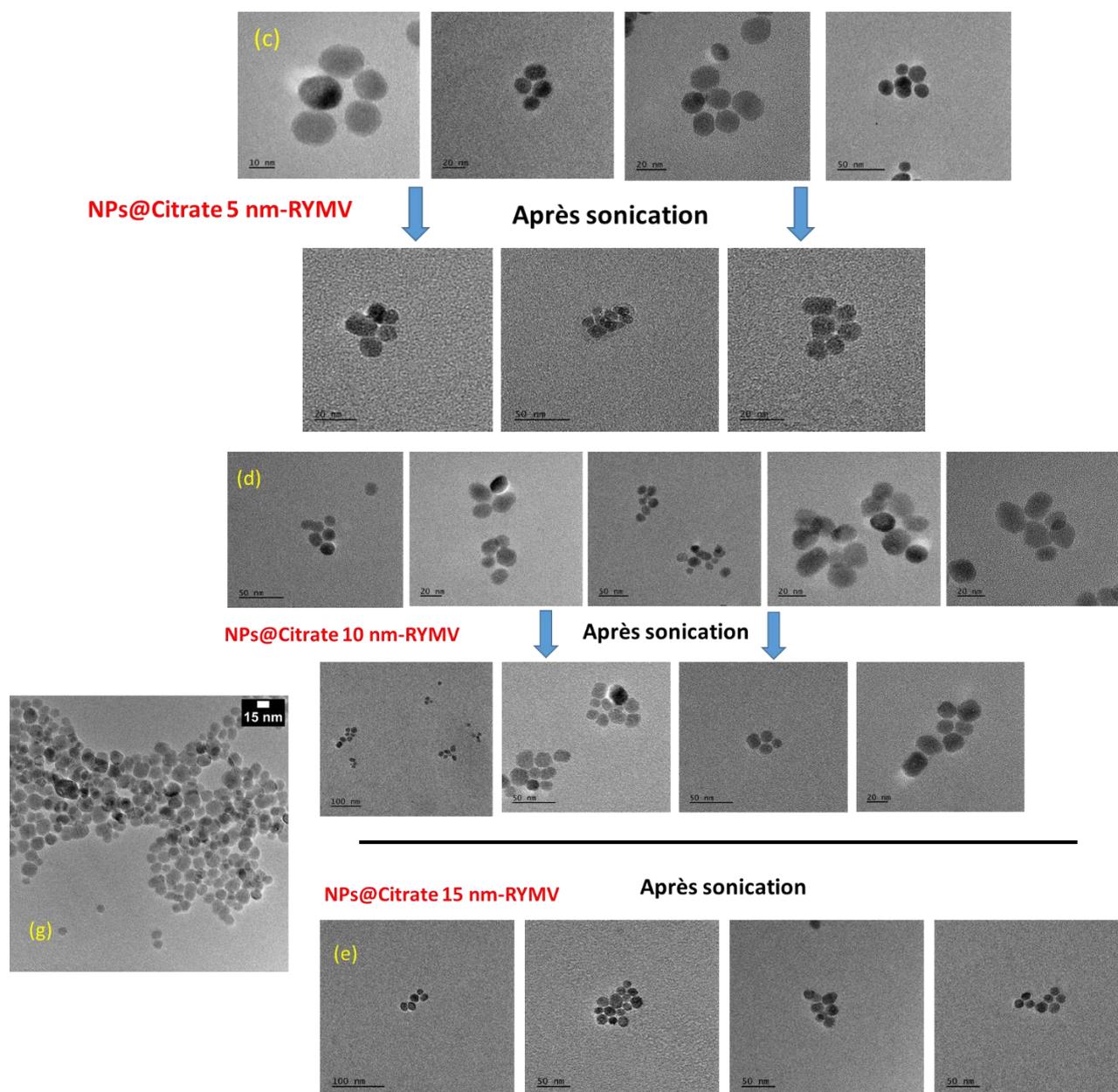


Figure 3.78: Micrographies TEM suite à la purification de nano-bio-hybrides associés à divers virus, TYMV et RYMV : (a) NPs@Citrate de 10 nm greffées à TYMV, (b) NPs@Citrate de 10 nm greffées à TYMV modifié par Dopa, (c) NPs@Citrate de 5 nm greffées à RYMV avant et après sonication, (d) NPs@Citrate de 10 nm greffées à RYMV avant et après sonication, (e) NPs@Citrate de 15 nm greffées à RYMV avant et après sonication, (f) Modèle de greffage de NPs@Citrate sur un virus icosaédrique et (g) image TEM des NPs@Citrate avant le greffage.

Ces informations suggèrent que notre méthode de modification de surface est une stratégie efficace pour l'assemblage tridimensionnel contrôlé de nanoparticules sur des capsides virales, tout en garantissant une haute solubilité et une stabilité dans des conditions aqueuses.

### 3.4. Photothermie

#### 3.4.1. NPs@Citrate-TYMV

Pour débiter notre étude, nous avons testé nos nano-bio-hybrides en photothermie afin de vérifier que les propriétés des assemblages surpassent celles des NPs@Citrate seules. Pour ce

faire, nous avons assuré que nos nano-bio-hybrides absorbent efficacement à la longueur d'onde d'excitation du laser de notre dispositif. Cette étape est fondamentale car la lumière absorbée se transforme en chaleur dissipée. Nous avons enregistré les spectres d'absorption des colloïdes aqueux NPs@Citrate-TYMV ainsi que ceux des NPs@Citrate (Figure 3.40). Les résultats révèlent qu'une augmentation de l'absorption se produit lors de l'assemblage des particules, ce qui suggère un effet photothermique amplifié chez les particules agglomérées, en accord avec les observations rapportées dans la littérature [35].

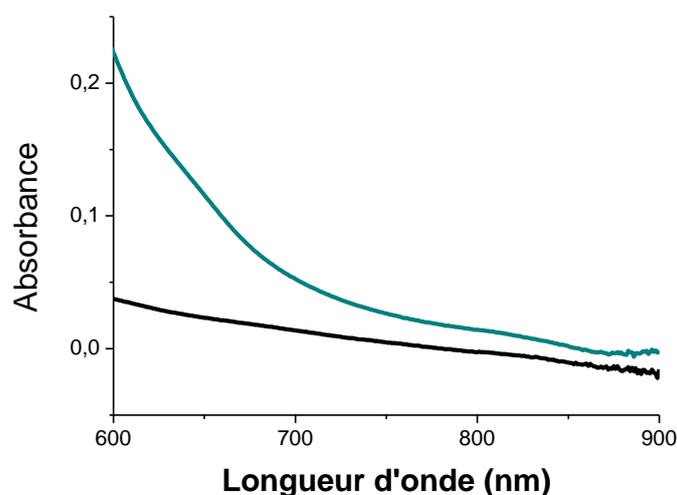


Figure 3.79 : Spectres d'absorption UV-Visible de NPs@Citrate (noir) et NP@Citrate-TYMV (cyan foncé).

Dans l'expérience impliquant des NPs@Citrate de 10 nm greffées sur le virus TYMV, une irradiation laser à 808 nm et à une densité de puissance de  $0,41 \text{ W/cm}^2$  a été appliquée. Après cinq minutes d'irradiation, la température de la solution contenant des NPs@Citrate non liées (à une concentration de  $0,125 \text{ mg/mL}$  de fer) a connu une hausse de  $3^\circ\text{C}$ . Elle a atteint un état d'équilibre thermique à  $3,5^\circ\text{C}$  au bout de 10 minutes d'exposition au laser (Figure 3.41 -a). Cette augmentation de la température est proportionnelle à la concentration en fer [36], atteignant même plus de  $15^\circ\text{C}$  lorsque la concentration en fer était de  $1 \text{ mg/mL}$  (Figure 3.41-b). Quand ces NPs@Citrate étaient associées à la capsid du virus TYMV, la température est montée à  $5,6^\circ\text{C}$  pour une concentration en fer de  $0,125 \text{ mg/mL}$ . Un équilibre thermique a été atteint à  $6,9^\circ\text{C}$  après les mêmes 10 minutes d'irradiation (Figure 3.41 -a). Lorsque le laser est éteint, la température retombe à sa valeur initiale. De la même manière que pour les NPs@Citrate libres, une augmentation de la concentration en fer de  $0,125 \text{ mg/mL}$  à  $1,00 \text{ mg/mL}$  entraînait une élévation plus importante de la température, allant de  $5,6^\circ\text{C}$  à  $13,8^\circ\text{C}$  après 5 minutes, et atteignant un état d'équilibre à une valeur légèrement supérieure après plus

de 10 minutes (Figure 3.41 -b). Par ailleurs, des variations de la température ont été observées en fonction de la densité de puissance du laser (Figure 3.41 -c). Étant donné la capacité des cellules vivantes à réparer les dommages thermiques, le processus d'irradiation a été répété en plusieurs cycles "on-off". Chaque cycle consistait en une irradiation de 5 minutes suivie d'une période où le laser était éteint et la température revenait à la température initiale. Ce processus a été réitéré pour deux cycles, avec une mesure des propriétés photothermiques à chaque étape (Figure 3.41 -d). Les résultats ont confirmé que la capsid du TYMV pouvait résister à une augmentation de température allant jusqu'à 16,9°C.

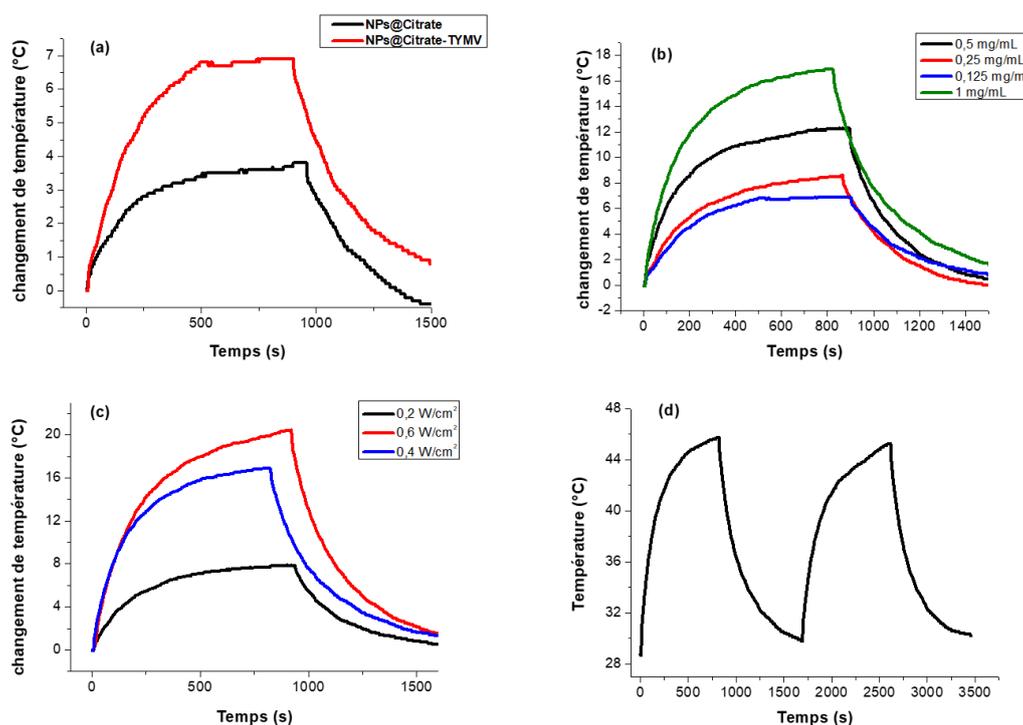


Figure 3.80: Expériences photothermiques des NPs@Citrate de 10 nm libres et assemblés sur TYMV. (a) Courbe de changement de température des NPs@Citrate libres et assemblés sur TYMV (0,125 mgFe/mL) sous l'excitation de 808 nm avec le laser allumé - éteint (0,41 W/cm<sup>2</sup>). (b) Courbe de température des NPs@Citrate-TYMV à différentes concentrations en fer. (c) Courbe de changement de température des NPs@Citrate-TYMV (1 mgFe/mL) sous différentes densités de puissance laser à 808 nm. (d) Cycles de laser "on-off" à 808 nm (0,41 W/cm<sup>2</sup>) pour les hybrides NPs@Citrate-TYMV (1 mgFe/mL).

Pour les NPs@Citrate libres, les augmentations de température observées se trouvent en accord avec les données antérieures de la littérature. Ces données concernent des nanoparticules de maghémite enrobées de citrate de dimensions similaires [36][38][39]. En revanche, nos nano bio-hybrides basés sur le TYMV montrent des augmentations de température encore plus considérables que celles documentées pour des nanofleurs d'oxyde de fer de 25 nm à des concentrations en fer équivalentes [38]. Cependant, il est à noter que la

concentration en fer nécessaire pour notre système est 10 fois moindre. Ce comportement est également similaire à celui des nanoparticules d'oxyde de fer associées à l'albumine sérique humaine (HSA), mais à une densité de puissance laser nettement plus faible. Ces observations suggèrent que nos hybrides, conçus par ingénierie, peuvent servir comme agents thermiques efficaces même à des concentrations en fer réduites. Cela pourrait minimiser les fluctuations transitoires du métabolisme du fer [40]. De plus, leur efficacité à faible densité de puissance laser élimine le risque d'effets secondaires liés à une surexposition laser sur les tissus sains.

En photothermie, le paramètre clé est le taux d'absorption spécifique (SAR), qui quantifie la puissance dissipée par unité de masse d'un élément métallique. Exprimé en watts par gramme (W/g). Le SAR est influencé par plusieurs facteurs, dont la fréquence et l'intensité de l'irradiation lumineuse, la concentration et la distribution des nanoparticules, ainsi que les propriétés optiques, magnétiques et thermiques des nanoparticules et du milieu.

Pour évaluer les capacités photothermiques de nos nano-bio-hybrides, nous avons mené des expériences en utilisant deux dispositifs distincts, en collaboration avec différentes institutions.

La première série d'expériences a été réalisée en partenariat avec la Vietnam Academy of Science and Technology (VAST) pour les échantillons NPs@Citrate-TYMV. Les essais photothermiques se sont servis d'une irradiation laser (LD808E3WG13, groupe Lasermate, Inc., Walnut, CA, États-Unis) à une longueur d'onde de 808 nm. La densité de puissance du laser pouvait être ajustée de 0,165 à 1,5 W/cm<sup>2</sup>. Dans ce contexte, nous avons préparé des colloïdes aqueux de NPs@Citrate seuls ainsi que leurs hybrides basés sur le TYMV. Pour chaque expérience, 200 µL de ces colloïdes, à une concentration en fer spécifiée, ont été soumis à l'irradiation.

En parallèle, la deuxième série d'expériences a été conduite en collaboration avec le Laboratoire de Chimie des Polymères Organiques (LCPO), cette fois pour les échantillons NPs@Citrate-RYMV. Pour ces tests, nous avons utilisé une diode laser de 808 nm liée à une fibre optique (Système de Pilotage de Laser Diode, BWT Beijing Ltd.; Modèle DS3-11312-110-K808F15FA-6.000; AC 230 V 50 Hz), capable de fournir une puissance modulable jusqu'à 5 W. Pour chaque expérience, 150 µL d'une dispersion de NPs@Citrate-RYMV, ont été exposée à un laser-NIR de 808 nm pendant 5 minutes à une puissance de 0,41 W/cm<sup>2</sup>.

Les valeurs de SAR ont été déterminées expérimentalement en utilisant l'équation (1) [37] :

$$\text{SAR} = \frac{C \times m_s}{m_{Me}} \times \frac{dT}{dt} \quad (\text{éq.1})$$

Où C est la capacité thermique spécifique des échantillons étudiés, à savoir les colloïdes aqueux NPs@Citrate- TYMV, et est supposée être égale à celle de l'eau ( $C = 4.185 \text{ J}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$ ),  $m_{Me}$  est la masse totale de fer dans l'échantillon,  $m_s$  est la masse totale de l'échantillon, et  $dT/dt$  ont été déduites en analysant la pente initiale de la courbe de la température T en fonction du temps t pendant les 30 premières secondes de l'expérience, ce qui correspond à la phase initiale de la montée en température, comme illustré dans l'encart de la figure 3.42.

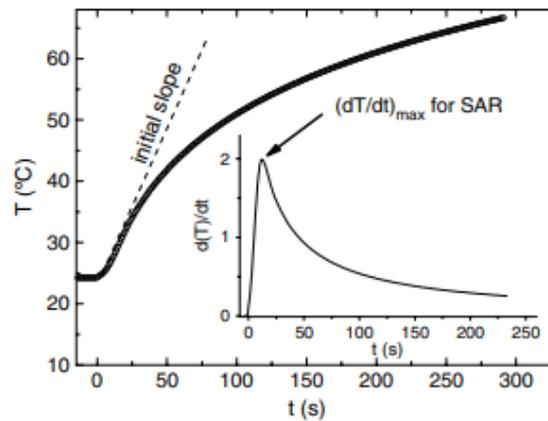


Figure 3.81: Illustration schématique du processus d'estimation des valeurs de SAR à partir de la pente initiale des courbes de chauffage de T en fonction du temps. Encart : le critère du SAR maximal est basé sur le pic de la courbe dérivée  $dT/dt$ .

Les taux d'absorption spécifique (SAR) pour les nanoparticules d'oxyde de fer de 10 nm, que ce soit en état libre ou assemblées avec TYMV, ont été mesurés en fonction de différentes concentrations de fer (Figure 3.43). Pour les concentrations de 0.25 mg/mL, 0.5 mg/mL et 1 mg/mL, le SAR des échantillons NPs@Citrate-TYMV reste stable et relativement similaire, indiquant une capacité uniforme de ces nanoparticules à convertir l'énergie lumineuse en chaleur dans cette plage de concentrations. Toutefois, à 0.125 mg/mL, le SAR a augmenté de manière significative, suggérant une interaction optimisée des nanoparticules avec la lumière ou une distribution différente à cette concentration spécifique.

La concentration de fer dans les nanoparticules joue un rôle important en influençant leurs propriétés optiques et magnétiques. À des concentrations élevées, la densité accrue des centres actifs favorise une meilleure absorption de l'énergie lumineuse. Cependant, l'efficacité photothermique peut atteindre un seuil ou diminuer à ces concentrations en raison d'une possible saturation. Cette observation pourrait être liée à la restriction de la pénétration du laser, où la lumière est absorbée par la suspension colloïdale, provoquant une distribution inégale de l'énergie lumineuse à travers l'échantillon [37].

Comparativement aux résultats d'autres études (Tableau 3.4), il est surprenant de constater que, bien qu'il y ait eu une augmentation notable de la température, les SAR observés pour les NPs@Citrate non liées étaient inférieurs à ceux rapportés dans certaines recherches [36] même avec des densités de puissance laser élevées. Cependant, ils sont conformes à d'autres recherches [38][41].

En revanche, le SAR des nanoparticules assemblées avec TYMV étaient plus élevés que ceux des nanoparticules libres, corroborant les conclusions de Chen et al. sur l'impact positif du groupement des particules [42].

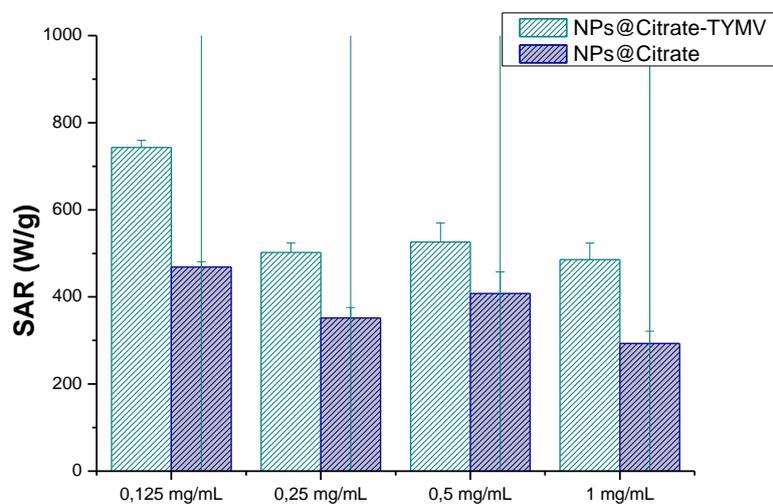


Figure 3.82: évaluation du taux d'absorption spécifique (SAR) (W/gFe) pour des nanoparticules d'oxyde de fer ( $Fe_2O_3$ ) de taille 10 nm isolées ou greffées sur le virus TYMV, à diverses concentrations et sous irradiation laser de 808 nm à une densité de puissance de 0,41 W/cm<sup>2</sup>.

Les écarts entre nos résultats SAR et ceux d'autres études pourraient aussi être attribués aux différentes phases des particules utilisées dans les divers travaux. Certains chercheurs utilisent le terme "oxyde de fer" sans spécifier s'il s'agit de maghémite ou de magnétite. D'autres s'attardent sur les particules de maghémite, tandis que certains se focalisent sur les particules de magnétite. Ces distinctions ne sont pas anodines. En effet, malgré leur similitude structurale et chimique, la maghémite et la magnétite diffèrent en taille de maille cristalline (8,36 Å pour la maghémite contre 8,40 Å pour la magnétite), en distances fer-cation - anion oxygène et en fréquences de vibration du réseau cristallin. De plus, contrairement à la magnétite qui contient des cations ferreux et ferriques, la maghémite ne contient que des cations ferriques. Cela a pour effet de rendre la magnétite plus foncée (noire plutôt que brun-rouge) et plus apte à absorber la lumière visible, ce qui renforce ses propriétés photothermiques [37].

Nanoparticules	[Fe] (mg/mL)	Densité de puissance laser (W/cm <sup>2</sup> )	$\Delta T$ (°C) sur 10 minutes d'exposition	SAR (W/g <sub>Fe</sub> )
<b>Selon notre étude</b>				
<b>Nanoparticules de maghémite libres et sphériques de taille 10 nm</b>	<b>0.125</b>	<b>0.41</b>	<b>3.5</b>	<b>568</b>
	<b>1.00</b>	<b>0.41</b>	<b>15</b>	<b>293</b>
<b>Nanoparticules de maghémite de 10 nm assemblées sur TYMV</b>	<b>0.125</b>	<b>0.41</b>	<b>6.7</b>	<b>742</b>
	<b>1.00</b>	<b>0.2</b>	<b>7.4</b>	<b>184</b>
	<b>1.00</b>	<b>0.41</b>	<b>16.2</b>	<b>585</b>
	<b>1.00</b>	<b>0.6</b>	<b>18.9</b>	<b>523</b>
<b>Selon la littérature</b>				
Particules de maghémite de 10 nm greffées sur l'albumine sérique humaine (HSA)	0.14	1.0	9.2	1870
Nanofleurs d'oxyde de fer de taille 25 nm	1.4	0.3	2.5	~ 180
	1.4	1.0	8	~ 550

Tableau 3.15 : Comparaison des propriétés photothermiques de notre étude, de nanoparticules d'oxyde de fer, libres ou assemblées sur TYMV, dans l'eau avec celles rapportées dans la littérature [38][43].

### 3.4.2. NPs@Citrate- RYMV

Dans une étude portant sur des NPs@Citrate de 10 nm et 15 nm attachées à la surface RYMV, un laser de 808 nm et 0.8 W/cm<sup>2</sup> a été utilisé. Après le greffage, les NPs@Citrate de 10 nm associées à RYMV à 0,4 mg/ml de fer ont affiché un SAR de 904 w/g (Figure 3.44), témoignant d'une conversion efficace de l'énergie lumineuse en chaleur. En revanche, celles de 15 nm, à 0,7 mg/ml de fer, ont dévoilé un SAR de 176 w/g (Figure 3.44) indiquant une interaction moindre ou une distribution de chaleur moins efficace en raison de leur taille plus grande.

L'analyse photothermique montre que le SAR des NPs@Citrate de 10 nm à RYMV est plus performant à faible concentration, alors que les NPs@Citrate de 15 nm à RYMV sont moins à concentration plus élevée. Il semble que la concentration influence notablement la diffusion du laser dans la suspension des nanoparticules, avec une possible explication liée à la limitation de la profondeur de pénétration du laser à des concentrations élevées à cause de l'absorption lumineuse par la suspension colloïdale [37][44]. Cette dernière conduit à une répartition inégale de la lumière incidente à travers l'échantillon, d'où une absorption réduite par les nanoparticules [36][37][44].

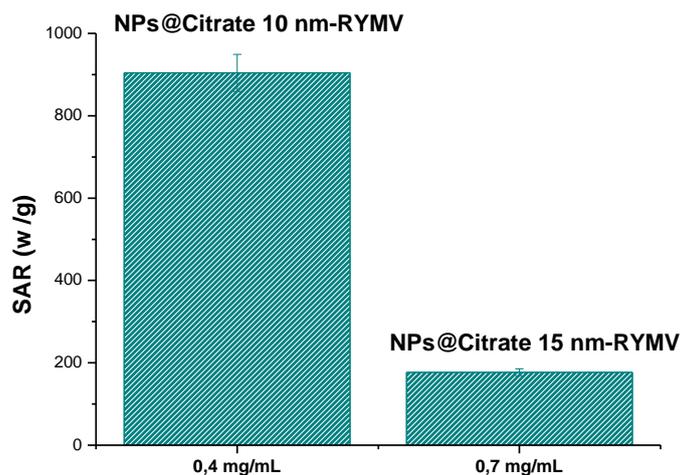


Figure 3.83 : évaluation du taux d'absorption spécifique (SAR) ( $W/g_{Fe}$ ) pour NPs@Citrate de 10 nm et 15 nm greffés sur RYMV.

Ces données suggèrent également une corrélation entre la concentration des NPs@Citrate, leur taille, et l'efficacité photothermique. À titre illustratif, le nano-bio hybride NPs@Citrate 10 nm –RYMV, qui a la plus petite taille hydrodynamique moyenne de 64 nm, montre une efficacité remarquable en présentant la valeur de SAR la plus élevée, atteignant 904  $W/g_{Fe}$  à une concentration de fer de 0,4  $mg_{Fe}/mL$ . Cette performance diminue avec NPs@Citrate 10 nm –TYMV, qui, avec une taille hydrodynamique moyenne plus grand d'environ 80 nm, affichant une valeur de SAR de 526  $W/g_{Fe}$  à une concentration de fer légèrement supérieure, 0,5  $mg_{Fe}/mL$ . Finalement, le NPs@Citrate 15 nm –RYMV, possédant la taille hydrodynamique la plus grande, 105 nm, démontre la valeur de SAR la plus basse à 176  $W/g_{Fe}$ , malgré une concentration de fer encore plus élevée à 0,7  $mg_{Fe}/mL$  (Tableau 3.5).

Nanoparticules	Taille hydrodynamique moyenne (nm)	[Fe] (mg/mL)	Densité de puissance laser ( $W/cm^2$ )	SAR ( $W/g_{Fe}$ )
<b>Nanoparticules de maghémite de 10 nm assemblées sur RYMV</b>	64	0.4	0.8	904
<b>Nanoparticules de maghémite de 10 nm assemblées sur TYMV</b>	80	0.5	0.4	526
<b>Nanoparticules de maghémite de 15 nm assemblées sur RYMV</b>	105	0.7	0.8	176

Tableau 3. 16: Caractéristiques et performances photothermiques des nanoparticules de maghémite assemblées sur RYMV et TYMV.

En somme, la taille et la concentration des nanoparticules jouent un rôle important dans l'absorption de l'énergie laser et sa transformation en chaleur, aspects fondamentaux pour les applications photothermiques. L'étude révèle aussi un taux d'absorption plus élevé pour les particules assemblées, mettant en lumière les bénéfices de l'agrégation pour l'efficacité photothermique et l'importance d'une sélection adéquate de la taille des nanoparticules et de la concentration de fer pour améliorer les performances des nano-bio-hybrides.

#### 4. Conclusion

Dans ce chapitre, l'exploration de la conception et la caractérisation de matériaux nano-biohybrides magnétiques a été menée, en prenant le virus végétal Turnip Yellow Mosaic Virus (TYMV) comme plateforme. Le greffage de nanoparticules magnétiques de tailles variées (5 nm, 10 nm et 15 nm) de type maghémite sur la capsid virale du TYMV a été réalisé. Cette réaction s'est effectuée en utilisant des liaisons amides, tout en maintenant l'intégrité de la capsid intacte.

Des nanoparticules d'oxyde de fer fonctionnalisées avec du citrate (NPs@Citrate) ont été utilisées, formant ainsi des matériaux nano-biohybrides magnétiques qui conservent la symétrie à 5 axes de la capsid icosaédrique du TYMV. Par ailleurs, le Rice Yellow Mottle Virus (RYMV) a été exploré comme alternative au TYMV pour le greffage de NPs@Citrate, avec des nanoparticules de dimensions variées.

Des méthodes diverses de caractérisation ont validé le succès du greffage, incluant la modification de la surface virale, mise en évidence par l'apparition du pic de fer sur la surface des nanobiohybrides par XPS, et l'augmentation de la taille hydrodynamique par DLS. L'organisation ordonnée des nanoparticules, cohérente avec la symétrie icosaédrique des capsides virales, a été confirmée par MET.

Bien que le greffage ait réussi avec les deux virus, le TYMV s'est révélé plus stable, tandis que des problèmes de stabilité ont été rencontrés avec le RYMV. Par ailleurs, les nouveaux matériaux nano-biohybrides NPs@Citrate-TYMV et NPs@Citrate-RYMV ont montré des propriétés photothermiques améliorées par rapport aux NPs@Citrate non liées. Une comparaison a révélé que le nanobiohybride avec RYMV se comporte mieux qu'avec TYMV, indiquant un SAR plus élevé en photothermie, ce qui confirme de multiples avantages, notamment en termes de conversion efficace de l'énergie lumineuse en chaleur et d'une meilleure maîtrise de la chaleur délivrée.

Ces investigations initiales jettent les bases pour une exploration future. Après toutes ces caractérisations, une étude plus approfondie concernant la caractérisation magnétique de ces nano-bio-hybrides sera élaborée dans le chapitre suivant.

## 5. Références

- [1] F. Li and Q. Wang, “Fabrication of nanoarchitectures templated by virus-based nanoparticles: Strategies and applications,” *Small*, vol. 10, no. 2, pp. 230–245, 2014, doi: 10.1002/sml.201301393.
- [2] Z. Liu, J. Qiao, Z. Niu, and Q. Wang, “Natural supramolecular building blocks: From virus coat proteins to viral nanoparticles,” *Chem. Soc. Rev.*, vol. 41, no. 18, pp. 6178–6194, 2012, doi: 10.1039/c2cs35108k.
- [3] A. M. Wen and N. F. Steinmetz, “Design of virus-based nanomaterials for medicine, biotechnology, and energy,” *Chem. Soc. Rev.*, vol. 45, no. 15, pp. 4074–4126, 2016, doi: 10.1039/c5cs00287g.
- [4] S. Eiben *et al.*, “Plant virus-based materials for biomedical applications: Trends and prospects,” *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 145, pp. 96–118, 2019, doi: 10.1016/j.addr.2018.08.011.
- [5] Y. H. Chung, H. Cai, and N. F. Steinmetz, “Viral nanoparticles for drug delivery, imaging, immunotherapy, and theranostic applications,” *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 156, pp. 214–235, 2020, doi: 10.1016/j.addr.2020.06.024.
- [6] J. Cao, R. H. Guenther, T. L. Sit, C. H. Opperman, S. A. Lommel, and J. A. Willoughby, “Loading and release mechanism of Red clover necrotic mosaic virus derived plant viral nanoparticles for drug delivery of doxorubicin,” *Small*, vol. 10, no. 24, pp. 5126–5136, 2014, doi: 10.1002/sml.201400558.
- [7] C. E. Franke, A. E. Czapar, R. B. Patel, and N. F. Steinmetz, “Tobacco Mosaic Virus-Delivered Cisplatin Restores Efficacy in Platinum-Resistant Ovarian Cancer Cells,” *Mol. Pharm.*, vol. 15, no. 8, pp. 2922–2931, 2018, doi: 10.1021/acs.molpharmaceut.7b00466.
- [8] A. A. Vernekar *et al.*, “Speciation of Phenanthriplatin and Its Analogs in the Core of Tobacco Mosaic Virus,” *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 140, no. 12, pp. 4279–4287, 2018, doi: 10.1021/jacs.7b12697.
- [9] X. Liu *et al.*, “Glyco-decorated tobacco mosaic virus as a vector for cisplatin delivery,” *J. Mater. Chem. B*, vol. 5, no. 11, pp. 2078–2085, 2017, doi: 10.1039/c7tb00100b.
- [10] H. Hu, Q. Yang, S. Baroni, H. Yang, S. Aime, and N. F. Steinmetz, “Polydopamine-decorated tobacco mosaic virus for photoacoustic/magnetic resonance bimodal imaging and photothermal cancer therapy,” *Nanoscale*, vol. 11, no. 19, pp. 9760–9768, 2019, doi: 10.1039/c9nr02065a.

- [11] T. Douglas, E. Strable, D. Willits, A. Aitouchen, M. Libera, and M. Young, "Protein engineering of a viral cage for constrained nanomaterials synthesis," *Adv. Mater.*, vol. 14, no. 6, pp. 415–418, 2002, doi: 10.1002/1521-4095(20020318)14:6<415::AID-ADMA415>3.0.CO;2-W.
- [12] M. Kobayashi, M. Seki, H. Tabata, Y. Watanabe, and I. Yamashita, "Fabrication of aligned magnetic nanoparticles using tobamoviruses," *Nano Lett.*, vol. 10, no. 3, pp. 773–776, 2010, doi: 10.1021/nl902405s.
- [13] L. N. Loo, R. H. Guenther, S. A. Lommel, and S. Franzen, "Encapsulation of nanoparticles by red clover necrotic mosaic virus," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 129, no. 36, pp. 11111–11117, 2007, doi: 10.1021/ja071896b.
- [14] A. S. Blum, C. M. Soto, K. E. Sapsford, C. D. Wilson, M. H. Moore, and B. R. Ratna, "Molecular electronics based nanosensors on a viral scaffold," *Biosens. Bioelectron.*, vol. 26, no. 6, pp. 2852–2857, 2011, doi: 10.1016/j.bios.2010.11.021.
- [15] K. M. Bromley, A. J. Patil, A. W. Perriman, G. Stubbs, and S. Mann, "Preparation of high quality nanowires by tobacco mosaic virus templating of gold nanoparticles," *J. Mater. Chem.*, vol. 18, no. 40, pp. 4796–4801, 2008, doi: 10.1039/b809585j.
- [16] H. A. Nguyen, I. Jupin, P. Decorse, S. Lau-Truong, S. Ammar, and N. T. Ha-Duong, "Assembly of gold nanoparticles using turnip yellow mosaic virus as an in-solution SERS sensor," *RSC Adv.*, vol. 9, no. 55, pp. 32296–32307, 2019, doi: 10.1039/c9ra08015e.
- [17] C. Moreira Da Silva *et al.*, "In Situ Insights into the Nucleation and Growth Mechanisms of Gold Nanoparticles on Tobacco Mosaic Virus," *Nano Lett.*, vol. 23, no. 11, pp. 5281–5287, 2023, doi: 10.1021/acs.nanolett.3c01311.
- [18] "Architecture and Assembly of Virus Particles," 2014, doi: 10.1016/B978-0-12-384871-0.00003-0.
- [19] M. A. Canady, S. B. Larson, J. Day, and A. Mcpherson, "mosaic virus," vol. 3, no. 9, pp. 771–781, 1996.
- [20] H. N. Barnhill, R. Reuther, P. L. Ferguson, T. Dreher, and Q. Wang, "Turnip yellow mosaic virus as a chemoaddressable bionanoparticle," *Bioconjug. Chem.*, vol. 18, no. 3, pp. 852–859, 2007, doi: 10.1021/bc060391s.
- [21] Q. Zeng *et al.*, "Chemoselective Modification of Turnip Yellow Mosaic Virus by Cu (I) Catalyzed Azide - Alkyne 1, 3-Dipolar Cycloaddition Reaction and Its Application in Cell Binding," no. I, pp. 58–66, 2011.
- [22] E. Truve, "MINIREVIEW," vol. 74, no. 14, pp. 6231–6241, 2000.

- [23] N. Opalka *et al.*, “Structure of Native and Expanded Sobemoviruses by Electron Cryo-Microscopy and Image Reconstruction,” pp. 197–211, 2000, doi: 10.1006/jmbi.2000.4043.
- [24] C. Qu *et al.*, “3D domain swapping modulates the stability of members of an icosahedral virus group,” *Structure*, vol. 8, no. 10, pp. 1095–1103, 2000, doi: 10.1016/S0969-2126(00)00508-6.
- [25] C. Brugidou, N. Opalka, M. Yeager, R. N. Beachy, and C. Fauquet, “Stability of rice yellow mottle virus and cellular compartmentalization during the infection process in *Oryza sativa* (L.),” *Virology*, vol. 297, no. 1, pp. 98–108, 2002, doi: 10.1006/viro.2002.1398.
- [26] L. De Virologie, “Vol. 61, No. B--PLANT DISEASE REPORTER-- June 1977 ISOLATION OF THE RICE YELLOW MOTTLE VIRUS IN IVORY COAST,” vol. 61, no. June, pp. 4–7, 1977.
- [27] V. Catherinot, G. Labesse, C. Brugidou, and D. Fargette, “Internal Point Mutations of the Capsid Modify the Serotype of Rice Yellow Mottle Virus,” vol. 79, no. 7, pp. 4407–4414, 2005, doi: 10.1128/JVI.79.7.4407.
- [28] A. S. Blum *et al.*, “Cowpea mosaic virus as a scaffold for 3-D patterning of gold nanoparticles,” *Nano Lett.*, vol. 4, no. 5, pp. 867–870, 2004, doi: 10.1021/nl0497474.
- [29] J. Fontana *et al.*, “Virus-templated plasmonic nanoclusters with icosahedral symmetry via directed self-assembly,” *Small*, vol. 10, no. 15, pp. 3058–3063, 2014, doi: 10.1002/sml.201400470.
- [30] N. Lebedev *et al.*, “A virus-based nanoplasmonic structure as a surface-enhanced Raman biosensor,” *Biosens. Bioelectron.*, vol. 77, pp. 306–314, 2016, doi: 10.1016/j.bios.2015.09.032.
- [31] C. M. Soto *et al.*, “Separation and recovery of intact gold-virus complex by agarose electrophoresis and electroelution: Application to the purification of cowpea mosaic virus and colloidal gold complex,” *Electrophoresis*, vol. 25, no. 17, pp. 2901–2906, 2004, doi: 10.1002/elps.200306029.
- [32] M. A. Gilles, A. Q. Hudson, and C. L. Borders, “Stability of Water-Soluble in Aqueous Solution,” vol. 248, pp. 244–248, 1990.
- [33] N. Nakajima, Y. Ikada, B. Engineering, R. June, I. Carbodiimides, and D.- Zadeh, “Mechanism of Amide Formation by Carbodiimide for Bioconjugation in Aqueous Media,” pp. 123–130, 1995.
- [34] D. Kim, Y. Lee, T. W. Dreher, and T. J. Cho, “Empty Turnip yellow mosaic virus

- capsids as delivery vehicles to mammalian cells,” *Virus Res.*, vol. 252, no. May, pp. 13–21, 2018, doi: 10.1016/j.virusres.2018.05.004.
- [35] S. Shen *et al.*, “Magnetic nanoparticle clusters for photothermal therapy with near-infrared irradiation,” *Biomaterials*, vol. 39, pp. 67–74, 2015, doi: 10.1016/j.biomaterials.2014.10.064.
- [36] S. Nemeč, S. Kralj, C. Wilhelm, A. Abou-Hassan, M. P. Rols, and J. Kolosnjaj-Tabi, “Comparison of iron oxide nanoparticles in photothermia and magnetic hyperthermia: Effects of clustering and silica encapsulation on nanoparticles’ heating yield,” *Appl. Sci.*, vol. 10, no. 20, pp. 1–12, 2020, doi: 10.3390/app10207322.
- [37] S. Cabana, A. Curcio, A. Michel, C. Wilhelm, and A. Abou-Hassan, “Iron oxide mediated photothermal therapy in the second biological window: A comparative study between magnetite/maghemite nanospheres and nanoflowers,” *Nanomaterials*, vol. 10, no. 8, pp. 1–17, 2020, doi: 10.3390/nano10081548.
- [38] A. Espinosa *et al.*, “Magnetic (Hyper)Thermia or Photothermia? Progressive Comparison of Iron Oxide and Gold Nanoparticles Heating in Water, in Cells, and In Vivo,” *Adv. Funct. Mater.*, vol. 28, no. 37, pp. 1–16, 2018, doi: 10.1002/adfm.201803660.
- [39] D. Chang *et al.*, “Biologically targeted magnetic hyperthermia: Potential and limitations,” *Front. Pharmacol.*, vol. 9, no. AUG, 2018, doi: 10.3389/fphar.2018.00831.
- [40] P. Southern and Q. A. Pankhurst, “Commentary on the clinical and preclinical dosage limits of interstitially administered magnetic fluids for therapeutic hyperthermia based on current practice and efficacy models,” *Int. J. Hyperth.*, vol. 34, no. 6, pp. 671–686, 2018, doi: 10.1080/02656736.2017.1365953.
- [41] J. G. Ovejero *et al.*, “Hybrid nanoparticles for magnetic and plasmonic hyperthermia,” *Phys. Chem. Chem. Phys.*, vol. 20, no. 37, pp. 24065–24073, 2018, doi: 10.1039/C8CP02513D.
- [42] J. Chen *et al.*, “Collective Plasmon Coupling in Gold Nanoparticle Clusters for Highly Efficient Photothermal Therapy,” *ACS Nano*, vol. 16, no. 1, pp. 910–920, 2022, doi: 10.1021/acsnano.1c08485.
- [43] J. Hai *et al.*, “Maghemite nanoparticles coated with human serum albumin: Combining targeting by the iron-acquisition pathway and potential in photothermal therapies,” *J. Mater. Chem. B*, vol. 5, no. 17, pp. 3154–3162, 2017, doi: 10.1039/c7tb00503b.
- [44] C. Lozano-Pedraza *et al.*, “Assessing the parameters modulating optical losses of iron

oxide nanoparticles under near infrared irradiation,” *Nanoscale Adv.*, vol. 3, no. 22, pp. 6490–6502, 2021, doi: 10.1039/d1na00601k.

---

# Chapitre IV

---

## **Effet de l'assemblage des nanoparticules d'oxyde de fer sur les propriétés magnéto-calorimétriques.**

L'hyperthermie magnétique, également connue sous le nom d'hyperthermie magnéto-induite, désigne la conversion de l'énergie électromagnétique en chaleur. Ce processus s'effectue quand des particules magnétiques sont exposées à un champ électromagnétique oscillant à haute fréquence, typiquement dans la gamme des radiofréquences. Le terme "hyperthermie" peut prêter à confusion car il fait référence à un excès de chauffage, mais il est largement utilisé pour des applications médicales en raison de l'intérêt thérapeutique local qu'il suscite.

Pour que leur utilisation en hyperthermie thérapeutique soit efficace, les particules magnétiques doivent non seulement être biocompatibles, non-toxiques et injectables, mais elles doivent également s'accumuler efficacement dans le tissu biologique cible et présenter un taux d'absorption spécifique (SAR) élevé. Le SAR mesure la quantité d'énergie radiofréquence absorbée par les particules magnétiques par unité de masse. Typiquement des particules magnétiques de moins de 50 nm de diamètre, judicieusement fonctionnalisées, sont privilégiées [1][2]. L'état de surface et la taille des particules ne sont pas les seuls critères, la distribution en taille et les propriétés magnétiques intrinsèques (aimantation, anisotropie magnétique, température de Curie, ...) des particules doivent être aussi soigneusement considérées [3]. La principale difficulté réside dans la nécessité d'équilibrer la taille des particules avec leur stabilité colloïdale et le SAR, compte tenu du champ magnétique appliqué.

Dans ce chapitre, nous nous pencherons spécifiquement sur les facteurs influençant l'efficacité de l'hyperthermie. Nous examinerons l'influence de la taille des nanoparticules, leur forme, la nature chimique donc les propriétés magnétiques intrinsèques de celles-ci, ainsi que l'effet de l'assemblage en agrégats. Nous approfondirons également les processus de relaxation de Néel

et de Brown, qui sont les deux mécanismes fondamentaux à l'origine de la génération de chaleur à l'échelle nanométrique.

De plus, ce chapitre introduira deux techniques distinctes de mesure du SAR. Ces méthodes nous aideront à recueillir des données critiques pour l'amélioration des traitements thérapeutiques.

Enfin, une partie significative de ce chapitre sera consacrée à l'étude des propriétés magnéto-calorimétriques des nanoparticules de maghémite de différents diamètres et de leur assemblage sur des virus de plantes élaborés pendant cette thèse. Cette approche nous permettra d'évaluer comment les agrégats structurés influencent les propriétés thermiques et magnétiques, un phénomène fréquemment souligné dans la littérature concernée.

## **1. L'hyperthermie : Principes**

L'hyperthermie magnétique fut introduite il y a cinquante ans par Gilchrist et col. en utilisant des nanoparticules magnétiques pour cibler précisément les tissus cancéreux [4]. Elle repose sur la capacité de ces nanoparticules à réagir à un champ magnétique radiofréquence externe.

Ces particules génèrent de la chaleur en raison de leurs propriétés magnétiques uniques, un processus que l'on peut contrôler avec précision pour induire une élévation ciblée et reproductible de la température dans les tissus tumoraux. L'hyperthermie magnétique est particulièrement précieuse pour sa capacité à focaliser l'effet thermique sur les cellules cancéreuses, tout en réduisant les dommages aux tissus sains environnants, un défi majeur des thérapies anticancéreuses traditionnelles. L'hyperthermie magnétique ne se limite pas à la destruction directe des tumeurs par la chaleur, elle a aussi le potentiel de compléter d'autres formes de thérapie anticancéreuse. L'élévation de la température perturbe les fonctions métaboliques et structurelles des cellules cancéreuses, conduisant à l'apoptose, la mort cellulaire programmée [5].

Les nanoparticules choisies pour ce traitement, sont souvent composées d'oxyde de fer, hautement biocompatibles et faiblement toxiques pour le corps humain, dispersées sous forme colloïdale [6][7][8].

## 1.1. Apoptose, thermoablation et autres effets

L'utilisation initiale des nanoparticules magnétiques dans les traitements anticancéreux s'est concentrée sur l'éradication des tumeurs par hyperthermie grâce à l'élévation de température au-delà des seuils physiologiques normaux, provoquant l'apoptose ou la nécrose des cellules tumorales. La température exacte nécessaire varie en fonction de plusieurs paramètres, tels que l'environnement cellulaire et la durée d'exposition. Toutefois, il est généralement admis qu'une fourchette de 41 à 43°C est suffisante pour induire l'apoptose [9], des températures supérieures pouvant conduire à la thermoablation de celles-ci, avec un point critique identifié autour de 46°C [10]. La "dose thermique", concept qui prend en compte à la fois la température atteinte et la durée de son application apparaît alors comme importante [10][11][12][13]. Une corrélation exponentielle entre la température et la durée du traitement a d'ailleurs pu être formulée (Figure 4.1) [12][13] :

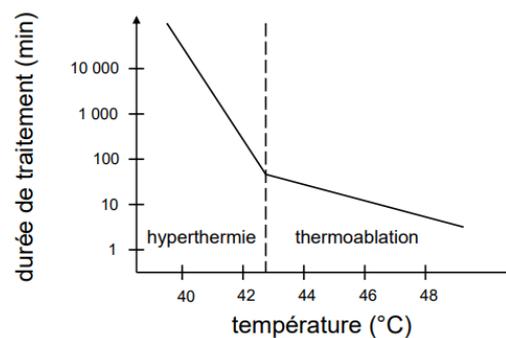


Figure 4.84: Corrélation exponentielle entre la durée du traitement et la température requise pour induire la mort cellulaire, via hyperthermie ou thermoablation.

Il convient également de noter que la stratégie d'augmentation de la température peut être synergétiquement couplée à d'autres méthodes, telles que la radiothérapie ou la chimiothérapie, pour une élimination plus efficace des cellules cancéreuses [14][15]. Dans ce contexte, une étude a employé des particules millimétriques de samarium-cobalt  $\text{SmCo}_5$ , activées magnétiquement pour contrôler la libération d'insuline [16]. Un autre cas est celui du travail de nanoparticules de cobalt enrobées d'or, d'un diamètre de 3 nm, permettant d'ajuster la perméabilité de membranes biomimétiques à base de polyélectrolytes [17].

## 1.2. Mécanismes à l'origine de la dissipation de chaleur

La capacité des nanoparticules magnétiques à dissiper de la chaleur sous l'influence d'un champ magnétique radiofréquence extérieur dépend principalement de deux mécanismes de

relaxation magnétiques, à savoir la relaxation de Néel et de Brown. La chaleur dissipée est justement le résultat des pertes d'énergie lors de la réorientation du moment magnétique (relaxation de Néel) ou de la rotation de la nanoparticule (relaxation de Brown) sous l'influence d'un champ magnétique externe alternatif (Figure 4.2).

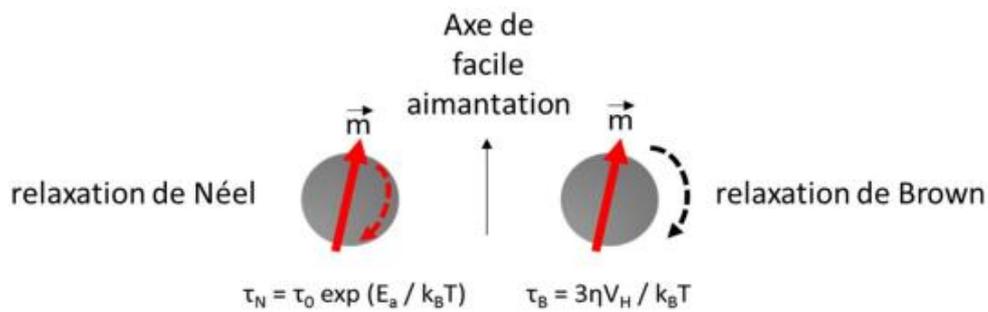


Figure 4.85: La rotation du moment magnétique dans les nanoparticules. La relaxation du moment magnétique est réalisée soit par les relaxations de Néel soit de Brown.

La relaxation de Néel implique un changement dans l'orientation du moment magnétique d'une nanoparticule, indépendamment de sa rotation physique, un phénomène dicté par l'équilibre entre l'anisotropie magnétique et l'énergie thermique [18]. La vitesse de la relaxation de Néel est un paramètre important dans le phénomène d'hyperthermie dans son ensemble. Plus cette vitesse est grande plus ce mécanisme prédomine. Elle est influencée par plusieurs facteurs, notamment la barrière énergétique nécessaire à la réorientation du moment magnétique, la température, et les propriétés spécifiques de la nanoparticule [19].

La relaxation de Brown, en revanche, implique la rotation mécanique de la nanoparticule elle-même sous l'effet d'un champ magnétique externe [20]. Ce type de relaxation est typique pour les particules plus grandes où la rotation de la particule entière est plus favorable sur le plan énergétique que la réorientation du seul moment magnétique interne [20] et est fortement influencé par la viscosité du milieu environnant car une viscosité élevée entrave la liberté de rotation de la nanoparticule, ralentissant ainsi le processus.

En manipulant des variables telles que la nature chimique des nanoparticules, leur taille, leur forme, leur état d'agrégation, la fréquence du champ magnétique, son amplitude, la viscosité de l'environnement biologique, il est possible de réguler le mécanisme de relaxation

dominant, permettant ainsi d'optimiser la production de chaleur et d'assurer une thérapie efficace.

Ces variables agissent directement sur la vitesse dite de relaxation, et donc sur le temps de relaxation  $\tau$ , de l'aimantation des nanoparticules par l'un ou l'autre des deux mécanismes. Quand le champ est appliqué pendant une période d'excitation bien plus longue que le temps nécessaire pour que les nanoparticules réorientent leur moment magnétique, l'aimantation suit une courbe réversible, sans production de chaleur. Par contre, si le temps d'application du champ est proche du temps d'ajustement des nanoparticules, elles ne peuvent pas s'adapter assez vite. Cela crée une sorte de "retard" appelé hystérésis, et l'énergie perdue dans ce processus se convertit en chaleur. Ces concepts ont été introduits par Hergt et ses collègues [1], et plus tard, Rosensweig a créé un modèle pour estimer ce temps pour chaque mécanisme. Le modèle de Rosensweig [21] [22], basé sur les travaux de Shliomis [23], est fondamental. Ainsi, il définit le temps caractéristique  $\tau_N$  du mouvement rotationnel interne du moment magnétique de la particule, connu sous le nom de relaxation de Néel, par l'équation (Eq 1) :

$$\tau_N = \tau_0 \exp\left(\frac{K_v V_{NP}}{K_B T}\right) \text{ (Eq 1)}$$

Où  $K_v$  est l'anisotropie magnétique volumique du matériau,  $V_{NP}$  le volume magnétique de la nanoparticule (souvent confondu avec le volume de la nanoparticule),  $k_B$  la constante de Boltzmann et  $\tau_0$  une constante de temps qui sera prise égale à 1 ns,

Il définit  $\tau_B$  le temps caractéristique du mouvement rotationnel de la particule elle-même, nommé relaxation de Brown, par l'équation (Eq 2) :

$$\tau_B = \left(\frac{3\eta V_h}{K_B T}\right) \text{ (Eq 2)}$$

Où  $\eta$  est la viscosité du milieu dispersant et  $V_h$  le volume hydrodynamique des nanoparticules dans un environnement fluide.

Le temps caractéristique global  $\tau$ , représentant ces processus simultanés, est la moyenne harmonique de  $\tau_N$  et  $\tau_B$  (Eq 3) :

$$\frac{1}{\tau} = \frac{1}{\tau_N} + \frac{1}{\tau_B} \text{ (Eq 3)}$$

Le temps le plus court, régissant finalement à lui seul l'essentiel de la dissipation de chaleur induite.

Ces équations soulignent, comme dit précédemment, l'importance de l'anisotropie magnétique et la taille des nanoparticules, ainsi que la viscosité du milieu dans lequel les nanoparticules sont dispersées. Les travaux de Fortin et col. [24] comparant les temps de relaxation de Néel et de Brown de dispersion de nanoparticules de maghémite de faible densité d'anisotropie magnétocristalline ( $K_1 \sim 10 \text{ kJ m}^{-3}$ ), dans de l'eau ( $\eta = 8.9 \times 10^{-4} \text{ Pa}\cdot\text{s}$ ) ou de la glycérine ( $\eta = 1.412 \text{ Pa}\cdot\text{s}$ ), à ceux de nanoparticules de ferrite de cobalt de même taille mais de plus forte densité d'anisotropie magnétocristalline ( $K_1 \sim 100 \text{ kJ m}^{-3}$ ), dans les mêmes milieux, en sont une parfaite illustration (Figure 4.3).

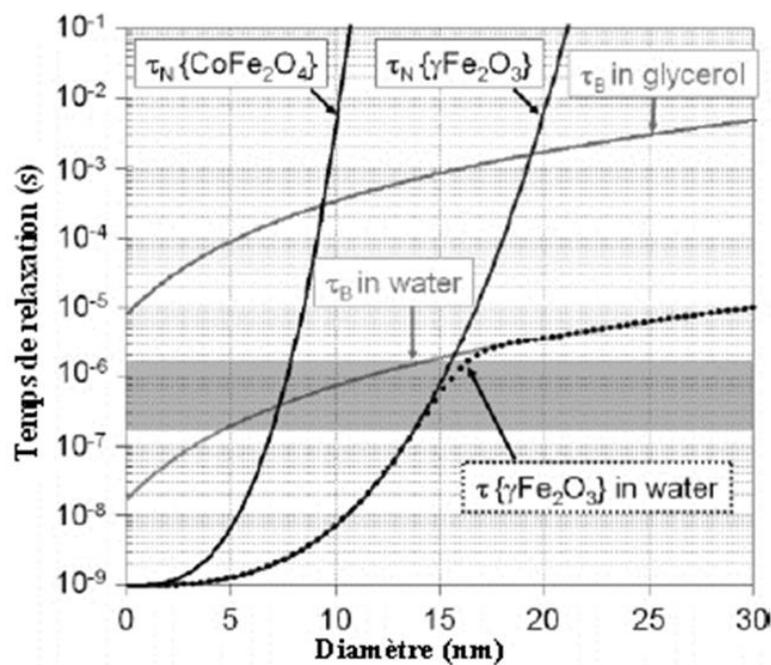


Figure 4.86: Temps de relaxation selon les mécanismes de Néel et Brown, ( $t_N$  et  $t_B$ , respectivement), en fonction du diamètre des particules pour différentes combinaisons de types de particules magnétiques et de milieux de suspension.

Clairement, dans un milieu visqueux, qui entravera la rotation physique des particules, le mécanisme de Brown prédominera à partir des tailles de particules de maghémite supérieures à 20 nm alors qu'il prédominera pour une taille de particules deux fois plus petite pour les particules de ferrite de cobalt. Dans l'eau, milieu moins visqueux, ces tailles critiques sont significativement réduites. Elles sont de l'ordre de 15 nm pour les particules de maghémite et de 7 nm pour les particules de ferrite de cobalt. Aussi, quel que soit la viscosité du milieu, les plus petites nanoparticules ont tendance à suivre la relaxation de Néel, tandis que les plus grandes sont sujettes à la relaxation brownienne.

Il est à noter qu'au-delà des mécanismes de relaxation eux-mêmes, la viscosité a également un rôle dans la diffusion et la convection de la chaleur dissipée par les nanoparticules [25]. En effet, la viscosité influence la stabilité des suspensions de nanoparticules magnétiques. Les milieux très visqueux préviennent l'agglomération des nanoparticules grâce à la résistance élevée à leur mouvement, favorisant ainsi la dispersion et empêchant la dégradation des performances, comme le montre l'étude de Lartigue et al. [26]. Cette propriété ne transparait pas dans les équations de Rosensweig mais ne peut être négligée vis-à-vis des aspects pratiques de la thérapie par hyperthermie magnétique. Les nanoparticules doivent pouvoir être injectées dans le corps humain sans flocculer et la préparation de dispersions colloïdales stables reste un pré-requis.

### 1.3. Paramètres qui influencent l'hyperthermie magnétique

La mise en œuvre efficace de l'hyperthermie magnétique nécessite une compréhension approfondie et une maîtrise des multiples paramètres qui régissent les mécanismes de génération de chaleur des nanoparticules magnétiques [27].

La composition chimique des nanoparticules, donc leurs propriétés physico-chimiques et magnétiques intrinsèques est un paramètre important [28]. C'est elle qui définit l'aimantation et l'anisotropie magnétocristalline des nanoparticules. Leur mode de synthèse doit aussi être considéré puisqu'il peut influencer leur qualité cristalline et orienter leur morphologie qui peuvent avoir des effets significatifs sur la performance en hyperthermie [29]. L'état d'assemblage des nanoparticules, aspect souvent sous-estimé, peut aussi considérablement affecter les propriétés magnétiques, par conséquent, la capacité de production de chaleur [30][31]. Enfin, l'amplitude, la fréquence et la configuration spatiale du champ magnétique externe appliqué sont autant de paramètres déterminants quant à la quantité de chaleur générée par les nanoparticules. Un rappel des effets de ces différents paramètres, dits intrinsèques et extrinsèques, est donné ci-après.

#### 1.3.1. La nature chimique des nanoparticules magnétiques et leur méthode de synthèse

Si historiquement la notion d'hyperthermie magnétique locale découle de la capacité d'aimants permanents millimétriques ( $\text{SmCo}_5$ ,  $\text{Nd}_2\text{Fe}_{14}\text{B}$ , ...) de transformer une énergie

magnétique en chaleur par perte par hystérésis, la recherche scientifique pour les applications thérapeutiques s'est très rapidement tournée vers l'utilisation de particules d'oxydes de fer comme la magnétite ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) ou la maghémite ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ) [32]. Elles sont intéressantes du fait de leur biocompatibilité [33][34], de leurs propriétés magnétiques intrinsèques, les oxydes de fer de structure cubique que sont la magnétite et la maghémite sont des matériaux ferrimagnétiques relativement doux à aimantation élevée (de l'ordre de  $90 \text{ A}\cdot\text{m}^{-1} \text{ kg}^{-1}$  pour la magnétite), et de leur capacité à être fabriquées à différentes tailles, généralement entre 10 et 50 nm [35] [36].

Des nanoparticules dérivées de l'oxyde de fer, comme le sont les nanoparticules de ferrites spinelles ont aussi été évaluées avec plus ou moins de succès. On peut citer par exemple les nanoparticules de  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$  [37][38],  $\text{Zn}_{1-x}\text{Mn}_x\text{Fe}_2\text{O}_4$  [39],  $\text{Zn}_{1-x}\text{Co}_x\text{Fe}_2\text{O}_4$  [40],  $\text{Fe}_{3-x}\text{Zn}_x\text{O}_4$  [41] parmi tant d'autres. Des nanoparticules métalliques, comme les nanoparticules de fer [42] ont aussi été envisagée à cause de leur aimantation élevée. Des nanoparticules cœur-coquille métal/oxyde [43] ou oxyde/oxyde [44] ont aussi été considérées compte tenu de l'adaptabilité de leur anisotropie magnétique totale.

Le tableau ci-après rassemble quelques valeurs de SAR pour différents types de nanoparticules pour se rendre compte de la diversité des nano-objets utilisées en hyperthermie magnétiques et leur efficacité relative (Tableau 4.1) [45].

Nature chimique	Amplitude du champ magnétique (kA/m)	Fréquence du champ magnétique (kHz)	SAR (W/g)
$\text{F}_{45}\text{G}_{55}$	91	633	6.45
$\text{Fe}_3\text{O}_4$	200	282	5.8
$\text{Gd}_5\text{Si}_4$	171	327	3.7
$\text{Fe}_2\text{O}_3$	133	500	0.5
$\text{NiFe}_2\text{O}_4$	133	500	0.43
$\text{ZnFe}_2\text{O}_4$	133	500	0.07
$\text{CoFe}_2\text{O}_4$	133	500	0.04
$\text{CuFe}_2\text{O}_4$	133	500	0.27
$\text{La}_{0.8}\text{Sr}_{0.2}\text{MnO}_3$	133	500	0.91

Tableau 4.17 : Valeurs de SAR mesurées sur des nanoparticules magnétiques à peu près sphériques de différentes natures chimiques.

Quelles que soient les nanoparticules utilisées, leur qualité cristalline, plus généralement leur microstructure, reste un paramètre important, tant celle-ci affecte de façon considérable leur aimantation totale et leur anisotropie magnétique effective. Ainsi, des défauts cristallins peuvent altérer les propriétés magnétiques des nanoparticules et donc leur efficacité en

hyperthermie [46]. Un contrôle rigoureux des conditions de synthèse est essentiel pour minimiser ces défauts.

En ce qui concerne la morphologie des nanoparticules magnétiques, à savoir leur forme et leur taille, celle-ci peut être aussi contrôlée en ajustant les conditions de synthèse. La morphologie peut avoir des implications significatives sur l'efficacité de la conversion d'énergie magnétique car elle affecte l'anisotropie magnétique, l'anisotropie de forme en particulier, par conséquent, les mécanismes de relaxation [47]. Le contrôle de la taille des nanoparticules est un autre aspect critique qui est affecté par le choix de la méthode de synthèse et qui participe à définir les propriétés magnétiques de celles-ci. Plus les particules sont petites en taille, plus la contribution de leur surface désordonnée augmente dans le calcul de leur aimantation et de leur constante d'anisotropie magnétique effective : l'aimantation diminue alors que la constante d'anisotropie magnétique effective augmente.

Ces méthodes de synthèse sont essentiellement des méthodes de précipitation en solution à plus ou moins haute température : on peut citer la coprécipitation en phase aqueuse, la synthèse hydrothermale ou solvothermale, la décomposition thermique [46]. Les méthodes hydro- ou solvothermale et/ou de décomposition thermique impliquant une réactivité chimique à haute température (synthèse dans des solvants à haut point d'ébullition comme le benzyl ether, ou sous pression) sont celles qui permettent d'atteindre les meilleures qualités cristallines à taille donnée des nanoparticules.

### 1.3.2. Effet de la taille

L'impact de la taille des nanoparticules magnétiques sur l'hyperthermie magnétique est une dimension fondamentale car elle influence directement les phénomènes associés à la conversion de l'énergie magnétique en chaleur.

La taille des nanoparticules est critique car elle affecte la relaxation magnétique, la perte par hystérésis, l'aimantation à saturation, la stabilité colloïdale et les effets de surface (Figure 4.4).

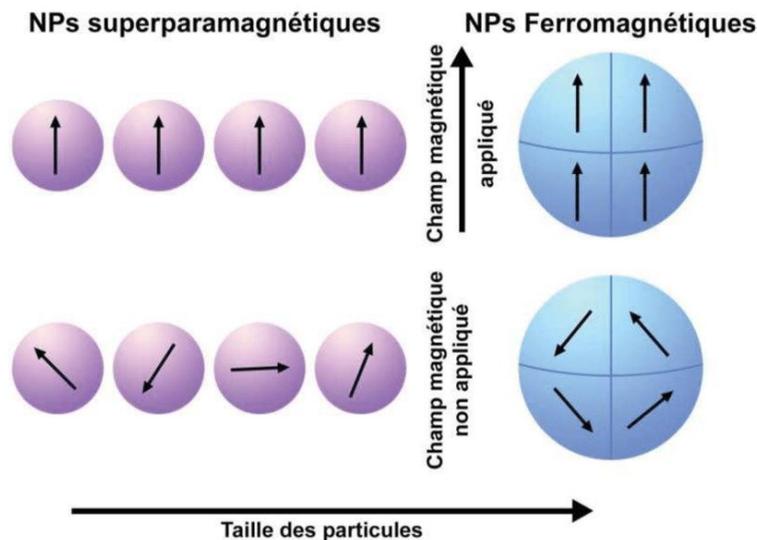


Figure 4.87: Interaction des nanoparticules superparamagnétiques et ferromagnétiques avec un champ magnétique : alignement des domaines en présence du champ et distinction dans le comportement magnétique résiduel une fois le champ retiré.

Elle définit d'abord le comportement magnétique des particules. Au-dessus d'une certaine taille critique elles sont polydomaines et se comportent comme des ferromagnétiques, les seules pertes qu'elles peuvent exprimer sont des pertes par hystérésis. En dessous, elles sont monodomaines et se comportent comme des superparamagnétiques, leurs pertes sont alors dues aux relaxations de Néel et/ou de Brown.

Compte tenu des tailles visées pour atteindre la stabilité colloïdale des nanoparticules [48]. pour une diffusion et une clearance corporelle efficaces (inférieures à 50 nm), celles-ci se comportent pour l'essentiel comme des domaines superparamagnétiques et là, plus elles sont petites (inférieures à 15 nm pour les nanoparticules d'oxyde de fer), plus elles sont propices à la relaxation de Néel, où l'aimantation peut changer de direction par rapport à la grille cristalline fixe [49][50]. En revanche, plus elles sont grandes, (supérieures à 20 nm pour les nanoparticules d'oxyde de fer), plus la relaxation brownienne, où la particule elle-même tourne, est favorisée [30].

L'aimantation à saturation est également plus élevée dans les nanoparticules plus grandes en taille, offrant une plus grande capacité de production de chaleur par perte d'hystérésis [51] et inversement plus elles sont petites et moins leur aimantation est élevée et donc leur capacité à dissiper de la chaleur par perte d'hystérésis est faible. Analytiquement, la taille des particules à travers leur aimantation à saturation, agit directement sur la valeur de SAR comme démontré par Hemery et al. [52].

En augmentant le diamètre moyen de nanoparticules d'oxyde de fer préparées par hydrolyse forcée en milieu polyol plus la valeur du SAR augmente de façon parabolique (Figure 4.5).

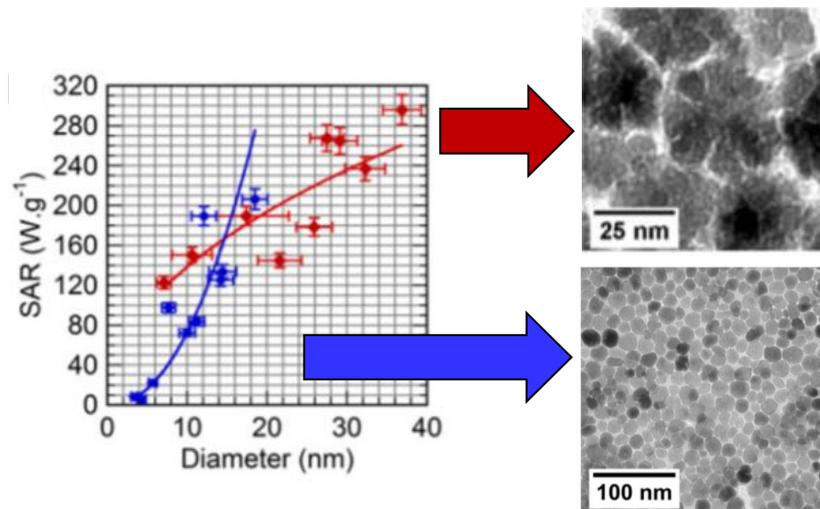


Figure 4.88: SAR mesurées sur différentes nanoparticules mono- ou multi-corps de différents diamètres. Les lignes continues représentent un affinement par loi de puissance d'exposants 2,2 et 0,48, respectivement.

Attention, il ne s'agit pas d'accroître la taille des particules de façon inconsidérée. Les nanoparticules d'oxyde de fer de taille moyenne, situées dans la gamme de 20-40 nm, sont souvent considérées comme la "zone dorée" pour l'hyperthermie magnétique. Cette taille offre une combinaison bénéfique de relaxations, ce qui conduit à des valeurs SAR optimales. De plus, ces nanoparticules ont un volume suffisant pour maintenir une aimantation élevée à température ambiante. Les nanoparticules de magnétite ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) d'environ 30 nm ont montré un SAR d'environ 200 W/g. Cependant, à mesure que la taille des nanoparticules augmente au-delà de 40 nm, les défis commencent à l'emporter sur les avantages. Même si les particules plus grandes bénéficient de taux de relaxation plus élevés, ce mécanisme est moins efficace dans la conversion de l'énergie magnétique en chaleur. De plus, l'aggrégation devient un problème majeur pour les particules de plus grande taille, en particulier celles de plus de 80 nm, conduisant à une réduction significative du SAR, inférieur à 100 W/g en raison de ces facteurs. En somme, il est clair qu'il existe une taille optimale pour les nanoparticules magnétiques destinées à être utilisées dans l'hyperthermie magnétique, généralement située autour de 20-40 nm pour les oxydes de fer. Cette fenêtre optimale est cruciale car, en dehors de cette gamme, le SAR peut être compromis en raison de dynamiques de relaxation modifiées et de problèmes d'aggrégation. Néanmoins, ces valeurs optimales peuvent varier selon la composition spécifique des nanoparticules, leur forme et les conditions du champ magnétique appliqué.

### 1.3.3. Effet de forme

L'influence de la morphologie des nanoparticules magnétiques dans les applications d'hyperthermie magnétique est un sujet d'intérêt considérable, étant donné que la forme de ces particules joue un rôle prépondérant dans la détermination de leurs propriétés magnétiques et, par conséquent, dans l'efficacité du processus d'hyperthermie. Plusieurs études ont montré que les nanoparticules magnétiques de différentes formes (sphériques, cubiques, ellipsoïdales, etc.) présentent des comportements magnétiques variés sous l'effet d'un champ magnétique externe [53]. L'une des principales raisons pour lesquelles la forme des nanoparticules est importante est due à l'anisotropie magnétique. Les nanoparticules avec une haute anisotropie, comme les nanoparticules en forme de bâtonnet ou de disque, ont des axes de faciles aimantation qui sont plus longs dans une direction, rendant plus difficile pour les spins magnétiques de s'inverser. Cela entraîne une hystérésis plus importante dans les cycles de magnétisation, se traduisant par une génération de chaleur accrue lorsqu'elles sont soumises à un champ magnétique externe alternatif [54].

En outre, la forme des nanoparticules détermine également les voies de relaxation magnétique, principalement la relaxation de Néel et la relaxation de Brown. Les particules sphériques sont principalement soumises à la relaxation de Néel. En revanche, les nanoparticules non sphériques sont plus susceptibles de subir une relaxation de Brown.

De plus, les nanoparticules de formes allongées peuvent s'aligner parallèlement à un champ magnétique, créant des voies préférentielles pour la transmission de la chaleur et influençant ainsi la distribution thermique dans les tissus.

Pour finir, le tableau ci-après (Tableau 4.2) récapitule les valeurs de SAR mesurées sur différents types de nanoparticules magnétiques de différentes formes, y compris celles modifiées par des agents de surface tels que le bromure de cetyltriméthylammonium (CTAB), la polyvinylpyrrolidone (PVP), le polyéthylène glycol (PEG), et le graphène oxydé (GO), pour illustrer l'importance de la forme sur cette grandeur physique [55].

Forme	Taille (nm)	Nature chimique	Fonctionnalisation chimique de surface	Amplitude du champ magnétique (kA/m)	Fréquence du champ magnétique (kHz)	SAR (W/g)
Octaèdres	43	Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	CTAB	63	358	2483
Anneaux	73	Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	mPEG	35	400	2213
Disques	225	Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	CTAB	47.8	488	5000
Cubes	19	Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	PEG	29	529	2452
Sphères	45	Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	GO	32.5	400	5160

Sphères	45	Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	PVP	32.5	400	1100
Sphères	14	MnFe <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	GO	60	240	1588

Tableau 4.18: Valeurs de SAR mesurées sur des nanoparticules magnétiques de différentes formes.

#### 1.3.4. Effet de l'assemblage (agrégats)

Les états d'agrégation des nanoparticules peuvent grandement influencer leur efficacité à produire de la chaleur [56]. Dans de tels ensembles, les forces magnétiques, telles que les interactions d'échange et les forces dipolaires entre les nanocristaux magnétiques, prennent une nouvelle dimension en influençant les propriétés magnétiques collectives de l'ensemble, différant ainsi de celles des nanoparticules isolées [57]. Dans ces agrégats, des paramètres clés comme l'anisotropie magnétique effective, la susceptibilité magnétique et la fréquence de résonance, qui sont tous cruciaux pour l'efficacité de l'hyperthermie magnétique, sont indéniablement affectées avec des valeurs différentes de celles des nanocristaux pris séparément. En effet, les interactions d'échange peuvent augmenter l'anisotropie magnétique effective au sein des agrégats, ce qui pourrait potentiellement intensifier la perte par hystérésis [50]. Toutefois, il est important de souligner qu'une anisotropie excessivement élevée pourrait nuire à l'efficacité du chauffage en entravant la relaxation magnétique des nanoparticules. En plus de ces aspects, ces interactions d'échange augmentent l'aimantation totale et par conséquent la valeur de SAR comme illustré ci-avant dans la Figure 4.5 [52].

Les interactions d'échanges sont favorisées quand la qualité de l'interface cristallographique au sein des agrégats, entre les nanocristaux qui les constituent le permet. Typiquement un agencement épitaxial des nanocristaux ou quasi-épitaxial (mosaïcité) (Figure 4.6) est recommandé. Un tel agencement peut être obtenu par des conditions spécifiques de synthèse favorisant par exemple une croissance cristalline en solution par agrégation orientée de nanoparticules primaires [58]. Les nanofleurs d'oxyde de fer préparées par cette méthode de synthèse présentent cette qualité texturale et présentent des valeurs très élevées du SAR [52] (Figure 4.5).

La synthèse de polycristaux désordonnés sinon, la formation de clusters de nanocristaux post-synthèse ne permettent généralement pas d'atteindre cette qualité cristalline aux interfaces (Figure 4.6). Dans ce cas, les interactions dipolaires peuvent prédominer. Elles sont souvent moins favorables à la dissipation de chaleur, bien que les résultats soient encore controversés.

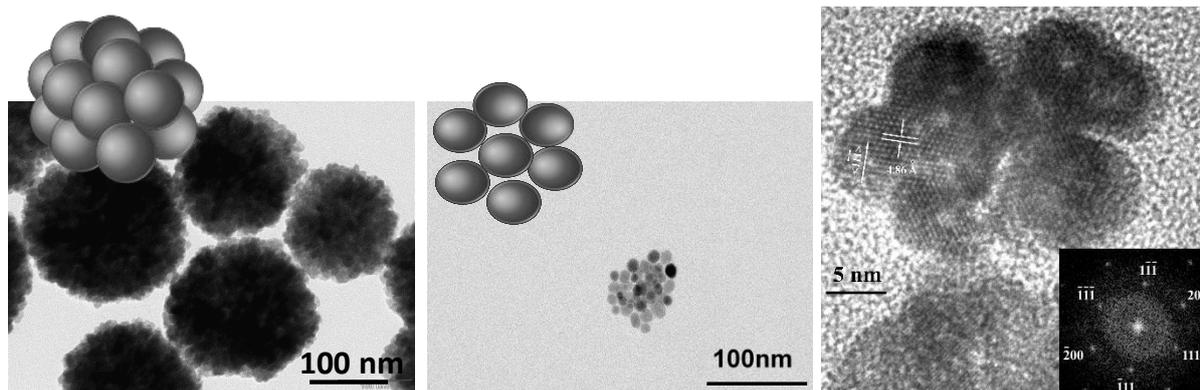


Figure 4.89: Micrographies de polycristaux de ferrite de manganèse-zinc (gauche), d'un cluster de nanocristaux de cet oxyde et d'un pseudo monocristal (droite) avec son cliché de diffraction des électrons

Pour des nanoparticules mono-cœurs magnétiques, il est numériquement rapporté une décroissance du SAR en fonction de la concentration en particules, à cause de l'accroissement de la contribution des interactions dipolaires dans la réponse de ces nanoparticules à une sollicitation magnétique extérieure [59]. Parallèlement son accroissement est cité quand les nanoparticules engagées sont magnétiquement douces (à faible densité d'anisotropie magnétique) [60][61]. Un accroissement du SAR avec l'augmentation de la concentration de nanoparticules magnétiquement douces a aussi été rapporté par d'autres auteurs et ce jusqu'à ce que les interactions dipolaires deviennent comparables au champ d'anisotropie. À ce niveau d'interactions, le SAR décroît lorsque la concentration en nanoparticules continue à augmenter [62].

Expérimentalement, c'est la relaxation Brownienne qui est utilisée pour justifier cette diminution du SAR. L'augmentation de la taille effective des nanoparticules due à l'agrégation réduit leur mobilité, ralentissant ainsi grandement le phénomène de relaxation de Brown [24]. Ainsi, des nanoparticules d'oxyde de fer de taille individuelle de 15 nm présentent un SAR de 250 W/g, mais lorsqu'elles s'agrègent en clusters de 60 nm, leur SAR diminue à 100 W/g, toutes conditions de mesure du SAR égales par ailleurs [24].

Le comportement de particules multi-cœurs magnétiques est différent selon qu'elles consistent en un assemblage de mono-cœurs magnétiques ou qu'elles consistent en de vrais polycristaux désordonnés. D'après Southern et col. [63] le SAR de clusters de nanoparticules de maghémite assemblées est supérieur à celui de polycristaux désordonnés. Les valeurs de SAR mesurées sur ces deux types d'objets sont rassemblées dans le tableau 4.3, comparées entre elles et avec celles de pseudo-monocristaux de taille à peu près similaire et montrent bien que dans l'ordre les pseudo-monocristaux sont les meilleurs agents chauffant avant les clusters et eux-mêmes avant les polycristaux, à taille de cristallite à peu près égale.

	$d_{\text{cristallite}}$ (nm)	$d_{\text{particule}}$ (nm)	$d_{\text{hydrodynamique}}$ $e$ (nm)	$M_s$ à 300 K ( $\text{kA}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{kg}^{-1}$ )	SAR ( $\text{W}/\text{g}_{\text{Fe}}$ )	Réf.
Polycristaux	24	108	115	100	9,4 <sup>(*)</sup>	[63]
	25	95	108	128	16,0 <sup>(*)</sup>	
Clusters	28	66	72	99	43,0 <sup>(*)</sup>	
Pseudo-monocristaux	4	32.3±5.0	30	--	206 <sup>(**)</sup>	[64]
	4	29.1±4.4	36	--	265 <sup>(**)</sup>	

Conditions de mesure : <sup>(\*)</sup> 6,6  $\text{kA}\cdot\text{m}^{-1}$  989 kHz    <sup>(\*\*)</sup> 10.2  $\text{kA}\cdot\text{m}^{-1}$  755 kHz

Tableau 4.19: Valeurs de SAR mesurées sur des particules multi-cœurs magnétiques de maghémite fonctionnalisés de différents types d'agrégation.

Au-delà de ces aspects purement physiques, l'assemblage des nanoparticules magnétiques sous forme de clusters, en utilisant des structures biologiques, comme les protéines, peut-être une stratégie intéressante en raison de son potentiel à améliorer la compatibilité biologique des nanoparticules. Cette approche, connue sous le nom de biofonctionnalisation, implique l'attachement des nanoparticules souvent à des macromolécules. La biofonctionnalisation peut influencer la façon dont les nanoparticules interagissent avec les cellules et les tissus. Par exemple, la conjugaison avec des protéines ciblant certaines cellules ou récepteurs peut améliorer la spécificité des nanoparticules [65]. Clairement, tous les effets mentionnés ci-dessus doivent être évalués et des compromis doivent être trouvés pour une application optimale en hyperthermie magnétique.

### 1.3.5. Influence du champ appliqué

L'étude de l'effet du champ magnétique sur l'hyperthermie magnétique, en particulier en ce qui concerne l'utilisation de nanoparticules magnétiques, représente un secteur essentiel de la recherche scientifique. Selon Dutz et Hergt [6], l'amplitude, la fréquence et la durée d'application du champ magnétique influencent directement l'efficacité du chauffage des nanoparticules, et par extension, leur efficacité thérapeutique.

Un champ magnétique de forte amplitude  $H$  induit un alignement plus important des moments magnétiques des nanoparticules, conduisant à une production de chaleur accrue lors de leur relaxation [50]. Hemery et al. montrent que la dépendance du SAR à l'amplitude du champ est une fonction polynomiale de degré 2 [52] comme illustré ci-dessus pour un choix de nanoparticules d'oxyde de fer et à différentes fréquences de champ (Figure 4.7). Cependant, un équilibre est nécessaire, car des champs extrêmement élevés peuvent conduire à la

saturation, un point au-delà duquel des augmentations supplémentaires du champ n'entraînent pas une augmentation significative de la chaleur.

Aussi, il est nécessaire d'ajuster les caractéristiques du champ magnétique en fonction des propriétés spécifiques des nanoparticules utilisées, notamment leur taille. Par exemple, des nanoparticules plus grandes peuvent nécessiter des champs plus intenses pour être efficacement chauffées, tandis que des nanoparticules plus petites peuvent être saturées à des intensités de champ plus faibles [66]. Ainsi des nanoparticules d'oxyde de fer petites (autour de 10 nm) atteignent leur saturation magnétique facilement et commencent à chauffer à des amplitudes de champ plus faibles que des particules plus grandes (autour de 20 nm).

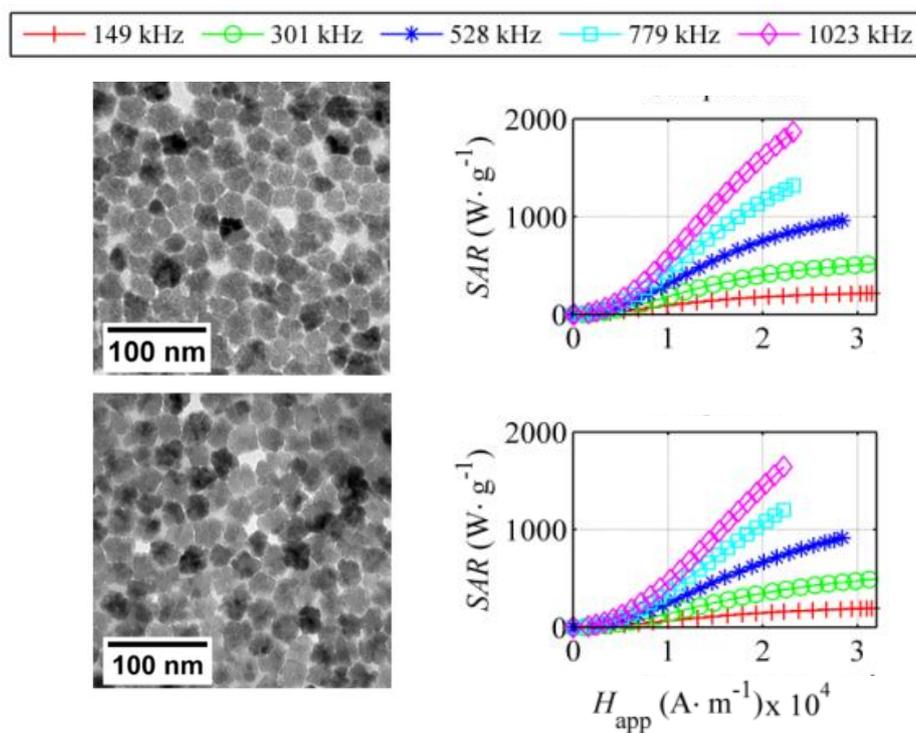


Figure 4.90: SAR mesuré à différentes fréquences pour des amplitudes de champ magnétique croissante, sur deux solutions colloïdales de nanoparticules d'oxyde de fer mono-corps de différentes tailles, toutes conditions expérimentales égales par ailleurs.

L'importance de l'adaptation des paramètres de champ magnétique aux types spécifiques de nanoparticules est une réalité incontournable [67]. Les conditions optimales de champ pour induire l'hyperthermie varient certes en fonction de la taille des nanoparticules mais aussi de leur nature chimique qui agit directement sur leurs propriétés magnétiques intrinsèques. Ainsi en variant l'amplitude du champ pour des nanoparticules de ferrite spinelle de différentes compositions chimiques mais de taille égale, il s'est avéré que des nanoparticules de ferrite de

manganèse-zinc (Mn-Zn)  $Zn_{1-x}Mn_xFe_2O_4$  présentaient une efficacité d'échauffement maximale à des fréquences de champ plus basses et à des amplitudes plus élevées en comparaison avec des nanoparticules de ferrite de nickel-zinc (Ni-Zn),  $Zn_{1-x}Ni_xFe_2O_4$  qui performaient mieux à des fréquences plus élevées.

La fréquence  $f$  du champ est un autre paramètre expérimental important. Une fréquence de travail optimale dépend des propriétés matérielles spécifiques et de la taille des nanoparticules [68]. S'il est communément admis que la fréquence doit rester comprise entre 50 kHz et 10 MHz pour générer assez de chaleur sans induire des contractions neuromusculaires, la condition selon laquelle le produit de la fréquence  $f$  par le temps de relaxation  $\tau$  des nanoparticules doit être égal à 1 est souvent appliquée (Eq. 4) :

$$f \times \tau \approx 1 \quad (\text{Eq.4})$$

Cette relation vient se superposer à celle de la limite de sécurité du champ magnétique pour l'usage humain, cette limite étant définie par la relation [69][70][66] (Eq. 5) :

$$H \times f < 5 \cdot 10^9 \text{ A} \cdot \text{m}^{-1} \cdot \text{s}^{-1} \quad (\text{Eq. 5})$$

Enfin d'un point de vue pratique, ces dépendances en amplitude  $H$  et en fréquence  $f$  a conduit la communauté scientifique à choisir une nouvelle grandeur pour mesurer de façon universelle la capacité à dissiper de la chaleur des nanoparticules magnétiques. Il s'agit de la puissance de perte intrinsèque (ILP) définit comme suit à partir du SAR ou SLP [48] (Eq. 6) :

$$ILP = \frac{SLP}{H^2 f} \quad (\text{Eq. 6})$$

En exprimant el SAR en Watt par kilogramme ( $\text{W} \cdot \text{kg}^{-1}$ ), l'unité de l'ILP communément utilisé est le nanoHenry mètre au carré par kilogramme ( $\text{nH} \cdot \text{m}^2 \cdot \text{kg}^{-1}$ ).

L'unité de l'ILP est Enfin, la durée d'application du champ est aussi cruciale. Si des expositions plus longues augmentent la quantité totale de chaleur produite, elles peuvent également entraîner un risque de surchauffe, potentiellement contre-productive ou même dangereuse dans un contexte clinique. Généralement, une application du champ de quelques minutes est souvent suffisante pour produire une élévation de température thérapeutique sans causer de dommages tissulaires indésirables.

## 1.4. Méthodes de mesure du SAR

La capacité des nanoparticules magnétiques à convertir l'énergie magnétique en chaleur, un paramètre connu sous le nom de Taux d'Absorption Spécifique (SAR). Cette grandeur peut être mesurée par deux approches différentes mais complémentaires : l'analyse des cycles d'hystérésis et la méthode calorimétrique. Chacune de ces méthodes révèle des aspects uniques de la façon dont les nanoparticules interagissent avec les champs magnétiques et produisent de la chaleur.

### 1.4.1. Analyse des cycles d'hystérésis

Un cycle d'hystérésis décrit comment l'aimantation des nanoparticules change en réponse à un champ magnétique externe appliqué. En termes simples, il s'agit de la tendance du matériau à conserver son aimantation même après la réduction du champ externe à zéro. Dans cette analyse, la variation de l'aimantation  $M$  est tracée en fonction du champ magnétique,  $M = f(H)$ . L'énergie perdue pendant ce processus, visualisée par l'aire sous la courbe d'hystérésis (Figure 4.8), indique la quantité de chaleur générée par les nanoparticules, autrement dit, divisée par la masse de nanoparticules utilisées, le SAR [71]. La concentration des nanoparticules dans une solution soumise à un stimulus magnétique, peut influencer la quantité de chaleur produite, d'où la nécessité de normaliser par la quantité de nanoparticules. À noter qu'une concentration élevée de nanoparticules peut favoriser les interactions entre particules (principalement dipolaire) et modifier la chaleur produite [72], comme déjà signalé dans le paragraphe précédent sur l'effet de l'agrégation des nanoparticules.

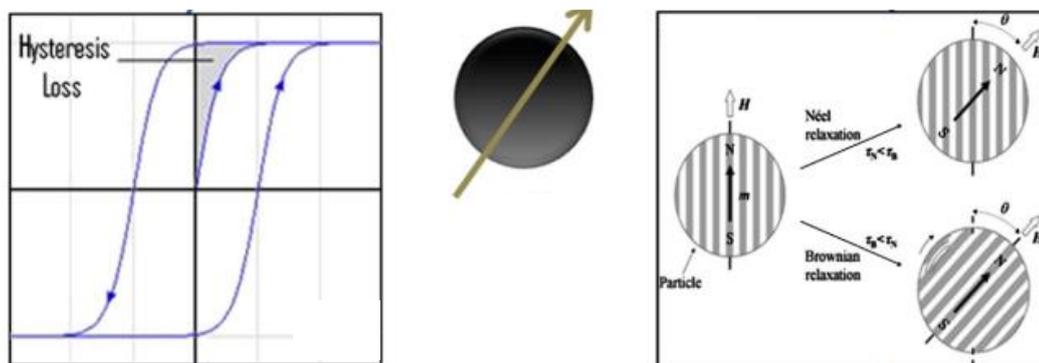


Figure 4.91: Représentation schématique des pertes par hystérésis pour la conversion de l'énergie magnétique en chaleur.

La méthode de mesure du SAR par analyse du cycle d'hystérésis, bien que rapide, quelques secondes, reste appropriée quand le mécanisme de dissipation de chaleur est essentiellement dû aux relaxation de Néel.

#### 1.4.2. Mesure calorimétrique

Dans le processus de mesure calorimétrique, l'échantillon contenant les nanoparticules est placé dans un calorimètre, et un champ magnétique oscillant est appliqué (Figure 4.9). La variation de température de l'échantillon est ensuite enregistrée en temps réel, fournissant une courbe de température en fonction du temps. L'aspect le plus critique de cette méthode est la phase initiale de l'augmentation de la température, qui doit être évaluée avec précision pour déterminer le SAR [30].

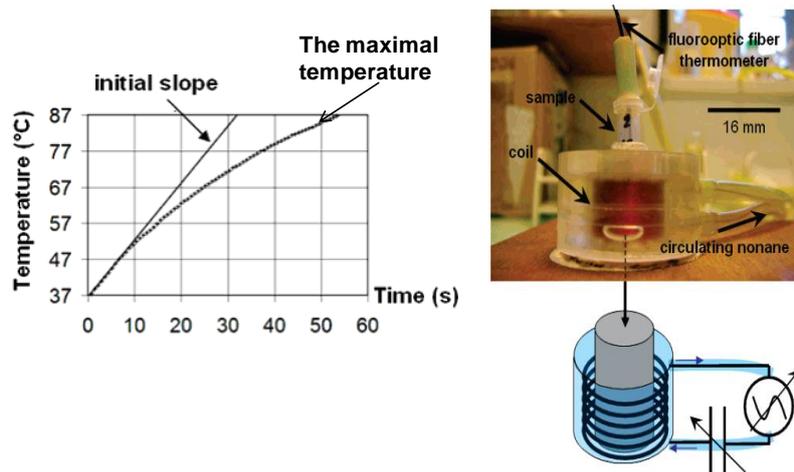


Figure 4.92: Illustration de la méthodologie de détermination du SAR par mesure calorimétrique.

Cette méthode de mesure a l'avantage de ne pas dépendre du mécanisme à l'origine de la dissipation de chaleur, qu'il soit de Néel ou de Brown, par calorimétrie seule l'élévation de température du fluide, dans lequel les nanoparticules magnétiques sont dispersées, compte. Mais si la concentration de nanoparticules est trop faible ou si le SAR des nanoparticules est faible, l'augmentation de température peut être minime et difficile à différencier des fluctuations normales ou du bruit de mesure. La précision de l'appareil de mesure, sa sensibilité, la stabilité thermique du système, et sa calibration doivent donc être rigoureusement maîtrisées [70][67].

Il est également crucial de s'assurer que la chaleur produite par les nanoparticules ne soit pas perdue par conduction, convection ou rayonnement dans l'environnement. Cela nécessite une isolation thermique efficace et un environnement de mesure contrôlé. Tout transfert de chaleur non comptabilisé pourrait conduire à une sous-estimation du SAR réel [6].

En pratique c'est la pente à l'origine de la courbe d'augmentation de la température  $T$  en fonction du temps  $t$  qui permet la mesure du SAR selon l'équation suivante (Eq. 7) :

$$SAR = \frac{c V_s}{m} \frac{dT}{dt} \text{ (Eq. 7)}$$

Où,  $C$  mesure la capacité calorifique du fluide caloporteur dans lequel les nanoparticules sont dispersées (solution colloïdale). À titre d'exemple, la valeur de  $C$  pour l'eau est de  $C_{H_2O} = 4.184 \text{ J/m}^3$ .  $V_s$  est le volume de ladite solution colloïdale et  $m$  est la masse de nanoparticules totale dans cette solution.

Dans le cas des nanoparticules d'oxydes de fer, le SAR est souvent exprimé en Watt par gramme de fer et non pas par gramme d'oxyde de fer.

## **2. Résultats : Propriétés magnétiques et magnétocaloriques des nanoparticules d'oxyde de fer et de leurs assemblages autour des virus de plantes**

Dans cette section, nous aborderons les étapes préliminaires des expériences visant à étudier les propriétés magnétocaloriques de nanoparticules d'oxyde de fer (NPs@Citrate) de trois tailles différentes, ~5, ~10 et ~15 nm, avant et après leur greffage sur le virus de plante RYMV de symétrie icosaédrique. Nous ne présenterons pas dans ce chapitre les résultats obtenus sur les assemblages de nanoparticules de maghémite sur le virus de plante TYMV, car encore incomplets.

Les résultats de magnéto-métrie ont essentiellement été obtenus sur un magnéto-mètre SQUID en champ magnétique statique ou dynamique. Les résultats de magnéto-calorimétrie ont été obtenus par mesures calorimétriques classiques ou par mesures des pertes d'hystérésis AC en champ alternatif.

Dans le chapitre 3 de notre étude, nous avons mis en avant l'efficacité de notre méthode de modification de surface, essentielle pour réaliser un assemblage tridimensionnel contrôlé de nanoparticules sur des capsides virales. Cette technique garantit une solubilité élevée et une stabilité dans des conditions aqueuses, tout en conservant les propriétés des nanoparticules et

des capsides virales. Les images obtenues par TEM et décrites dans cette partie du manuscrit montrent clairement l'uniformité de la distribution des nanoparticules sur la surface du virus RYMV (Figure 3.39) et l'organisation de ces nanoparticules selon une symétrie d'axe 5, la symétrie révélée par les virus étudiés, soulignant l'efficacité de notre processus de clustérisation des nanoparticules d'oxyde de fer synthétisées.

## 2.1. Résultats des mesures de magnétométrie

La variation thermique de l'aimantation  $M(T)$  en champ magnétique statique, mesurée grâce à un magnétomètre SQUID (Quantum Design modèle MPMS-5S), en mode ZFC pour «Zero Field Cooling», c'est-à-dire en refroidissant sans champ de l'ambiante à 5 K puis en appliquant un champ statique faible, par exemple de 100 Oe, à cette température et en mesurant l'aimantation sous champ en chauffant jusqu'à la température ambiante, et en mode FC pour «Field Cooling», c'est-à-dire en refroidissant de l'ambiante à 5 K sous le même champ statique et en mesurant l'aimantation, a été enregistrée pour les nanoparticules d'oxyde de fer fonctionnalisées aux ions citrates et (notées ci-après NPs@Citrate ou NPs@Cit) sous forme pulvérulente (Figure 4.10). Les courbes obtenues sont typiques de particules superparamagnétiques avec une nette irréversibilité entre les branches FC et ZFC de  $M(T)$ . La température au maximum de la branche ZFC- $M(T)$  est prise pour estimer la température moyenne de blocage  $\langle T_B \rangle$  pour chaque lot de nanoparticules. Comme attendu, les particules les plus petites donnent une valeur de  $\langle T_B \rangle$  la plus basse. Elle est autour de 50 K pour les NPs@Cit de 5 nm de diamètre, d'environ 250 K pour celles de 10 nm de diamètre et enfin autour de 300 K pour celles de 15 nm de diamètre. Ces résultats sont en accord avec une barrière d'énergie d'anisotropie magnétique  $\Delta E$  croissante avec le diamètre des particules. En effet, dans le modèle de Stoner-Wohlfart [73] la température de blocage dépend de  $\Delta E$  selon l'équation ci-après (Eq. 8):

$$T_B = \frac{\Delta E}{k_B \ln(\tau_m / \tau_0)} \quad (\text{Eq. 8})$$

Où,  $k_B$  représente la constante de Boltzmann,  $\tau_m$  le temps de mesure caractéristique de la technique utilisée ( $\tau_m \sim 100$  s pour un magnétomètre SQUID),  $\tau_0$  une constante de temps qui sera prise égale à  $10^{-10}$  s.

Toujours dans le modèle de Stoner-Wohlfart  $\Delta E$  est pris égal au produit de la constante d'anisotropie magnétique effective  $K_{\text{eff}}$  par le volume magnétique  $V_{\text{mag}}$  des particules (assumé

égal à  $(\pi/6) \langle D_{TEM} \rangle^3$ . En présence d'interactions dipolaires pas trop fortes cette relation est corrigée comme suit (Eq. 9) :

$$\Delta E = K_{\text{eff}} \times V_{\text{mag}} + E_{\text{int}} \quad (\text{Eq. 9})$$

Où  $E_{\text{int}}$  mesure l'énergie engagée dans les interactions dipolaires entre nanoparticules superparamagnétiques.

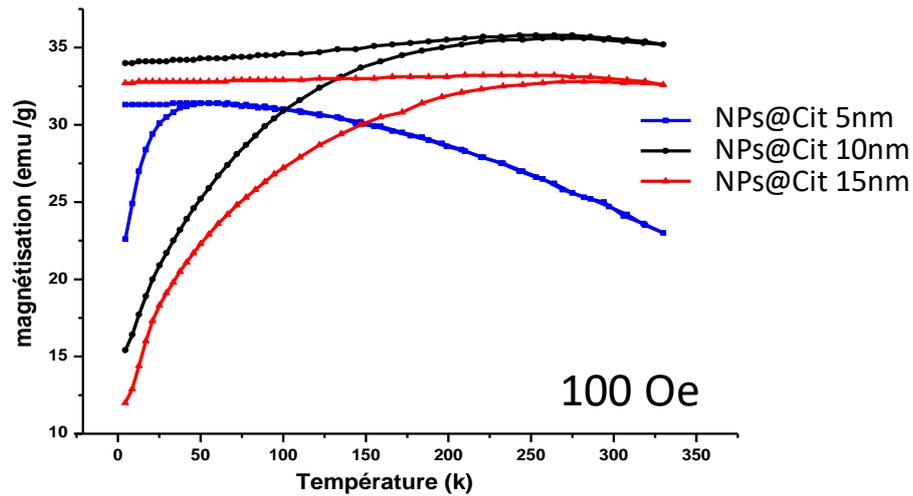


Figure 4.93: Variation thermique sous champ statique faible de 100 Oe mesurée en mode FC et ZFC sur les poudres de nanoparticules d'oxyde de fer fonctionnalisées aux ions citrates de trois tailles, 5, 10 et 15 nm.

La variation de l'aimantation en fonction du champ magnétique à basse température des nanoparticules fonctionnalisées aux ions citrates a aussi été mesurée pour déterminer la valeur de l'aimantation à saturation de celles-ci dans leur régime magnétique dit bloqué (Figure 4.11).

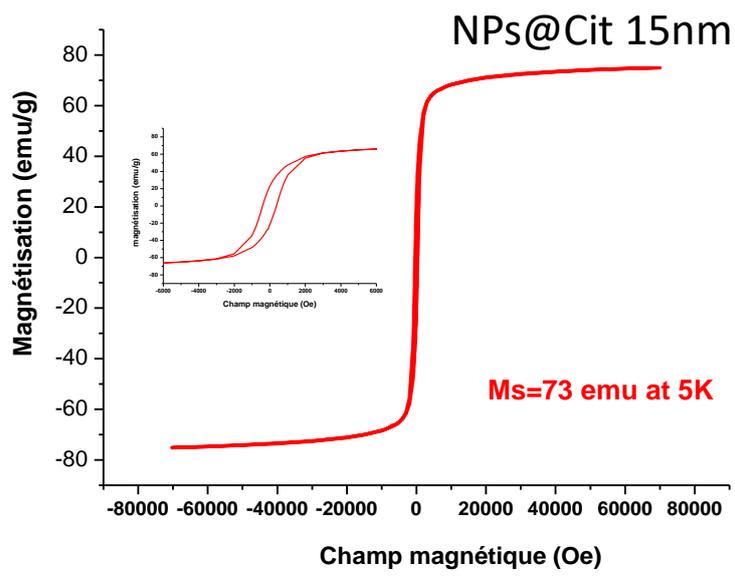
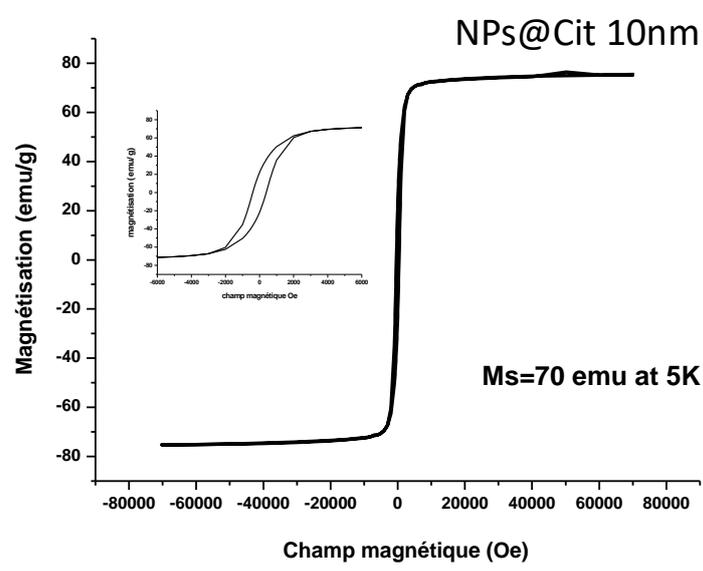
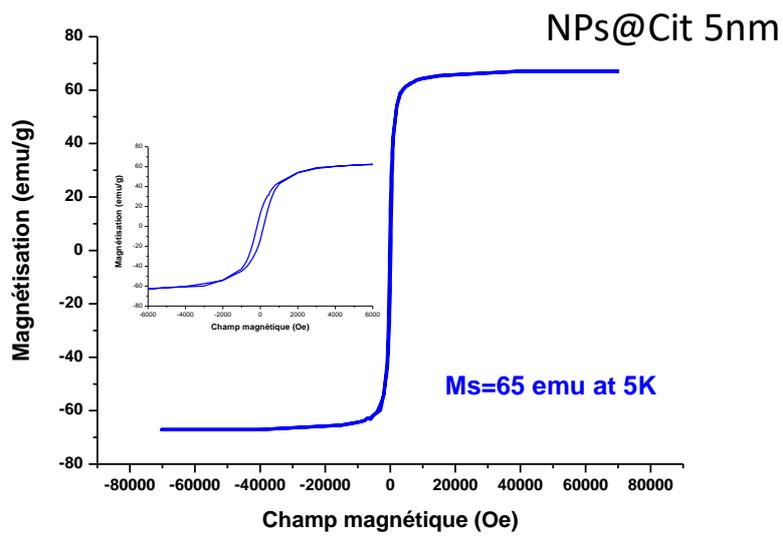


Figure 4.94: Variation de l'aimantation en fonction du champ magnétique statique à 5 K mesurée sur les poudres de nanoparticules d'oxyde de fer fonctionnalisées aux ions citrates de trois tailles, 5, 10 et 15 nm.

À cette température les nanoparticules présentent un comportement ferrimagnétique classique avec des valeurs de l'aimantation à saturation  $M_s$  qui diminuent quand le diamètre des nanoparticules diminue. En négligeant la contribution diamagnétique des ions citrates, les valeurs de  $M_s$  mesurées sont de 65, 70 et 73  $\text{A.m}^{-1}.\text{kg}^{-1}$  pour les nanoparticules de diamètre moyen 5, 10 et 15 nm, respectivement.

Des mesures de la variation thermique de l'aimantation de ces nanoparticules citratées ont aussi été mesurées sur leurs solutions colloïdales dans l'eau et sur les solutions colloïdales de leurs assemblages sur le virus RYMV, en mode FC et ZFC. On donne ci-après les tracés obtenus pour différentes valeurs du champ sur les colloïdes de nanoparticules fonctionnalisées libres (Figure 4.12) ou de leurs assemblages sur le virus RYMV (Figure 4.13). Pour ces mesures il ne faut considérer que la plage de température comprise entre 5 et 273 K ( $= 0^\circ\text{C}$ ) pour se placer en dessous de la température de congélation de l'eau et des artefacts que ce phénomène peut créer dans l'allure de  $M(T)$ . Ainsi, comme pour les mesures réalisées sur poudres, poudres qui ont été tassées au fond des portes échantillons, dans l'eau gelée des colloïdes, les nanoparticules ou leurs assemblages sur le virus RYMV ne peuvent pas bouger.

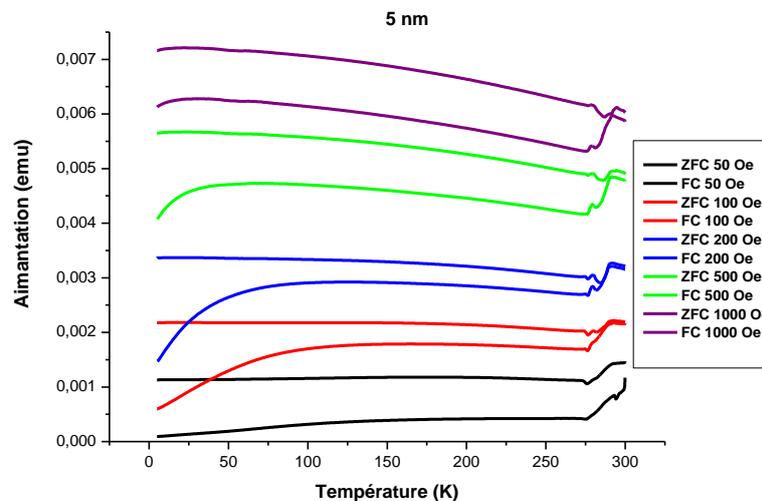
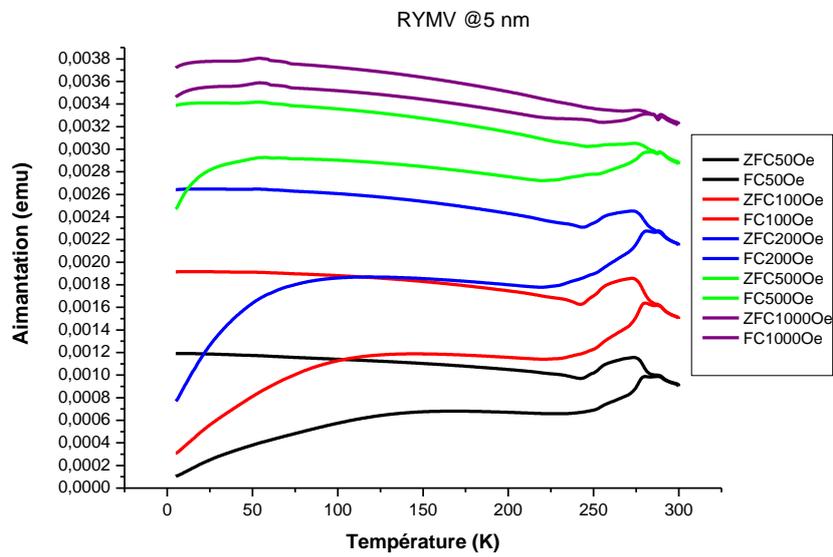




Figure 4.95: Variation thermique de l'aimantation dc des solutions colloïdales de NPs@Cit de 5, 10 et 15 nm de diamètre, libres. Les mesures ont été réalisées en champ dc de différentes amplitudes (de 50 Oe à 1000 Oe) en mode FC et ZFC.



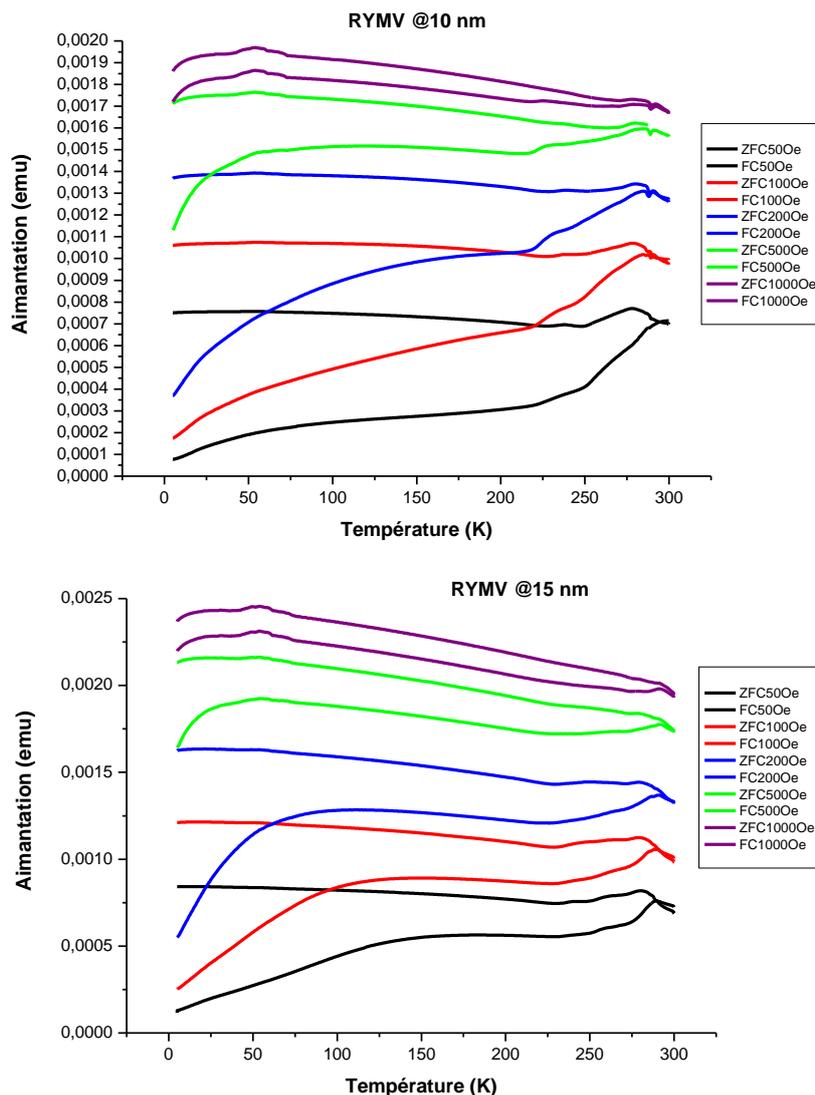


Figure 4.96: Variation thermique de l'aimantation dc des solutions colloïdales d'assemblages de NPs@Cit de différents diamètres sur le virus RYMV. Les mesures ont été réalisées en champ dc de différentes amplitudes (de 50 Oe à 1000 Oe) en mode FC et ZFC. Le pic observé sur les deux branches FC et ZFC autour de 50 K pour les mesures réalisées à haut champ (500 et 1000 Oe) est très probablement dû à une contamination magnétique (spatules, ciseaux, ...) des échantillons avant la mesure.

A noter que la concentration en fer a été choisie à peu près identique pour chaque système entre les colloïdes de nanoparticules libres et celles greffées sur le virus afin de rendre la comparaison possible (tableau 4.4) :

[Fe <sub>5nm</sub> ]	[Fe <sub>10nm</sub> ]	[Fe <sub>15nm</sub> ]
0,27 g/L	0,25 g/L	0,52 g/L

Tableau 4.20 : Valeurs des concentrations en fer des solutions colloïdales de nanoparticules d'oxyde de fer et de leurs assemblages sur le virus RYMV, dans l'eau milli-Q.

Les courbes obtenues présentent la même irréversibilité que celle observée sur les poudres de nanoparticules citratées confirmant ainsi le maintien du comportement superparamagnétiques des cœurs magnétiques malgré leur assemblage. En se focalisant sur la gamme de température de 5 à 273 K, il n'est pas facile de distinguer précisément la température de blocage des NPs@Cit libres ou assemblées, ni même entre famille par taille de nanoparticules. Les allures relativement similaires nous empêchent de conclure et nous conduisent à mener une dernière série de mesures magnétiques, à savoir la variation thermique de la susceptibilité magnétique alternative à basse fréquence (entre 1 et 999 Hz) mesurée en mode ZFC. Ce type de mesure est très sensible aux différents phénomènes dynamiques qui peuvent exister au sein de nos colloïdes gelés.

Effectivement les courbes de la contribution dans le plan de la susceptibilité magnétique alternative  $\chi'$  enregistrées à différentes fréquences présentent deux maxima sur les nanoparticules citratées libres et un seul maximum sur celles assemblées sur le virus RYMV. De plus, ces maxima varient avec la fréquence comme illustré ci-après dans le cas des nanoparticules d'oxyde de fer de 10 nm de diamètre (Figure 4.14).

Plus précisément, la température au maximum de  $\chi'(T)$ ,  $T_{\max}$ , se déplace vers des températures plus élevées lorsque la fréquence croît. Ce déplacement indique que les moments magnétiques des nanoparticules ont une dynamique de relaxation qui change selon la fréquence du champ oscillant. La dynamique de relaxation décrit la manière dont ces moments retournent à leur état initial après une perturbation due à un champ magnétique. Cette variation observée en fonction de la fréquence du champ offre des indications sur les propriétés intrinsèques des nanoparticules (anisotropie magnétique) et les propriétés collectives (verre de spin, superferromagnétisme, etc.).

L'observation d'un maximum dans la même gamme de température pour les nanoparticules libres et assemblées et d'un second maximum dans une gamme de températures plus basses pour les nanoparticules libres traduit l'existence de deux phénomènes ou d'effets magnétiques différents. Pour trancher nous avons calculé le temps caractéristique de mesure magnétique pour chaque fréquence à savoir  $\tau = 1/f$  et nous avons tracé la variation de son logarithme en fonction de l'inverse de  $T_{\max}$  pour chaque fréquence (Figure 4.15).

Avant d'aller plus loin dans nos analyses, il faut savoir que pour des nanoparticules superparamagnétiques isolées la dépendance de  $\ln\tau$  en fonction de  $1/T_{\max}$  s'écrit comme suit [74] (Eq. 10) :

$$\ln\tau = \ln\tau_0 + \frac{\Delta E}{K_B T_{\max}} \quad (\text{Eq. 10})$$

$\Delta E$  mesurant, comme annoncé précédemment, la barrière énergétique d'anisotropie magnétique dans le modèle de Stoner-Wolfarht, éventuellement augmentée d'une contribution d'interactions dipolaire faible.

Si ces interactions sont plus forte, un état verre de macrospin peut se manifester et dans ce cas, la dépendance de  $\tau$  en fonction de  $T_{\max}$  est complètement différente. Ce n'est plus une loi d'Arrhénius mais une loi de puissance telle que proposée par De Toro et al.[75] (Eq. 11):

$$\tau = \tau_0 \left( \frac{T_{\max}}{T - T_{\max}} \right)^{-\beta} \quad (\text{Eq. 11})$$

Si ces interactions sont encore plus fortes, c'est un état de superferromagnétisme qui peut s'installer comme proposé par Bidanta et col. [76] et illustré dans la figure ci-après (Figure 4.16). Dans ce cas la température d'ordre ne devrait pas dépendre de la fréquence de mesure.

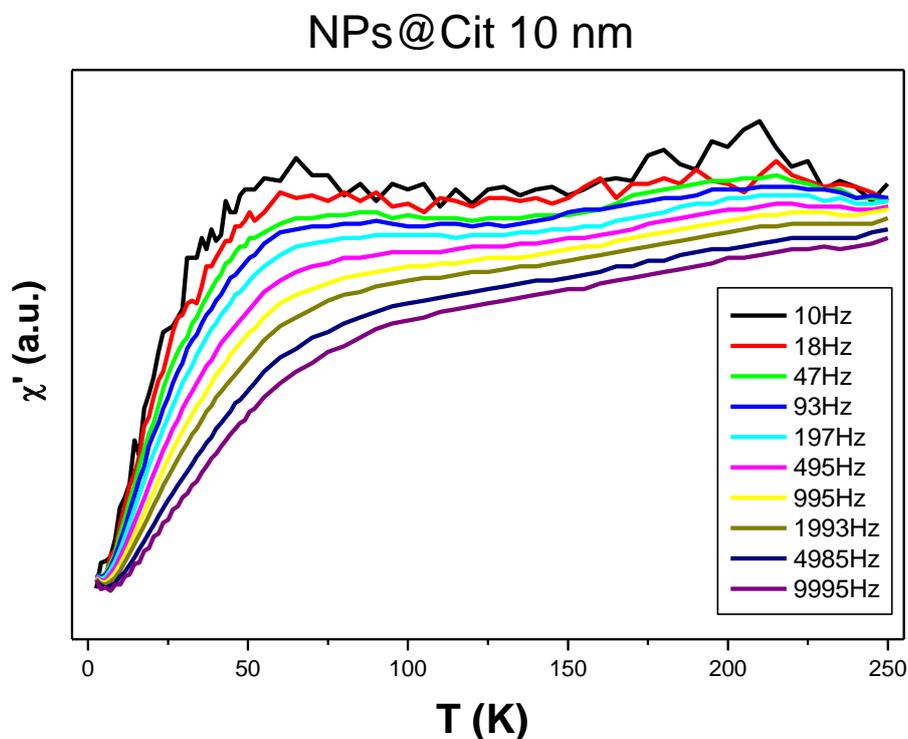
Si nous replaçons ces rappels dans le contexte de la présente étude, les courbes  $\chi'(T)$  des assemblées des NPs@Citrates sur virus, comme nous l'avons dit précédemment, ne présentent qu'un seul maximum et que la température à ce maximum,  $T_{\max}$ , varie en fonction du temps de mesure  $\tau$  ( $= 1/f$ ) de sorte que ce temps présente une dépendance à la température typiquement de type Arrhénius (Figure 4.15). De la pente déduite d'un affinement linéaire des données  $\{\ln\tau, 1/T_{\max}\}$ , il est possible de mesurer une barrière énergétique de  $\Delta E/k_B = 4039.5$  K. Ce même traitement numérique réalisé sur les données relatives au premier maximum observé sur les courbes  $\chi'(T)$  des NPs@Cit libres, celui à haute température, permet d'accéder à la valeur de la barrière d'énergie associée, à savoir  $\Delta E/k_B = 767.6$  K. Cette valeur est cinq fois plus faible que celle des assemblages.

Deux hypothèses permettent d'expliquer cette différence. La première consiste à dire que l'expression de l'équation 9,  $\Delta E = K_{\text{eff}} \times V_{\text{mag}} + E_{\text{int}}$ , le terme  $E_{\text{int}}$  dans les assemblages est significativement supérieur à celui pour les particules libres, et donc que les interactions dipolaires dans les assemblages sont plus fortes. Cette hypothèse nous semble peu soutenable

car l'observation d'une loi d'Arrhenius dans la variation de  $\tau$  en fonction de  $T_{max}$ , dans les assemblages sur virus n'est possible que si justement les interactions dipolaires sont faibles.

La deuxième hypothèse repose sur la qualité cristallographique des assemblages de particules mise en évidence par les observations de microscopie électronique à haute résolution (voir chapitre 3). En effet, les nanoparticules élémentaires de 10 nm qui constituent chaque assemblage autour de chaque virus RYMV, semblent s'organiser de façon ordonnée. Les plans cristallographiques d'une particule semblent parallèles à ceux de ses nanoparticules voisines (Figure 4.17), formant ainsi des agglomérats orientés se comportant comme des pseudo-monocristaux. Dans l'expression de l'équation 9, le terme  $K_{eff} \times V_{mag}$  devient plus grand,  $V_{mag}$  représentant cette fois ci le volume du pseudo-monocristal et non plus le cristal élémentaire de 10 nm. Le terme  $E_{int}$  dans cette équation devenant l'interaction entre assemblage de NPs@Cit et non pas entre NPs@Cit dans un même assemblage. Cette hypothèse nous paraît la plus vraisemblable. Elle permettrait, comme nous le verrons ultérieurement, d'expliquer les valeurs élevées de SAR mesurées sur ces assemblages.

Reste maintenant à élucider l'origine du deuxième maximum, observé à plus basses températures, sur les courbes  $\chi'(T)$  des NPs@Cit libres (Figure 4.14).



### RYMV - NPs@Cit 10 nm

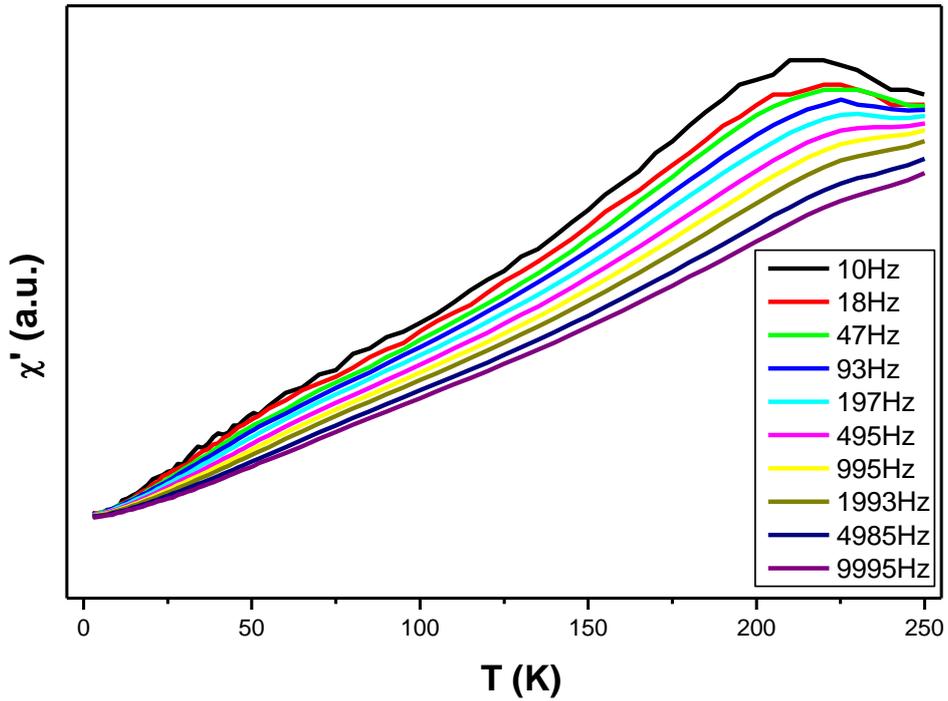
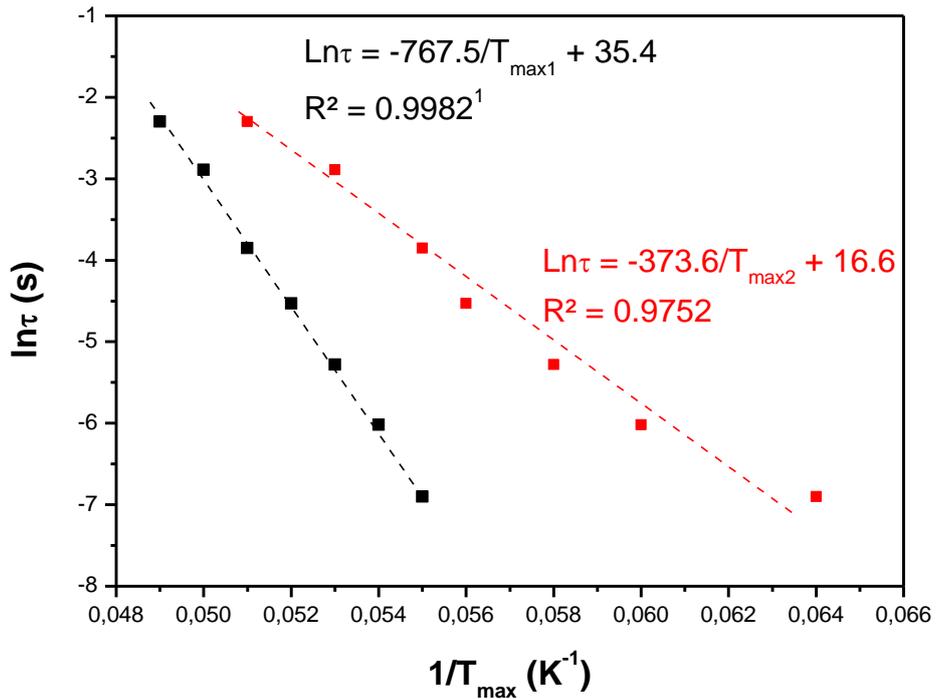


Figure 4.97: Variation thermique de la composante dans le plan de la susceptibilité magnétique alternative  $\chi''$  de la dispersion colloïdale dans l'eau de NPs@Cit de 10 nm et de la dispersion colloïdale, de leur assemblage sur le virus RYMV à concentration égale en fer (0,25 g/L). L'amplitude du champ appliqué est de 2 Oe et sa fréquence  $f$  a été variée de 1 à 9999 Hz et les mesures en été réalisées en mode ZFC.

### NPs@Cit 10 nm



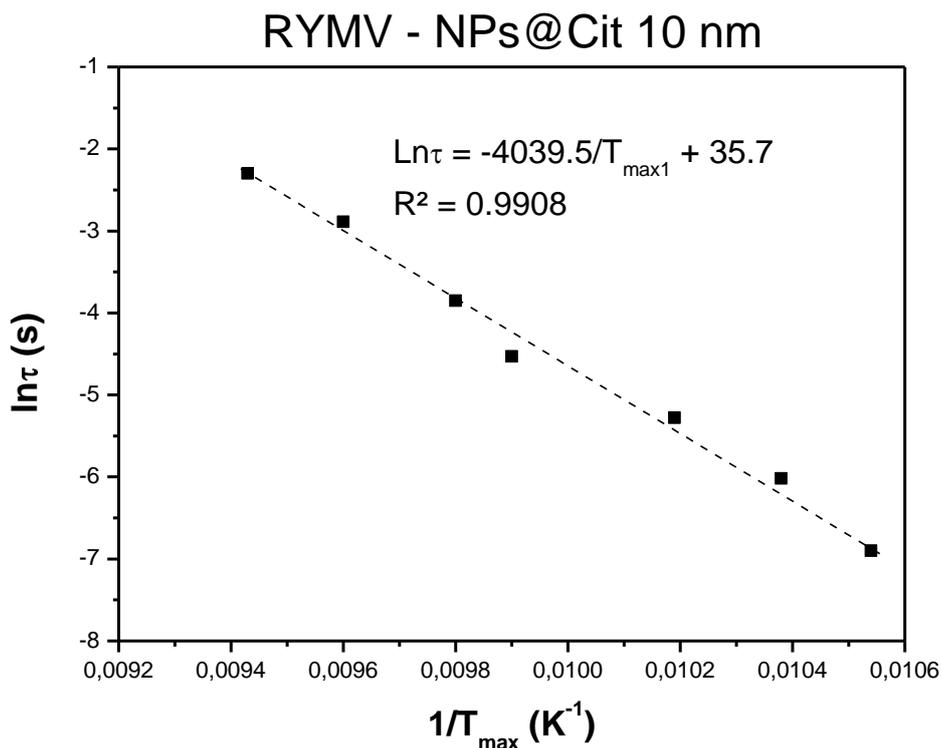


Figure 4.98: Variation du logarithme népérien du temps de mesure  $\tau = 1/f$  en fonction de l'inverse de la température du ou des maximums de  $\chi'(T)$  pour la dispersion colloïdale dans l'eau de NPs@Cit de 10 nm et la dispersion colloïdale de leur assemblage sur le virus RYMV à concentration égale en fer (0,25 g/L). L'amplitude du champ appliqué est de 2 Oe et sa fréquence a été variée de 1 à 9999 Hz et les mesures en été réalisées en mode ZFC.

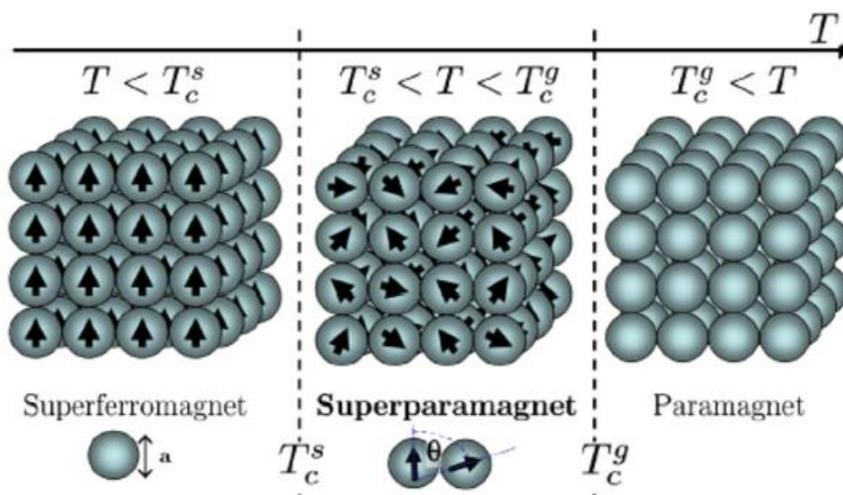


Figure 4.99: Schéma d'une assemblée 3D de nanoparticules magnétiques dans différents régimes magnétiques: superferromagnétisme (gauche), superparamagnétisme (milieu) et paramagnétisme (droite). Pour chaque régime, les différentes orientations des macrospins sont représentées avec indication des températures critiques de transition entre un régime et un autre. Cette représentation ne considère pas le régime dit de verre de macrospin, qui pourrait s'installer entre le superferromagnétisme et le superparamagnétisme.

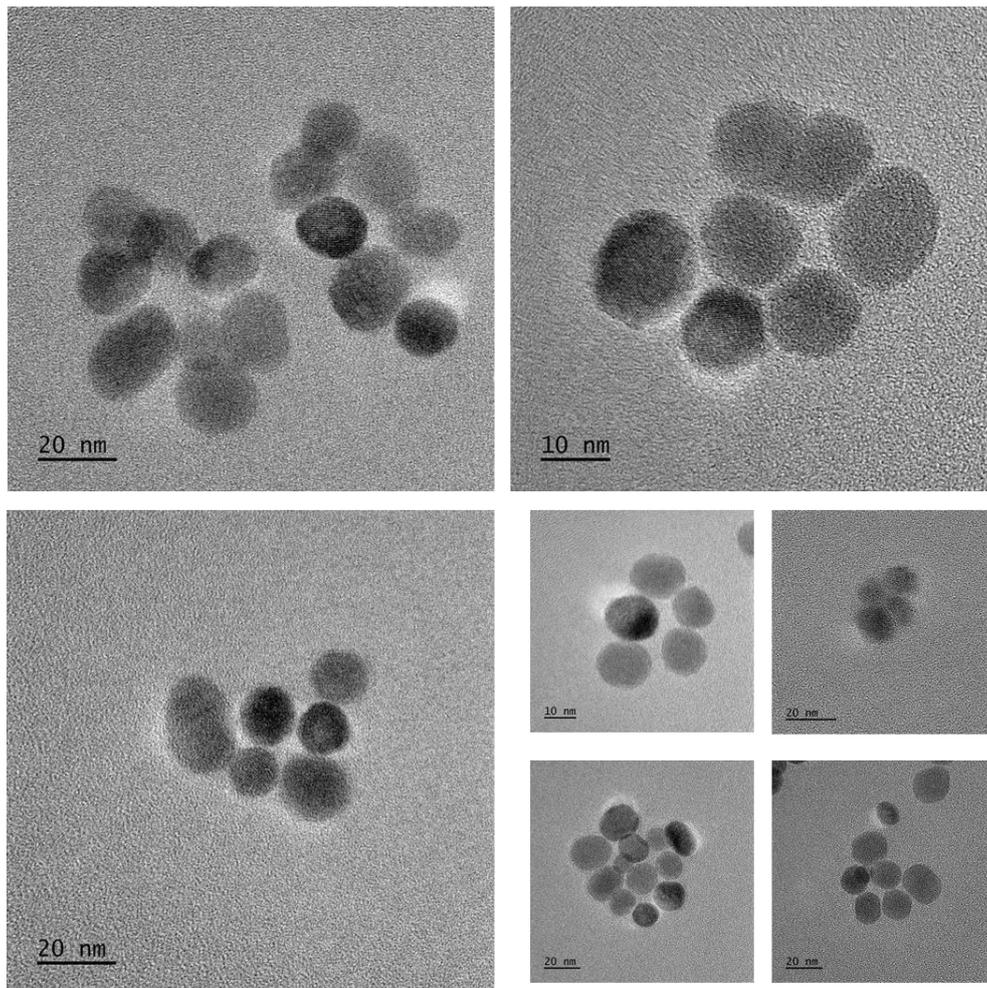


Figure 4.100: Images HRTEM d'assemblages de nanoparticules d'oxyde de fer citratées de 10 nm de diamètre autour de virus RYMV présentant une orientation cristallographique unique, typique de pseudo-monocristaux.

En essayant d'appliquer une loi d'Arrhenius à la variation du temps de mesure  $\tau$  ( $= 1/f$ ) en fonction de  $T_{\max}$  (Figure 4.15), on constate rapidement qu'une régression linéaire est moins adaptée pour décrire ces données expérimentales. L'hypothèse de l'installation d'un régime de verre de macrospin pourrait expliquer cet écart, mais en même temps elle n'est pas compatible avec l'état de dilution des nanoparticules citratées. Il aurait été intéressant de refaire ces mêmes mesures sur des dispersions colloïdales de nanoparticules citratées libres à différentes concentrations pour constater la persistance de ce deuxième maximum et pour relever l'évolution de sa  $T_{\max}$  en fonction de la fréquence du champ magnétique appliqué. Cette étude n'a pas pu être menée faute de temps. D'ailleurs, les mêmes mesures en fréquences sur les suspensions colloïdales des nanoparticules sœurs de 5 et 15 nm citratées, libres et assemblées, n'ont pas pu être menées. Ce travail d'investigation devra être complété à la suite de cette thèse.

En conclusion, les assemblages de nanoparticules magnétiques d'oxyde de fer citratées tendent à se comporter comme de large pseudo-monocristaux superparamagnétiques, avec donc un volume magnétique bien supérieur à celui des nanoparticules individualisées et donc une barrière d'anisotropie magnétique beaucoup plus grande.

## 2.2. Résultats des mesures d'hyperthermie magnétique

### 2.2.1. Cas des nanoparticules citratées libres

#### 2.2.1.1. Choix des concentrations de travail

Pour commencer, nous avons essayé de mesurer, à température ambiante, les cycles d'hystérésis en champ alternatif, à des fréquences choisies (typiquement 280-290 kHz et 340-350 kHz), compatibles avec l'application de l'hyperthermie magnétique, sur des solutions colloïdes de nanoparticules citratées (NPs@Citrate) de 5, 10 et 15 nm de diamètre dans l'eau. Ces mesures devraient permettre la détermination des valeurs de SAR pour chaque fréquence choisie et les valeurs de SAR standardisées, à savoir les valeurs de ILP, pour pouvoir, à termes, comparer les performances de nos nanoparticules à celles de la littérature, pour l'application visée.

Avant cela, nous avons réalisé des essais préalables pour déterminer la concentration optimale en nanoparticules d'oxyde de fer (en masse d'élément fer par millilitre de solution) pour que ces mesures soient significatives. En effet, la concentration en nanoparticules doit être suffisamment faible pour éviter l'agrégation des nanoparticules et leur floculation et à la fois suffisamment élevée pour induire un chauffage mesurable par application d'un champ alternatif à la fréquence choisie.

Grâce à une collaboration avec Hong Nam Pham de l'académie des sciences et technologie du Vietnam, des mesures de calorimètre ont été menées pour un champ alternatif de 290 kHz et différentes amplitudes de champ : 4 kA/m (50,3 Oe), 8 kA/m (100,5 Oe), 12 kA/m (150,8 Oe), 16 kA/m (200,1 Oe), 20 kA/m (251,3 Oe) et 24 kA/m (301,6 Oe). Sur l'exemple des nanoparticules citratées de 10 et 15 nm, les courbes température-temps ont été mesurées pour différentes concentrations de 0.01 à 1.00 g/L. Cette étude nous a conduit à choisir la concentration massique en fer entre 0,25 g/L, pour constater une élévation de température d'au moins un degré pour l'amplitude la plus faible du champ et sans excéder une variation de

plus de 10 degré (Figure 4.18). En effet, aux concentrations trop faible (0.01 g/L), les effets de chauffage sont quasiment nuls alors qu'aux concentrations élevées (typiquement 1g/L), le chauffage est trop fort et ne peut être transposé à un usage en clinique du fait du risque réel d'atteinte des tissus sains à proximité.

Ces résultats sont bien en accord avec plusieurs autres études antérieures sur la capacité de chauffage de nanoparticules magnétiques lorsque leur concentration augmente [77][78]. Attention, des concentrations trop grandes, ici supérieures à 1,00 g/L pourraient induire l'apparition d'interactions dipolaires de plus en plus fortes entre les nanoparticules affectant de façon préjudiciable les relaxations de Néel et de Brown en solution [78]. Les nanoparticules ne sont alors plus capables de se retourner librement sous l'action d'un champ magnétique, ce qui réduit leur capacité à chauffer par friction avec leur fluide porteur. Donc il existe une concentration optimale en nanoparticules pour laquelle des valeurs élevées du SAR, tout en minimisant les interactions magnétiques mutuelles entre les nanoparticules, en évitant leur agrégation et leur floculation et bien sûr en modérant les températures de chauffe atteinte. Pour ce qui nous concerne, et comme dit ci-avant, nos différents essais nous ont conduit à retenir la valeur de 0,25 g/L pour la suite de notre étude.

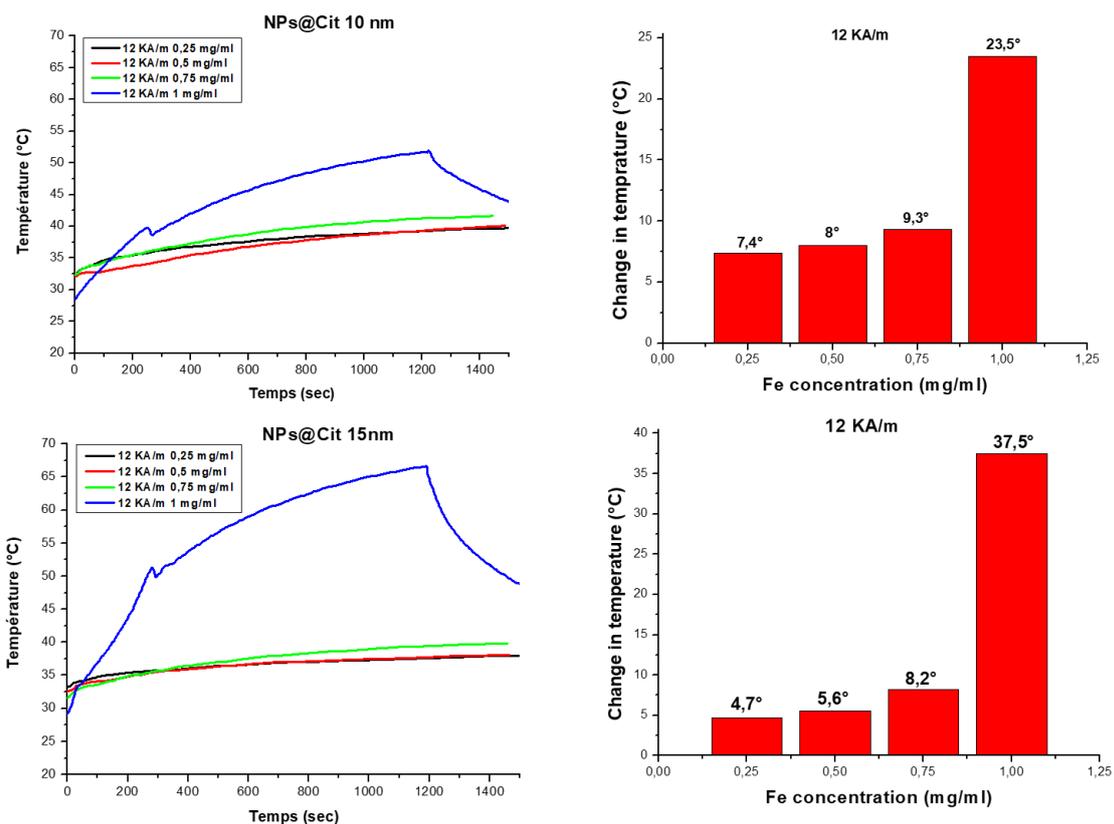


Figure 4.101: Suivi de l'élévation de température en fonction du temps lors de mesures calorimétriques sur colloïdes de nanoparticules d'oxyde de fer citratées de 10 et 15 nm de diamètre sous l'effet d'un champ magnétique alternatif d'amplitude 12 kA/m et de fréquence 290 kHz, pour des concentrations massiques en fer variant entre 0.25 et 1.00 g/L. Les élévations de température pour chaque concentration sont données sous la forme d'histogramme.

Aussi, ces mesures préliminaires nous ont permis de choisir la gamme d'amplitude de champ magnétique de travail. En effet, toujours à 290 kHz, la température des solutions colloïdales préparées augmente significativement avec l'amplitude du champ  $H_{app}$ , particulièrement pour des valeurs de  $H_{app}$  de 20 et 24 kA/m comme illustré dans la figure 4.19 sur l'exemple des solutions colloïdales dans l'eau des nanoparticules citratées de 10 et 15 nm. Faute de temps, les mesures sur les colloïdes de nanoparticules citratées de 5 nm n'ont pas pu être réalisées. Elles manquent cruellement à notre analyse, surtout que ces particules présentent la plus faible aimantation et donc une capacité à chauffer moindre. À défaut, les résultats obtenus sur les NPs@Cit de 10 et 15 nm serviront de référence pour la suite de notre étude.

Par ailleurs, comme le produit de l'amplitude du champ par la fréquence doit continuellement respecter l'inéquation de sécurité  $H \times f < 5 \cdot 10^9 \text{ A} \cdot \text{m}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ , les valeurs du champ de 20 et 24 kA/m ne seront pas considérées, car à 280-290 kHz (ou même à 340-350 kHz), leur produit par la fréquence de travail dépasse la limite clinique de  $5 \cdot 10^9 \text{ A} \cdot \text{m}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ .

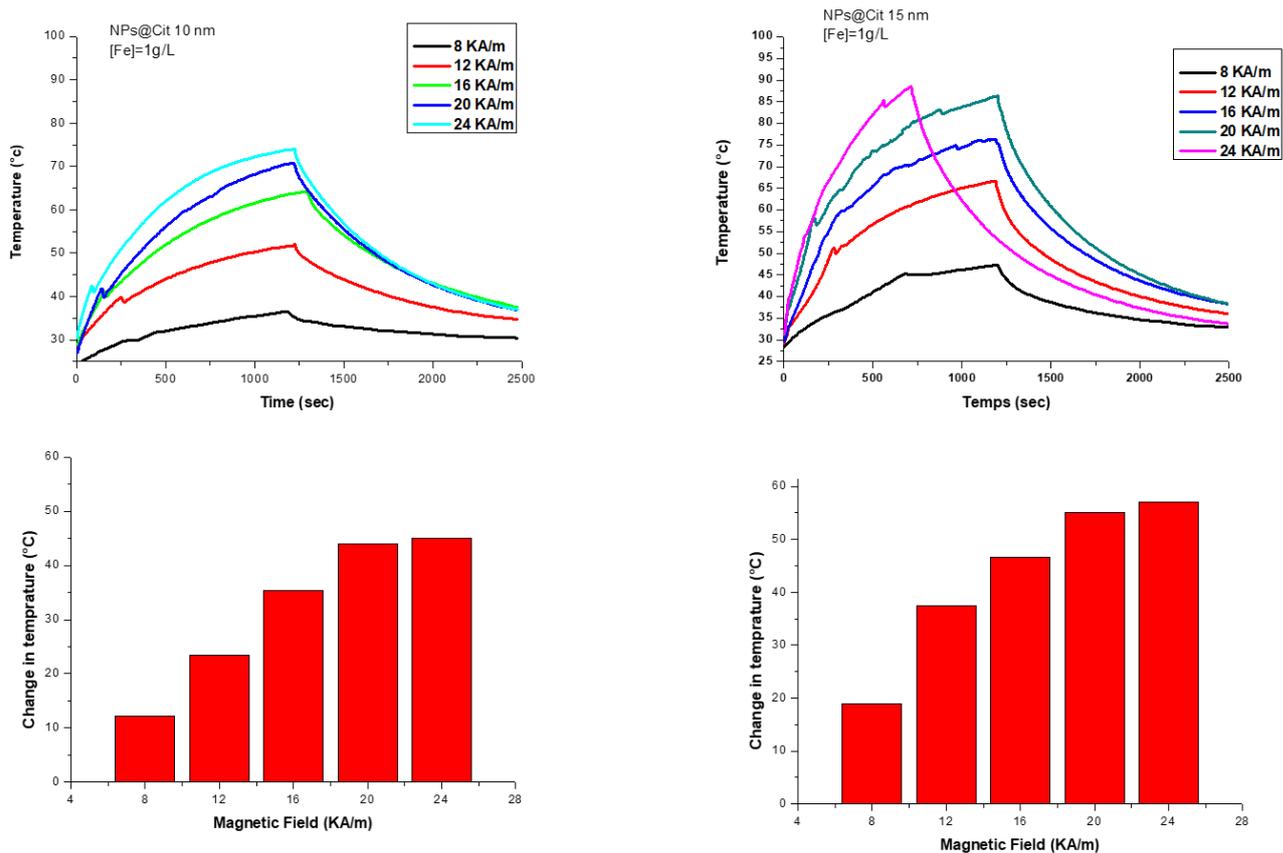


Figure 4.102: Suivi de l'élévation de température en fonction du temps lors de mesures calorimétriques sur colloïdes de nanoparticules d'oxyde de fer citratées de 10 et 15 nm de diamètre sous l'effet d'un champ magnétique alternatif de différentes amplitudes (de 4 à 24 kA/m) et à fréquence égale, 290 kHz, pour une concentration massique en fer fixe de 1,00 g/L. Les élévations de température sont données sous la forme d'histogramme pour chaque valeur de champ et chaque type de particules.

### 2.2.1.2. Choix de l'amplitude de champ magnétique alternatif appliqué

Dans un second temps, nous avons volontairement choisi de mesurer les cycles d'hystérésis AC de tous les colloïdes préparés dans l'eau milli-Q, des NPs@Cit de 5, 10 et 15 nm de diamètre, libres ou assemblées sur le virus RYMV pour des concentrations massiques en fer de 0,25 g/L, et ce pour différentes amplitudes de champ, ne dépassant pas idéalement la valeur de 16 kA/m. Deux fréquences ont été testées, 280 kHz, proche de celle utilisée pour les essais préliminaires précédents et 344 kHz. Le choix de ces valeurs de fréquences a été essentiellement conditionné par les dispositifs de mesures disponibles pendant cette étude.

Ce type de mesure a été privilégié aux mesures calorimétriques classiques, car le mécanisme de dissipation de la chaleur attendu pour les objets étudiées est selon toute vraisemblance, un mécanisme de relaxation de Néel. En effet nous savons que pour la gamme de taille de

particules d'oxyde de fer étudiées (5, 10 et 15 nm de diamètre), le temps de relaxation de Néel est plus petit que le temps de relaxation de Brown dans l'eau [24] et donc la relaxation de Néel est plus rapide que la relaxation de Brown, donc plus efficace pour ce qui nous intéresse ici.

Ceci étant dit, la question des pseudo-monocristaux de taille supérieure proposée précédemment

Pour décrire les propriétés magnétiques des assemblages sur virus RYMV reste pendante. Dans ce cas, la taille des agrégats de nanoparticules devient supérieure à la taille limite proposée par Fortin et col. [24], au-delà de laquelle le mécanisme de Brown devient prépondérant dans l'eau. Cette taille limite est d'après la figure 4.3, juste au-dessus de 15 nm de diamètre. De là, pour être les plus exhaustifs possible dans l'étude des performances de ces assemblages vis-à-vis de l'application visée, les mesures de cycles d'hystérésis AC sur ces assemblages sont complétées par des mesures calorimétriques pour les mêmes fréquences et les mêmes amplitudes de champ magnétique. Les valeurs de SAR déduites des deux méthodes seront ainsi comparées et discutées.

Les cycles d'hystérésis mesurés sur les solutions colloïdales dans l'eau des NPs@Cit libres de 5, 10 et 15 nm de diamètre pour des amplitudes de champ maximale de 4, 8, 12, 16, 20 et 24 kA/m sont donnés ci-après pour une fréquence de 280 kHz et 344 kHz (Figures 4.20 et 4.21), la concentration en fer étant fixée comme dit ci-avant à 0,25 g/L.

Les cycles incarnent l'interaction dynamique entre les NPs@Cit libres et le champ magnétique alternatif. Cette interaction induit un déphasage des moments magnétiques des nanoparticules par rapport au champ, ce qui entraîne une transformation partielle de l'énergie magnétique en chaleur, qui est ensuite dissipée dans le milieu aqueux. Pour une fréquence donnée, l'augmentation de l'amplitude du champ  $H_{app}$  élargit les cycles [79][80][81]. Une surface plus large des boucles d'hystérésis est synonyme d'une plus grande énergie dissipée et par conséquent d'une valeur de SAR plus grande (Tableau 4.5). À noter qu'on retrouve bien la dépendance en  $H_{app}^2$  du SAR pour les trois lots de nanoparticules (Figure 4.22).

Les valeurs de SAR mesurées indiquent aussi que les nanoparticules citratées de 10 et 15 nm de diamètre sont plus performantes que celles de 5 nm de diamètre (Figure 4.22), du fait de leurs aimantations supérieures. On rappelle que l'aimantation à saturation mesurée à très basse température sur en champ statique est de 65, 70 et 73  $A.m^{-1}.kg^{-1}$  pour les nanoparticules de 5, 10 et 15 nm, de diamètre, respectivement (Figure 4.11).

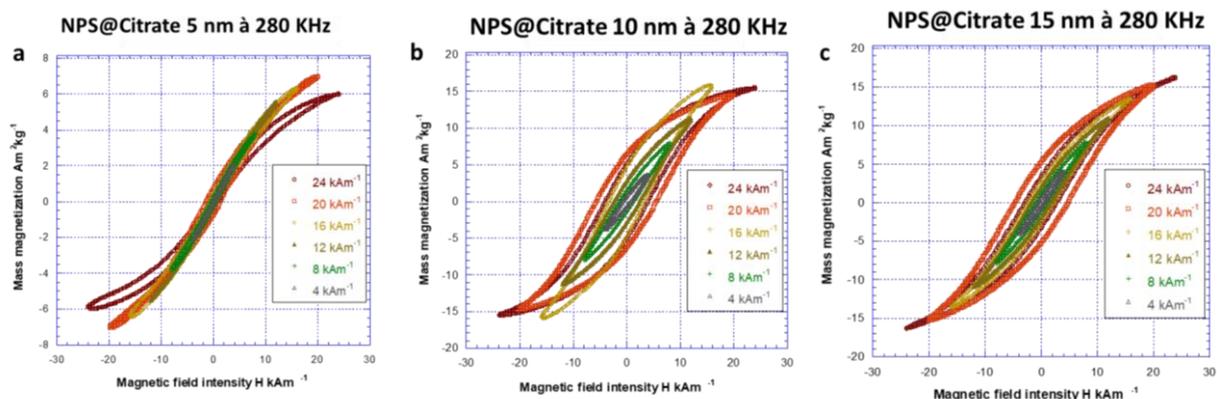


Figure 4.103: Cycles d'hystérésis AC des solutions colloïdales dans l'eau des NPs@Cit de 5, 10 et 15 nm de diamètre ( $[Fe] = 0.25 \text{ g/L}$ ) pour différentes amplitudes de champ  $H_{app}$  et à la fréquence  $f$  de 280 KHz.

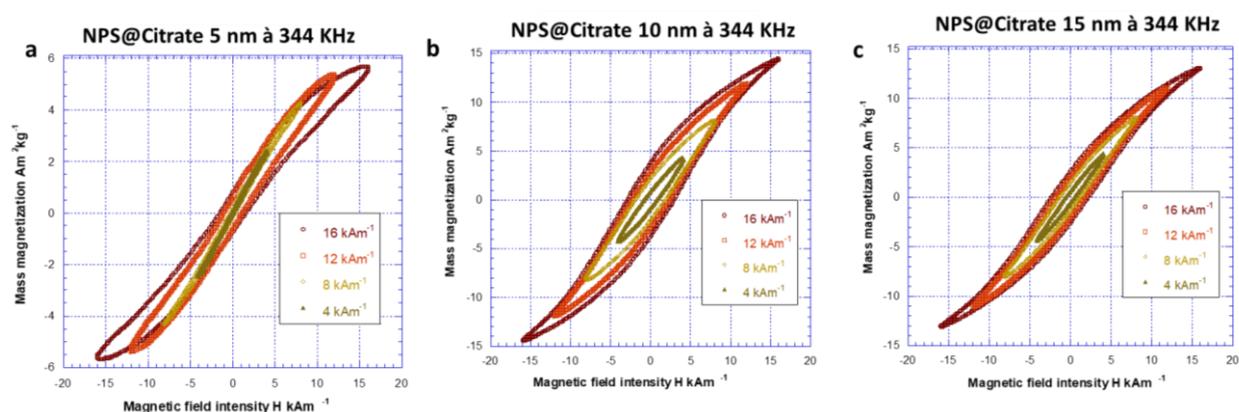


Figure 4.104: Cycles d'hystérésis AC des solutions colloïdales dans l'eau des NPs@Cit de 5, 10 et 15 nm de diamètre ( $[Fe] = 0.25 \text{ g/L}$ ) pour différentes amplitudes de champ  $H_{app}$  et à la fréquence  $f$  de 344 KHz.

280 kHz						
H (kA/m) (*)	NPs@Citrate de 5 nm		NPs@Citrate de 10 nm		NPs@Citrate de 15 nm	
	Aire (mJ/kg) (**)	SAR (W/g) (**)	Aire (mJ/kg) (**)	SAR (W/g) (**)	Aire (mJ/kg) (**)	SAR (W/g) (**)
4	0,7	0,2	10,6	2,9	8,5	2,4
8	8,4	2,3	38,6	10,7	28,0	7,8
12	14,0	3,9	99,5	27,7	68,8	19,2
16	25,2	7,0	206,7	57,5	112,5	31,4
344 kHz						
H (kA/m) (*)	NPs@Citrate de 5 nm		NPs@Citrate de 10 nm		NPs@Citrate de 15 nm	
	Aire (mJ/kg) (**)	SAR (W/g) (**)	Aire (mJ/kg) (**)	SAR (W/g) (**)	Aire (mJ/kg) (**)	SAR (W/g) (**)
4	1,4	0,5	13,2	4,5	8,8	3,0
8	6,0	2,0	56,4	19,2	38,1	13,0
12	30,9	10,5	95,8	32,7	69,0	23,5
16	49,7	16,9	152,2	51,9	106,3	36,2

(\*) L'amplitude maximale du champ a été limitée à 16 kA/m pour respecter l'inégalité de sécurité.

(\*\*) Les valeurs sont exprimées par rapport à la masse de fer dans les colloïdes étudiés.

Tableau 4.21: Valeurs des SAR des solutions colloïdales dans l'eau des NPs@Cit de 5, 10 et 15 nm de diamètre ([Fe] = 0.25 g/L) mesurées à partir des aires de leurs cycles AC, pour différentes amplitudes maximales du champ  $H_{app}$  et différentes fréquences, exprimées par g de fer.

Une lecture attentive des résultats obtenus suggère que les nanoparticules citratées de 10 nm restent un peu plus performantes que celles de 15 nm, pourtant plus aimantées. Cette observation pourrait être corrélée à la proximité de la valeur de 15 nm du diamètre critique au-dessus duquel le mécanisme de Brown prédomine (Figure 4.3).

En fait, il a été déjà plusieurs fois rapporté [77][78], qu'il existe un diamètre critique du cœur magnétique des nanoparticules d'oxyde de fer, autour de 12-15 nm. Au-dessus de cette taille optimale, l'efficacité de chauffage commence à diminuer avec l'augmentation du diamètre hydrodynamique, de la viscosité et de la polydispersité des nanoparticules. En fait au-dessus de cette taille, le mécanisme de dissipation de chaleur par relaxation de Brown devient prédominant comme proposé par Fortin et col. [24]. Pour ce qui nous concerne, nous sommes typiquement proche de ce diamètre critique, peut-être juste un peu en dessous pour les NPs@Cit de 10 nm et juste un peu au-dessus pour les NPs@Cit de 15 nm.

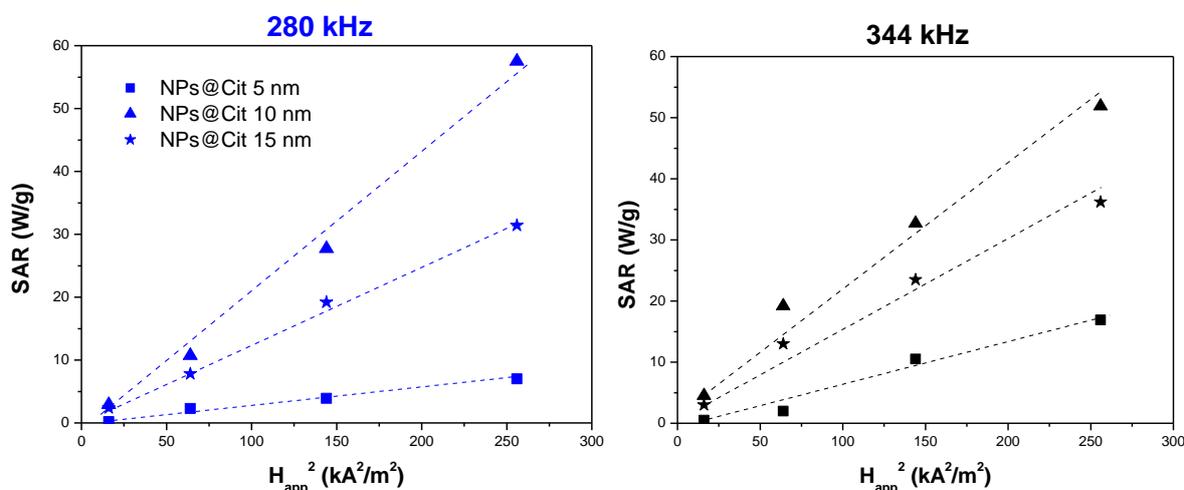


Figure 4.105: Variation du SAR tel que mesuré à partir de l'aire des cycles AC de solutions colloïdales dans l'eau des NPs@Cit de 5, 10 et 15 nm de diamètre ([Fe] = 0.25 g/L) en fonction du carré de l'amplitude de champ pour des fréquences de mesure de 280 et 344 KHz

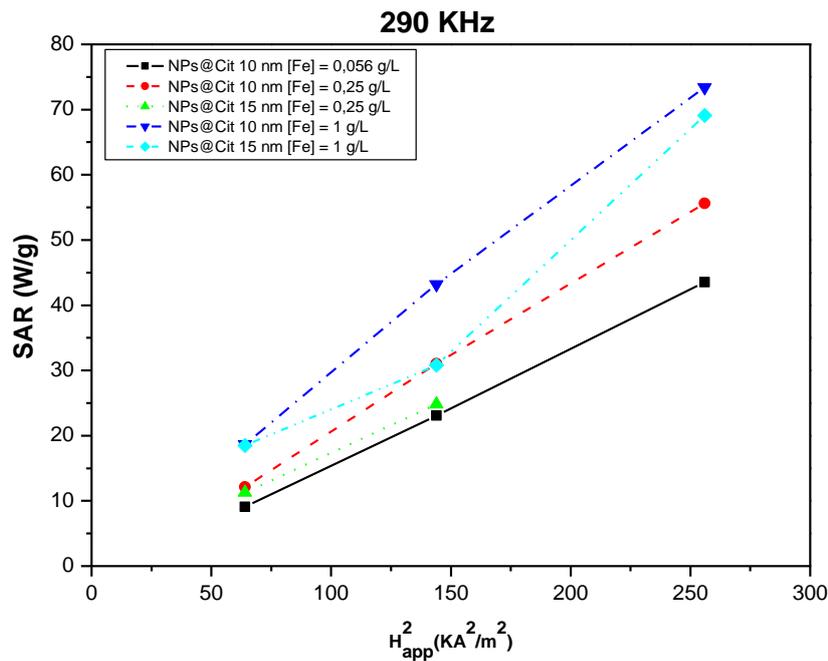


Figure 4.106: Variation du SAR tel que mesuré par calorimétrie sur des solutions colloïdales dans l'eau de NPs@Cit de 10 et 15 nm de diamètre en fonction du carré de l'amplitude de champ appliqué pour une fréquence égale à 290 KHz. Les concentrations massiques en fer sont indiquées pour chaque lot de mesure (0,056 g/L, 0,250 g/L et 1g/L).

Nous avons décidé de recalculer les valeurs de SAR pour les deux séries de nanoparticules, NPs@Cit de 10 nm et de 15 nm, en employant la méthode calorimétrique à une fréquence de 290 kHz pour les différentes amplitudes de champ analysées. Ensuite, nous avons comparé ces valeurs avec celles obtenues par des mesures en courant alternatif (AC) à une fréquence de 280 kHz (Tableau 4.6), en veillant à ce que les concentrations en nanoparticules soient similaires. À cet effet, nous avons utilisé des concentrations approchantes : environ 0,20 g/L de fer pour la calorimétrie et approximativement 0,25 g/L de fer pour les mesures AC. De plus, pour assurer une évaluation précise de ces concentrations, nous avons employé la spectroscopie de fluorescence X.

H (kA/m) (*)	NPs@Citrates de 10 nm		NPs@Citrates de 15 nm	
	SAR <sub>Calorimétrie-290 kHz</sub> (W/g)	SAR <sub>AC-280 kHz</sub> (W/g)	SAR <sub>Calorimétrie-290 kHz</sub> (W/g)	SAR <sub>AC-280 kHz</sub> (W/g)
8	12.1	10,7	11.2	7,8
12	31.0	27,7	24.8	19,2
16	55.5	57,5	-	31,4

Tableau 4.22: Variations des valeurs de SAR pour les colloïdes de NPs@Cit de 10 et 15 nm dans l'eau, mesurées par calorimétrie à une fréquence de 290 kHz et comparées aux mesures AC à 280 kHz. La concentration en fer est de 0,25 g/L pour les mesures calorimétriques et de 0,20 g/L pour les mesures AC.

Les valeurs obtenues par les deux méthodes restent du même ordre. Nous ne pouvons rien dire de plus que cette double affirmation, les NPs@Cit de 10 nm sont sans doute à peine plus petite que la taille optimale pour la meilleure efficacité en hyperthermie magnétique, alors que les NPs@Cit de 15 nm sont certainement déjà trop grandes par rapport à cette taille optimale.

Pour appuyer cette conclusion, nous avons comparé les données de la littérature sur des nanoparticules d'oxyde de fer, de taille à peu près équivalente à la taille des deux lots de nanoparticules qui nous intéressent ici, à savoir les NPs@Cit de 10 et 15 nm (le lot de particules à 5 nm de diamètre est exclu de cette comparaison du fait des faibles valeurs de SAR mesurées pour lui). Nous avons aussi calculé à partir des valeurs de SAR les valeurs de ILP, pour rendre la comparaison plus facile. Le tableau ci-après regroupe les résultats obtenus et ceux compilés depuis les résultats de la littérature (Tableau 4.7). La tendance semble respectée, pour des nanoparticules d'oxyde de fer de type maghémite ou presque (notées  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  dans le tableau ci-après). Elle ne l'est pas si la comparaison se porte sur les nanoparticules de magnétites  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  et cela peut se comprendre. Les propriétés magnétiques intrinsèques de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  sont quelque peu différentes (aimantation à saturation plus élevée, constante d'anisotropie magnétocristalline plus élevée aussi).

Il est à noter aussi que dans notre tableau nous n'avons pas tenu compte de l'état de surface des nanoparticules notamment celles autour de 15 nm de diamètre pour lesquelles le diamètre hydrodynamique devient un paramètre important, du fait que le mécanisme de Brown y est le mécanisme de relaxation prépondérant.

L'enrobage des nanoparticules par des macromolécules de plus ou moins grande masse moléculaire, n'auront pas les mêmes frictions avec leur fluide porteurs et caloporteur (l'eau ici) que celles fonctionnalisées par des petites molécules, et donc pas la même dissipation de chaleur par le mécanisme de Brown, celui dépendant de la viscosité du fluide certes mais surtout du volume hydrodynamique des particules.

type d'oxyde de fer	Taille des particules (nm)	Méthode de synthèse	$H_{appl}$ (kA/m)	$f$ (kHz)	Méthode de mesure du SAR	SAR (W/g <sub>Fe</sub> )	ILP (nH.m <sup>2</sup> /kg <sub>Fe</sub> )	Réf.		
$\gamma$ -Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	10	Procédé polyol	8	280	Perte	10,7	0,597	ce travail		
				344	d'hystérésis AC	19,2	0,872			
				290	calorimétrie	12,14	0,654			
			12	280	Perte	27,7	0,687			
				344	d'hystérésis AC	32,7	0,872			
				290	calorimétrie	31,02	0,654			
	16	280	Perte	57,5	0,802					
		344	d'hystérésis AC	51,9	0,589					
		290	calorimétrie	55,59	0,749					
		$\gamma$ -Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	15	Procédé polyol	8	280	Perte	7,8	0,435	ce travail
						344	d'hystérésis AC	13,0	0,590	
						290	calorimétrie	11,27	0,607	
12	280				Perte	19,2	0,476			
	344				d'hystérésis AC	23,5	0,474			
	290				calorimétrie	24,8	0,594			
16	280		Perte	31,4	0,438					
	344		d'hystérésis AC	36,2	0,411					
	290		calorimétrie	-	-					
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> / $\gamma$ -Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	10.3		Bio-synthèse (magnetoferritine)	49	485.7	calorimétrie	805,3	0,690	[82]	
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> / $\gamma$ -Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	10		Méthode polyol modifiée	17.1	386.5	calorimétrie	69,6	0,613	[83]	

	10.0±2	Méthode polyol modifiée	10.2	755	calorimétrie	72	0,917	[52]
	11.7±4.7	Méthode polyol modifiée	10.2	755	calorimétrie	189	2,406	[52]
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	15	Co-précipitation	13.5	332.8	calorimétrie	261	4,300	[78]
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	15 ± 8	Co-précipitation	12	273	calorimétrie	68	1,730	[84]
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	14.5	Méthode polyol modifiée	10	755	calorimétrie	134	1,775	[85]

Tableau 4.23: Valeurs des SAR et ILP de solutions colloïdales dans l'eau de nanoparticules d'oxyde de fer à peu près sphérique de diamètre moyen avoisinant les 10 et 15 nm telles qu'obtenues dans cette étude et dans la littérature.

### 2.2.1.3. Conclusion

En conclusion, l'efficacité en hyperthermie magnétique des nanoparticules citratées, mesurée par calorimétrie ou par perte d'hystérésis AC et quantifiée à travers les valeurs de SAR obtenues (et converties pour comparaison en ILP), dépend de la fréquence, de l'amplitude du champ magnétique appliqué, de la concentration en nanoparticules et surtout de leur taille. Compte tenu des conditions expérimentales à notre disposition, des fréquences  $f$  de l'ordre de 280-290 kHz et 340-350 kHz pour des amplitudes de champ  $H_{app}$  ne dépassant pas les 16 kA/m ont été choisies pour respecter la condition de sécurité ( $H_{app} \times f < 5 \cdot 10^9 \text{ A}\cdot\text{m}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ ). Une concentration optimale en nanoparticules de 0,25 g<sub>Fe</sub>/L nous a permis d'obtenir des résultats satisfaisants et enfin, les particules de 10 nm nous sont apparues plus efficaces que celles à 15 nm, car plus proches en taille du diamètre optimal pour l'hyperthermie magnétique, dans un modèle de relaxation essentiellement de type Néel.

### 2.2.2. Cas des nanoparticules citratées assemblées sur le virus RYMV

Nous avons continué notre étude en nous intéressant cette fois-ci aux résultats des mesures AC obtenus sur les assemblages de nanoparticules citratées sur le virus RYMV, en maintenant la concentration en fer à 0,25 g/L comme pour l'étude précédente.

Les cycles enregistrés pour une fréquence de 280 kHz pour les trois types d'assemblages sont présentés (Figure 4.24). En comparant l'aire des cycles de ces assemblages à celle des nanoparticules libres, on constate un accroissement significatif. Par conséquent, cela indique une augmentation des valeurs de SAR.

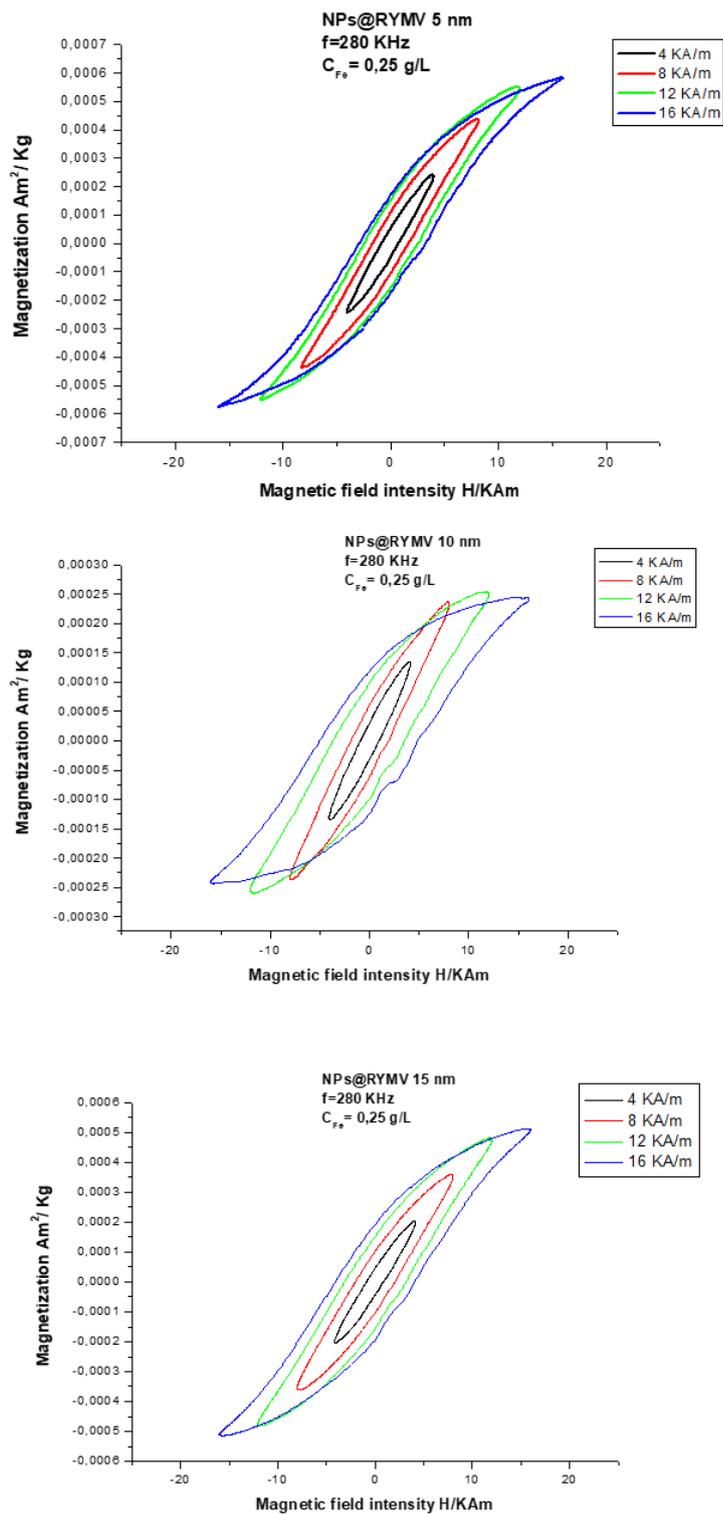


Figure 4.107: Cycles d'hystérésis AC enregistrés sur les colloïdes des NPs@Cit de 5, 10 et 15 nm assemblées sur le virus RYMV pour différentes amplitudes de champ  $H_{app}$  et une fréquence constante de 280 kHz ( $[Fe] = 0,25$  g/L).

Les valeurs obtenues sont regroupées dans la figure 4.25 et comparées. On voit bien que comparées aux nanoparticules libres, quel que soit la taille de celles-ci, leur assemblage conduit à un gain significatif en terme de SAR. Ensuite, en comparant ces assemblages en fonction de la taille des nanoparticules qui les constituent on retrouve bien une augmentation du SAR quand on passe de 5 à 10 nm de diamètre, par contre on n'observe aucune variation significative quand on passe de 10 à 15 nm de diamètre.

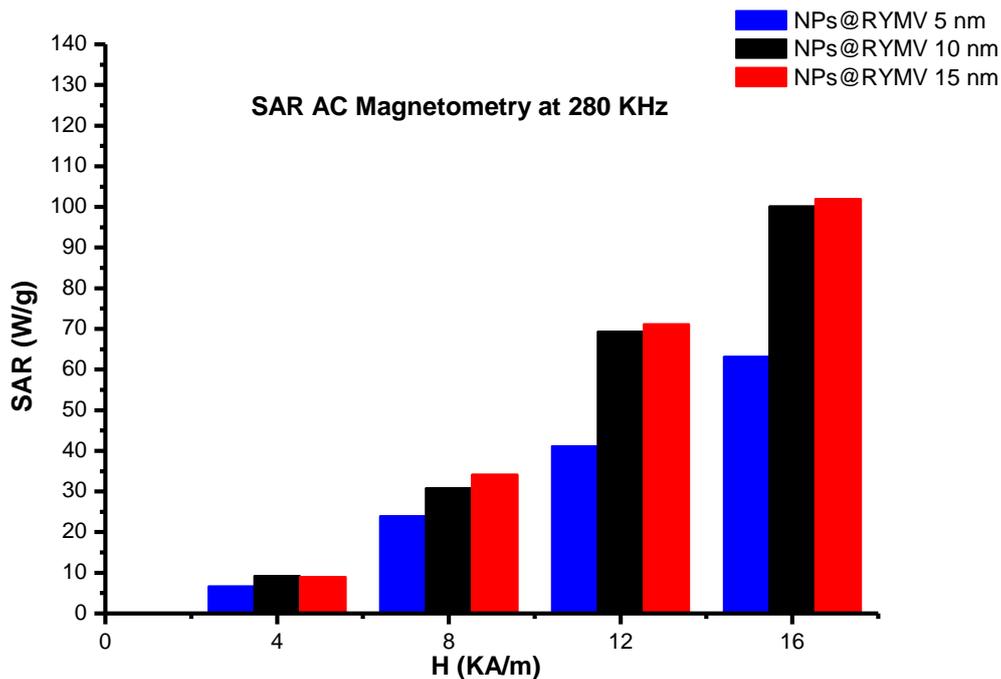


Figure 4.108: Histogramme des valeurs de SAR mesurées sur les solutions colloïdales des assemblages sur le virus RYMV des nanoparticules citratées d'oxyde de fer de 5, 10 et 15 nm de diamètre, telles que mesurées à différentes amplitudes de champ pour une fréquence fixe de 280 kHz ( $[Fe] = 0,25$  g/L).

Nous avons aussi pu mesurer par calorimétrie, sur l'exemple des assemblages de nanoparticules citratées de 10 nm de diamètre à 290 kHz et des valeurs assez similaires du SAR ont pu être obtenues comme résumé ci-après pour des concentrations massiques en fer assez similaires à celle utilisée par les mesures précédentes, 0,20 g/L versus 0,25 g/L (Figure 4.26). On retrouve la même exaltation de l'élévation de température et du SAR dans les assemblages. Les valeurs du SAR déduites de la pente à l'origine de ces courbes sur ces assemblages sont du même ordre de grandeur que celles déduites des aires des cycles d'hysteresis présentés ci-avant. On trouve ici des valeurs de SAR de 22,4, 61,6 et 90,8 W/g<sub>Fe</sub> pour une amplitude de champ de 8, 12 et 16 kA/m et une fréquence de 290 KHz à comparer aux valeurs 28,9, 64,3 et 110,0 W/g<sub>Fe</sub> pour les mêmes amplitudes de champ et une fréquence de 280 kHz données dans le tableau 4.9.

Nous n'avons pas relevé la dépendance en champ du SAR. Cette dépendance est toujours une dépendance parabolique, comme constaté préalablement sur les nanoparticules citartées libres.

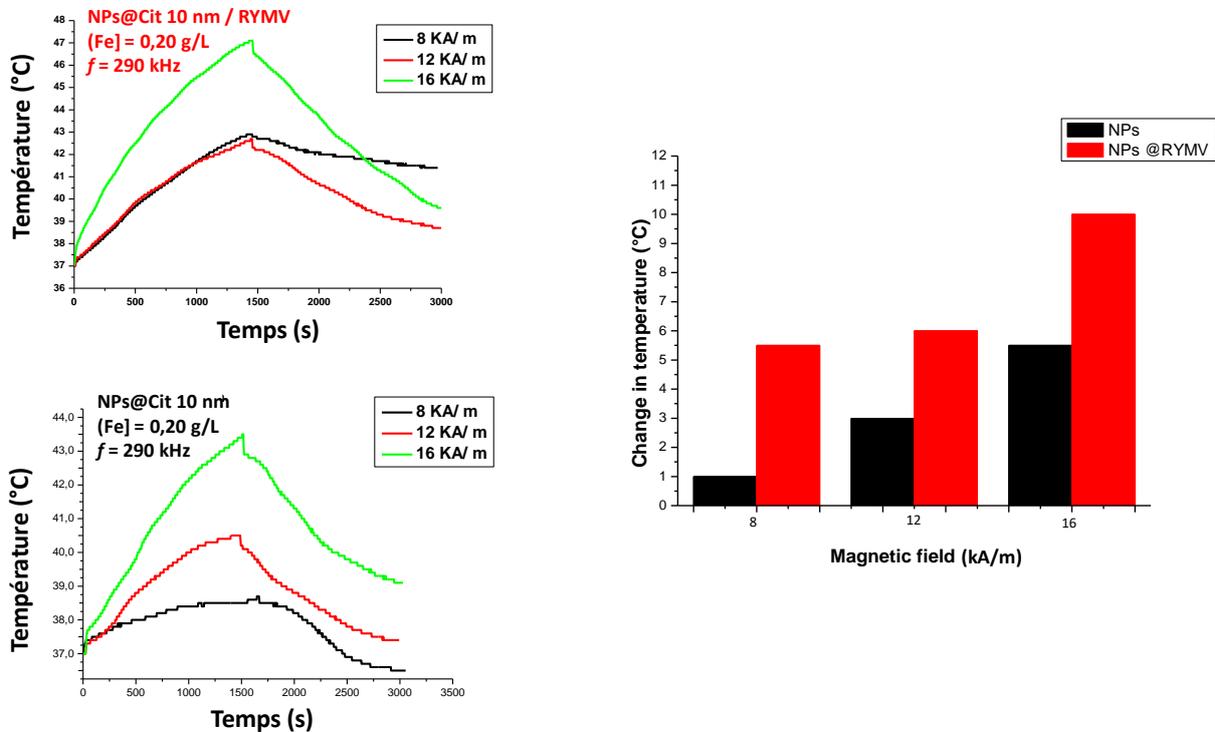


Figure 4.109: Suivi de l'élévation de température en fonction du temps lors de mesures calorimétriques sur colloïdes de nanoparticules d'oxyde de fer citratées de 10 nm de diamètre, libres ou assemblées sur le virus RYMV, sous l'effet d'un champ magnétique alternatif de différentes amplitudes (de 8 à 16 kA/m) et à fréquence égale, 290 kHz, pour une concentration massique en fer fixe de 0,20 g/L. Les élévations de température sont données sous la forme d'histogramme pour chaque valeur de champ et chaque système.

Nous nous sommes par la suite intéressés à l'effet de la concentration en fer et à l'effet de la fréquence sur les capacités de chauffage des assemblages, et ce toujours pour les trois tailles de nanoparticules. Cette étude a été exclusivement menée sur des mesures par perte d'hystérésis AC.

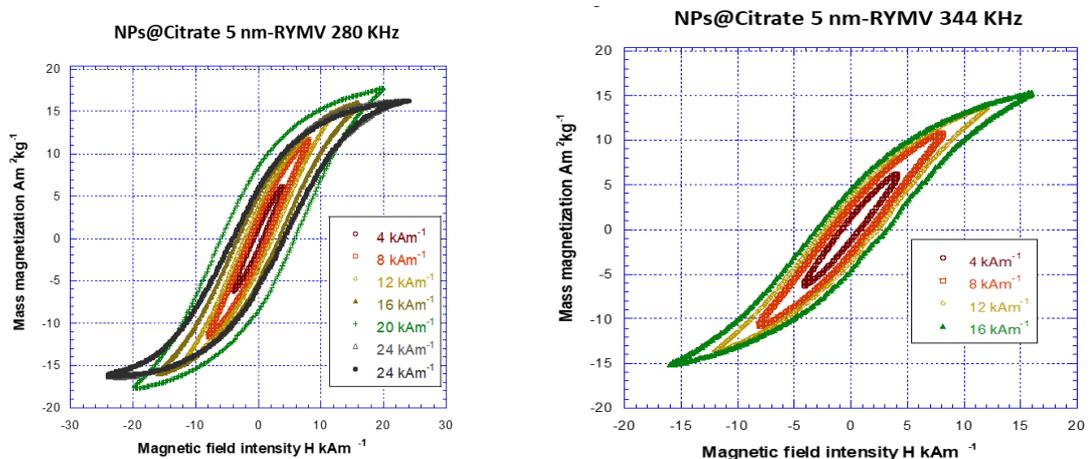
Nous avons donc mesuré les cycles d'hystérésis pour des amplitudes de champ maximales de 8, 12 et 16 kA/m à une concentration plus élevée en fer (Tableau 4.8), pour les deux fréquences de travail possibles, 280 kHz et 344 kHz. Malheureusement, faute de temps, nous n'avons pas pu préparer les trois colloïdes (5, 10 et 15 nm) avec la même concentration. Il est important de noter que la concentration en fer a été mesurée par spectroscopie de fluorescence X. La figure ci-après présente les cycles enregistrés pour les trois tailles de nanoparticules (Figure 4.27).

[Fe <sub>5nm</sub> ]	[Fe <sub>10nm</sub> ]	[Fe <sub>15nm</sub> ]
1,0 g/L	0,45 g/L	0,7 g/L

Tableau 4.24 : Valeurs des concentrations en fer des solutions colloïdales de nanoparticules d'oxyde de fer de différentes tailles et de leurs assemblages sur le virus RYMV, dans l'eau milli-Q.

Le tableau 4.9 présente les valeurs du Taux d'Absorption Spécifique (SAR) extraites des courbes correspondantes. Il ressort que l'augmentation du SAR est remarquable, indépendamment de l'intensité du champ appliqué, de sa fréquence ou de la dimension des nanoparticules. Nous avons plafonné l'intensité du champ à 16 kA/m afin de rester dans les limites de sécurité. De plus, les valeurs de SAR sont rapportées à la masse de fer contenue dans les colloïdes analysés.

La première conclusion qui s'impose à la lecture de ces données, est celle de dépendance du SAR à l'amplitude du champ appliqué en  $H^2$ , et ce pour les tous les assemblages de nanoparticules, quelle que soit leur taille et quelle que soit la fréquence de travail entre 280 et 344 kHz (Figure 4.27 et 4.28)



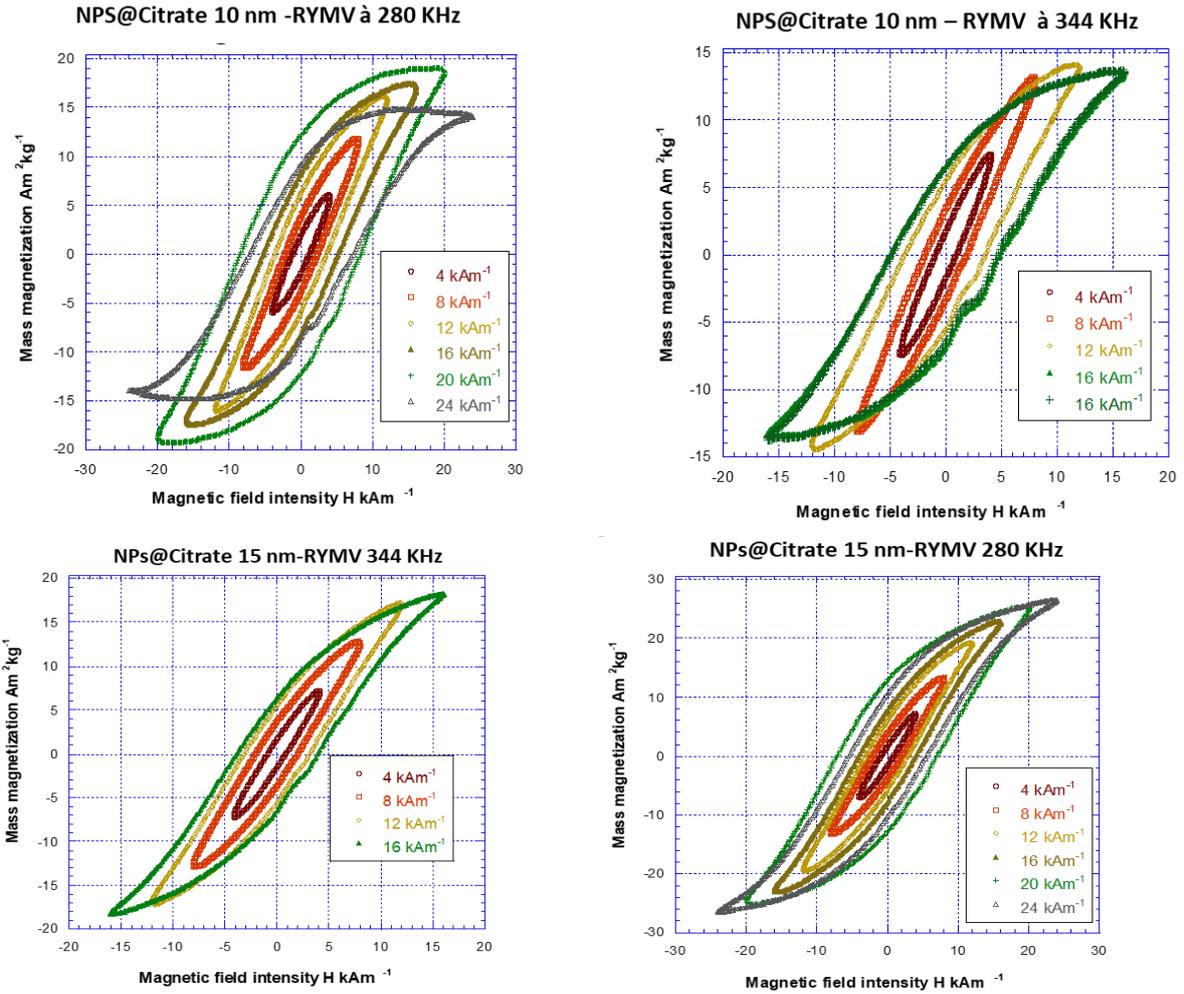
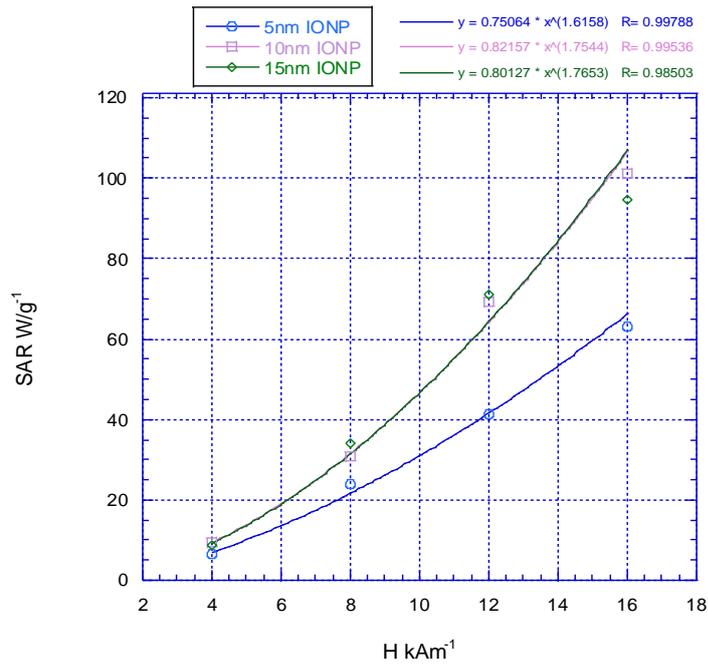


Figure 4.110: Cycles d'hystérésis AC enregistrés sur les colloïdes des NPs@Cit de 5, 10 et 15 nm assemblées sur le virus RYMV dans l'eau pour différentes amplitudes de champ  $H_{app}$  et différentes fréquences, 280 et 344 kHz avec  $[Fe_{5nm}] = 1 \text{ g/L}$ ,  $[Fe_{10nm}] = 0,45 \text{ g/L}$  et  $[Fe_{15nm}] = 0,7 \text{ g/L}$ .

### RYMV@IONP5/10/15nm (new batches) SAR at 344kHz



### RYMV@IONP5/10/15nm (new batches) SAR at 280kHz

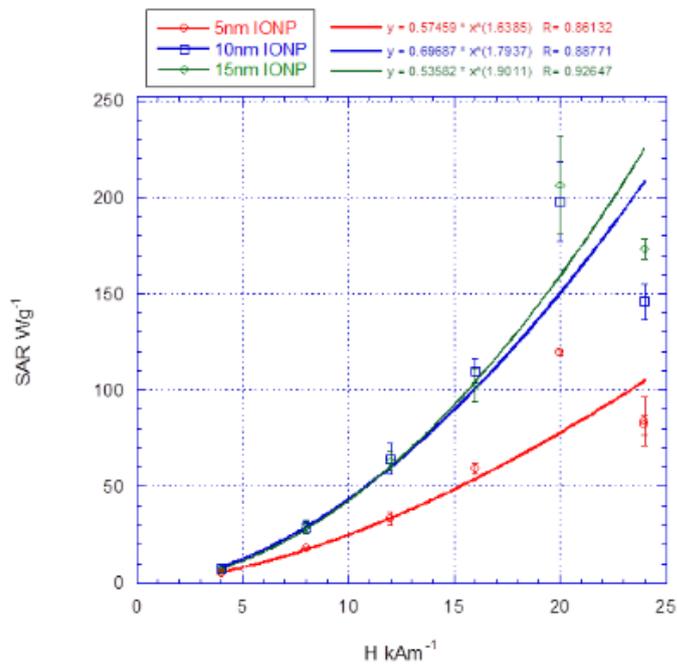


Figure 4.28: Variation du SAR tel que mesuré à partir de l'aire des cycles AC de solutions colloïdales dans l'eau des NPs@Cit de 5, 10 et 15 nm de diamètre assemblées sur le virus RYMV (avec  $[Fe_{5nm}] = 1$  g/L,  $[Fe_{10nm}] = 0,45$  g/L et  $[Fe_{15nm}] = 0,7$  g/L. L) en fonction de l'amplitude de champ appliqué H pour des fréquences de mesure de 280 et 344 KHz. Les traits en continue correspondent à un affinement en  $H^2$ .

La deuxième conclusion est l'exaltation des valeurs du SAR sur les assemblages comme illustré dans la figure 4.29. Ceci est à souligner. Nous retrouvons des comportements pour ces assemblages, dignes des nanofleurs d'oxyde de fer décrits dans la littérature comme de vrais pseudo-monocristaux.

La troisième conclusion concerne l'effet de la fréquence de travail. On voit que les valeurs de SAR mesurées restent à peu près égales quand on change la valeur de la fréquence de 280 à 344 kHz, signifiant que nous devons déjà être à ces fréquences, somme toutes proches, dans un optimum de fréquence.

280 kHz						
H kA/m	NPs@Cit 5 nm / RYMV (*)		NPs@Cit 10 nm / RYMV (**)		NPs@Cit 15 nm / RYMV (***)	
	Aire mJ/kg	SAR W/g	Aire mJ/kg	SAR W/g	Aire mJ/kg	SAR W/g
4	18,30	5,10	28,0	7,8	25,10	7,00
8	65,10	18,10	103,7	28,9	104,60	29,10
12	120,0	33,40	230,9	64,3	226,50	63,10
16	213,20	59,30	394,8	110,0	368,70	102,70
344 kHz						
H kA/m	NPs@Cit 5 nm / RYMV (*)		NPs@Cit 10 nm / RYMV (**)		NPs@Cit 15 nm / RYMV (***)	
	Aire mJ/kg	SAR W/g	Aire mJ/kg	SAR W/g	Aire mJ/kg	SAR W/g
4	19,6	6,7	27,2	9,3	25,5	8,7
8	70,6	24,0	90,5	30,9	100,4	34,2
12	121,4	41,2	203,8	69,4	208,9	71,2
16	185,6	63,2	297,1	101,2	278,2	94,8

(\*)  $[Fe_{5nm}] = 1 \text{ g/L}$

(\*\*)  $[Fe_{10nm}] = 0,45 \text{ g/L}$

(\*\*\*)  $[Fe_{15nm}] = 0,7 \text{ g/L}$

Tableau 4.25: Valeurs des SAR des solutions colloïdales dans l'eau des NPs@Cit de 5, 10 et 15 nm de diamètre après leur assemblage sur le virus RYMV, mesurées à partir des aires de leurs cycles AC, pour différentes amplitudes maximales du champ  $H_{app}$  et une fréquence fixe de 280 kHz, exprimées par gramme de fer.

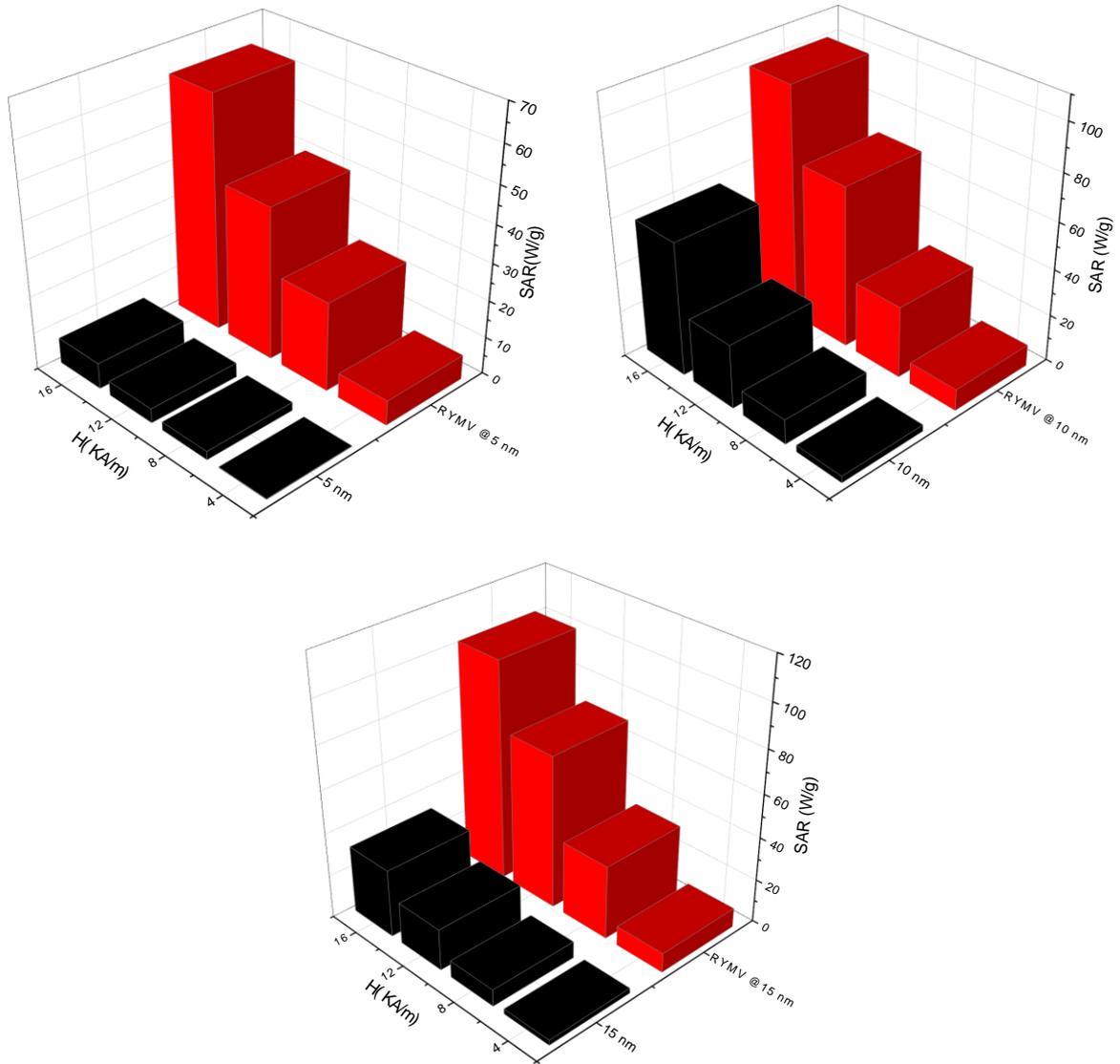


Figure 4.29-a: Histogramme des valeurs de SAR mesurées sur les solutions colloïdales des assemblages sur le virus RYMV des nanoparticules citratées d'oxyde de fer de 5, 10 et 15 nm de diamètre, telles que mesurées à différentes amplitudes de champ pour une fréquence fixe de 280 kHz ( $[Fe_{5nm}] = 1$  g/L,  $[Fe_{10nm}] = 0,45$  g/L et  $[Fe_{15nm}] = 0,7$  g/L.).

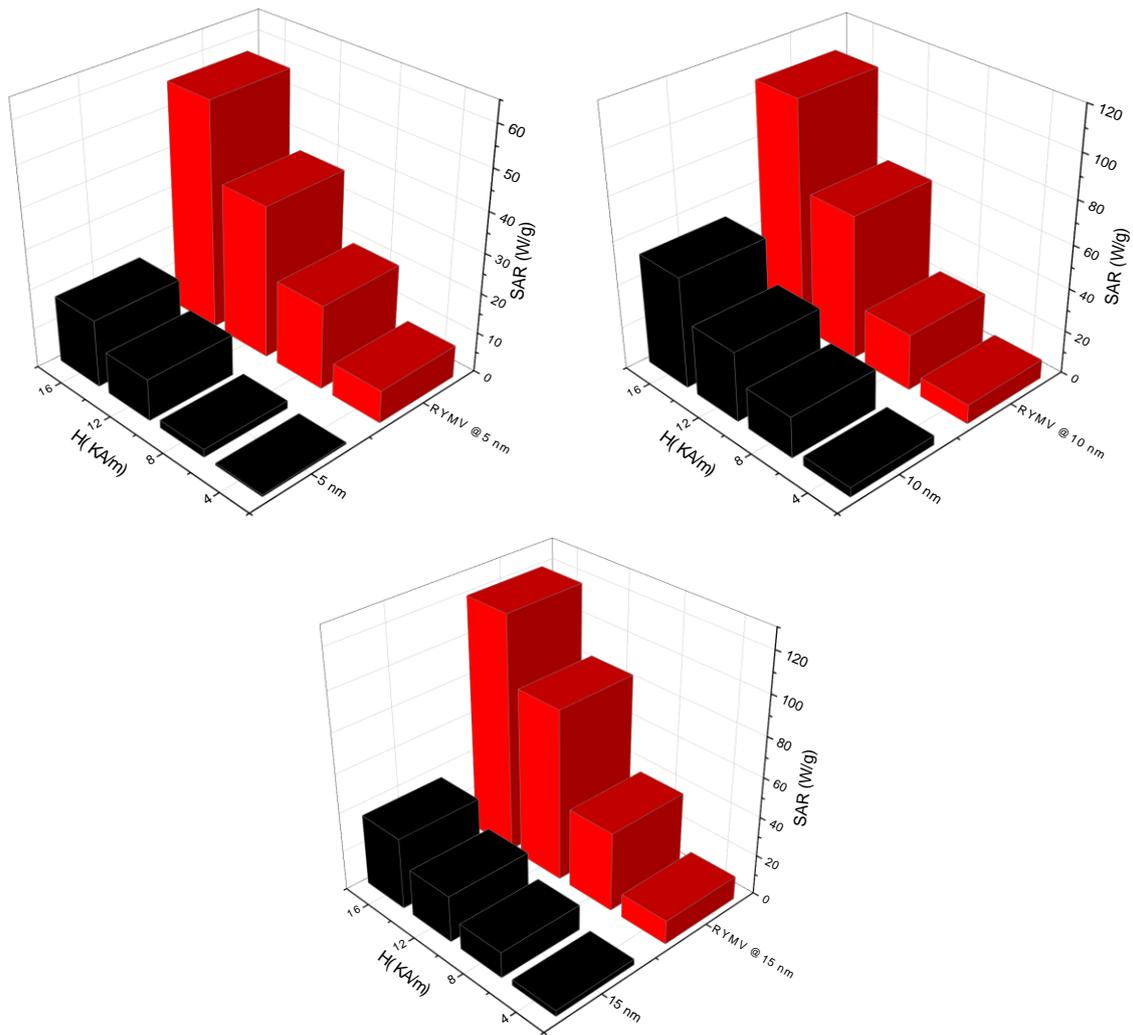


Figure 4.111-b: Histogramme des valeurs de SAR mesurées sur les solutions colloïdales des assemblages sur le virus RYMV des nanoparticules citratées d'oxyde de fer de 5, 10 et 15 nm de diamètre, telles que mesurées à différentes amplitudes de champ pour une fréquence fixe de 344 kHz ( $[Fe_{5nm}] = 1 \text{ g/L}$ ,  $[Fe_{10nm}] = 0,45 \text{ g/L}$  et  $[Fe_{15nm}] = 0,7 \text{ g/L}$ ).

Bien que la comparaison complète des différentes tailles de nanoparticules soit complexe en raison des variations de concentration en fer, les tendances observées demeurent cohérentes.

Dans le but d'examiner l'évolution des propriétés magnétiques avant et après assemblage, nous avons analysé notre système composé de nanoparticules NPs@Cit de 10 nm greffées à la surface de virus. Un échantillon témoin de NPs@Cit de 10 nm à la concentration identique de 0,45 g/L a également été évalué. Pour cet assemblage et les NPs@Cit libres, les valeurs d'ILP ont été calculées en utilisant l'Eq. 6 et comparées à différentes fréquences de 280 et 344 kHz ainsi qu'à diverses amplitudes de champ, allant de 4 à 16 kA/m (Tableau 4.10, Figure 4.29), en veillant à ne pas dépasser les 16 kA/m afin de respecter les normes de sécurité.

H (kA/m)	ILP <sub>280kHz</sub> (nH.m <sup>2</sup> /kg <sub>Fe</sub> )		ILP <sub>344kHz</sub> (nH.m <sup>2</sup> /kg <sub>Fe</sub> )	
	NPs@Cit 10 nm	NPs@Cit 10 nm / RYMV	NPs@Cit10 nm	NPs@Cit 10 nm / RYMV
4	0,647	1,740	0,818	1,690
8	0,597	1,610	0,872	1,400
12	0,687	1,590	0,660	1,400
16	0,802	1,530	0,589	1,150

Tableau 4.26: Comparaison de l'inductance de perte magnétique des NPs@Citrate de 10 nm avant et après greffage sur RYMV aux fréquences de 280 kHz et 344 kHz avec une concentration de fer de 0.45 g/L.

Lorsqu'on compare les valeurs de l'ILP des particules citratées libres et greffées, une augmentation spectaculaire est observée et ce quelque soit la valeur de l'amplitude du champ ou de sa fréquence. Comparées aux valeurs de la littérature, les valeurs obtenues sur les particules greffées sont plus proches de celles des mesurées sur les nanofleurs d'oxyde de fer, assumées être des pseudo-monocristaux que sur les nanoparticules libres. Ainsi des valeurs de l'ILP de l'ordre de 1,7 nH.m<sup>2</sup>/kg<sub>Fe</sub> sont obtenues contre des valeurs de l'ordre de 0,6 nH.m<sup>2</sup>/kg<sub>Fe</sub>. Et à titre d'exemple, en se basant sur les valeurs données par Hemery et col. (Tableau 4.3), pour des nanofleurs d'oxyde de fer de différents diamètres (29 à 32 nm par exemple), proches du diamètre de nos agrégats (environ 45 nm) des valeurs de 2,6 à 3,0 nH.m<sup>2</sup>/kg<sub>Fe</sub> sont reportées, supérieures à celles de nos agrégats mais du même ordre de grandeur. Cette proximité des valeurs de l'ILP sont à souligner. Nos agrégats ont été obtenus par simple greffage à température ambiante sur un virus de plante choisi. Le greffage induit leur orientation cristallographique les rendant capables, dans cette configuration, de dissiper presque autant de chaleur que des pseudo-monocristaux préparées à chaud par nucléation et croissance contrôlées en milieu polyol.

### 3. Conclusion

Dans ce chapitre, les propriétés magnétiques et magnétocalorimétriques des nanoparticules d'oxyde de fer citratées (NPs@Citate) et de leurs assemblages sur le virus RYMV ont été explorées. Les mesures de magnétométrie dc et ac ont montré que les nanoparticules libres ou assemblées présentent toutes un comportement superparamagnétique, avec un volume magnétique effectif qui croît avec la taille des nanoparticules, mais aussi pour une taille de cristallite donnée, qui croît avec l'assemblage. Cette différence traduit un assemblage ordonné des nanocristaux sur le virus choisi, formant à la limite, une sorte de pseudo-monocristaux, ou se comportant comme tel... Ces pseudo-monocristaux bio-inspirés seraient des analogues artificiels des nanofleurs d'oxyde de fer décrits dans la littérature par R. Bazzi et col. D'abord [86] et puis par toutes les équipes pratiquant la synthèse polyol, comme les équipes de Olivier Sandre à Bordeaux en France ou Maria del Puerto Morales à Madrid en Espagne, pour ne citer que celles-ci.

Le greffage des nanoparticules d'oxyde de fer sur le virus RYMV représente une avancée majeure, offrant des améliorations notables dans leurs performances en hyperthermie magnétique.

Si, nous avons montré que les nanoparticules citratées de 10 nm de diamètre présentent les meilleures performances en hyperthermie magnétique dans leur état libre, ces performances sont décuplées quand ces mêmes nanoparticules sont greffées sur le virus RYMV. Des valeurs de l'ILP de l'ordre de 1,6 nH.m<sup>2</sup>/kg<sub>Fe</sub> ont été mesurées sur leurs assemblages sur le virus RYMV contre des valeurs de l'ordre de 0.6 nH.m<sup>2</sup>/kg<sub>Fe</sub> avant leur greffage.

En somme, ces résultats démontrent l'avantage distinct des nanoparticules d'oxyde de fer citratées assemblées par le biais du virus RYMV, offrant des perspectives prometteuses pour l'optimisation des traitements par hyperthermie magnétique.

## 4. Références

- [1] R. Hergt *et al.*, “Physical Limits of Hyperthermia Using Magnetite Fine Particles,” vol. 34, no. 5, pp. 3745–3754, 1998.
- [2] M. Kawashita, M. Tanaka, T. Kokubo, and Y. Inoue, “Preparation of ferrimagnetic magnetite microspheres for in situ hyperthermic treatment of cancer,” vol. 26, pp. 2231–2238, 2005, doi: 10.1016/j.biomaterials.2004.07.014.
- [3] M. Andr, “Uniform and water stable magnetite nanoparticles with diameters around the monodomain – multidomain limit,” vol. 134003, 2008, doi: 10.1088/0022-3727/41/13/134003.
- [4] A. Jordan *et al.*, “Inductive heating of ferrimagnetic particles and magnetic fluids : Physical evaluation of their potential for hyperthermia,” vol. 6736, 2009, doi: 10.3109/02656730903287790.
- [5] B. Fadeel and S. Orrenius, “Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in human disease,” *J. Intern. Med.*, vol. 258, no. 6, pp. 479–517, 2005, doi: 10.1111/j.1365-2796.2005.01570.x.
- [6] S. Dutz and R. Hergt, “Magnetic particle hyperthermia - A promising tumour therapy?,” *Nanotechnology*, vol. 25, no. 45, 2014, doi: 10.1088/0957-4484/25/45/452001.
- [7] C. S. S. R. Kumar and F. Mohammad, “Magnetic nanomaterials for hyperthermia-based therapy and controlled drug delivery,” *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 63, no. 9, pp. 789–808, 2011, doi: 10.1016/j.addr.2011.03.008.
- [8] B. Kozissnik, A. C. Bohorquez, J. Dobson, and C. Rinaldi, “Magnetic fluid hyperthermia: Advances, challenges, and opportunity,” *Int. J. Hyperth.*, vol. 29, no. 8, pp. 706–714, 2013, doi: 10.3109/02656736.2013.837200.
- [9] S. A. Sapareto and W. C. Dewey, “Thermal dose determination in cancer therapy,” *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, vol. 10, no. 6, pp. 787–800, 1984, doi: 10.1016/0360-3016(84)90379-1.
- [10] M. Johannsen *et al.*, “Morbidity and quality of life during thermotherapy using magnetic nanoparticles in locally recurrent prostate cancer: Results of a prospective phase I trial,” *Int. J. Hyperth.*, vol. 23, no. 3, pp. 315–323, 2007, doi:

10.1080/02656730601175479.

- [11] I. Hilger, R. Hiergeist, and R. Hergt, “Thermal Ablation of Tumors Using Magnetic Nanoparticles An In Vivo Feasibility Study,” vol. 37, no. 10, pp. 580–586, 2002.
- [12] M. Johannsen *et al.*, “Thermotherapy of Prostate Cancer Using Magnetic Nanoparticles: Feasibility, Imaging, and Three-Dimensional Temperature Distribution,” vol. 52, pp. 1653–1662, 2007, doi: 10.1016/j.eururo.2006.11.023.
- [13] M. W. Dewhirst, B. L. Viglianti, M. Hanson, P. J. Hoopes, B. L. Viglianti, and M. Hanson, “Basic principles of thermal dosimetry and thermal thresholds for tissue damage from hyperthermia,” vol. 6736, 2009, doi: 10.1080/0265673031000119006.
- [14] J. Mendéz and M. Torres-lugo, “Hyperthermic potentiation of cisplatin by magnetic nanoparticle heaters is correlated with an increase in cell membrane fluidity,” pp. 1003–1013, 2013.
- [15] H. Wang, X. Li, X. Xi, B. Hu, L. Zhao, and Y. Liao, “Effects of magnetic induction hyperthermia and radiotherapy alone or combined on a murine 4T1 metastatic breast cancer model,” vol. 6736, 2011, doi: 10.3109/02656736.2011.583618.
- [16] J. Kost, “Magnetically enhanced insulin release in diabetic rats,” vol. 21, pp. 1367–1373, 1987.
- [17] Z. Lu, M. D. Prouty, Z. Guo, V. O. Golub, C. S. S. R. Kumar, and Y. M. Lvov, “Magnetic Switch of Permeability for Polyelectrolyte Microcapsules Embedded with Co @ Au Nanoparticles,” no. 4, pp. 2042–2050, 2005.
- [18] L. Néel, T. Fascicule, and M. L. Neel, “Théorie du traînage magnétique des ferromagnétiques en grains fins avec application aux terres cuites,” 2020.
- [19] A. C. McConnell, “No Title,” no. August, 2012.
- [20] H. This, “No Title,” vol. 34, no. 1951, 1963.
- [21] R. E. Rosensweig, “ROLE OF INTERNAL ROTATIONS IN SELECTED MAGNETIC FLUID APPLICATIONS,” vol. 36, no. 4, pp. 241–253, 2001.
- [22] R. E. Rosensweig, “Heating magnetic fluid with alternating magnetic field,” vol. 252, pp. 370–374, 2002.
- [23] M. I. Shliomis, “Magnetic fluids,” 1974.

- [24] J. Fortin *et al.*, “Size-Sorted Anionic Iron Oxide Nanomagnets as Colloidal Mediators for Magnetic Hyperthermia,” no. 14, pp. 2628–2635, 2007.
- [25] R. Tietze *et al.*, “Biochemical and Biophysical Research Communications Magnetic nanoparticle-based drug delivery for cancer therapy,” *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 468, no. 3, pp. 463–470, 2015, doi: 10.1016/j.bbrc.2015.08.022.
- [26] P. Hugounenq *et al.*, “Cooperative Organization in Iron Oxide Multi-Core Nanoparticles Potentiates Their Efficiency as Heating Mediators and MRI Contrast Agents,” no. Xx, 2012.
- [27] S. Dutz and R. Hergt, “Magnetic particle hyperthermia — a promising tumour therapy?,” vol. 452001, doi: 10.1088/0957-4484/25/45/452001.
- [28] C. Chapa *et al.*, “Surface modified superparamagnetic nanoparticles : Interaction with fibroblasts in primary cell culture,” pp. 1–5, 2014.
- [29] C. Sun *et al.*, “full papers In Vivo MRI Detection of Gliomas by Chlorotoxin-Conjugated Superparamagnetic Nanoprobes,” vol. 98109, no. 3, pp. 372–379, 2008, doi: 10.1002/sml.200700784.
- [30] R. Hergt, W. Andr, C. G. Ambly, and I. Hilger, “Physical Limits of Hyperthermia Using Magnetite Fine Particles,” no. August, 2015, doi: 10.1109/20.718537.
- [31] A. Manuscript, “NIH Public Access,” vol. 2, no. 8, pp. 1001–1014, 2012.
- [32] W. Wu, Z. Wu, T. Yu, and C. Jiang, “Recent progress on magnetic iron oxide nanoparticles : synthesis , surface functional strategies and biomedical applications,” *Sci. Technol. Adv. Mater.*, vol. 16, no. 2, p. 23501, 2015, doi: 10.1088/1468-6996/16/2/023501.
- [33] J. Gavard *et al.*, “Evaluation of iron oxide nanoparticle biocompatibility,” *Int. J. Nanomedicine*, p. 787, 2011, doi: 10.2147/ijn.s17574.
- [34] J. Xie, S. Lee, and X. Chen, “Nanoparticle-based theranostic agents ☆,” *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 62, no. 11, pp. 1064–1079, 2010, doi: 10.1016/j.addr.2010.07.009.
- [35] A. Lu, E. L. Salabas, and F. Schüth, “Magnetic Nanoparticles : Synthesis , Protection , Functionalization , and Application Angewandte,” pp. 1222–1244, 2007, doi: 10.1002/anie.200602866.

- [36] J. E. Leet *et al.*, “Additions and corrections,” *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1*, vol. 110, no. 4, p. 1565, 1985, doi: 10.1039/P19850001565.
- [37] A. Skumiel, “Suitability of water based magnetic fluid with CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> particles in hyperthermia,” *J. Magn. Magn. Mater.*, vol. 307, no. 1, pp. 85–90, 2006, doi: 10.1016/j.jmmm.2006.03.045.
- [38] D. H. Kim, D. E. Nikles, D. T. Johnson, and C. S. Brazel, “Heat generation of aqueously dispersed CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles as heating agents for magnetically activated drug delivery and hyperthermia,” *J. Magn. Magn. Mater.*, vol. 320, no. 19, pp. 2390–2396, 2008, doi: 10.1016/j.jmmm.2008.05.023.
- [39] and D. S. Yang Qu, Jianbo Li, Jie Ren, Junzhao Leng, Chao Lin, “Enhanced Magnetic Fluid Hyperthermia by Micellar Magnetic,” *Appl. Mater. Interfaces*, vol. 6, no. 6 (19), pp. 16867–16879, 2014.
- [40] T. L. Phan *et al.*, “Magnetic and Magnetocaloric Properties of Zn<sub>1-x</sub>Co<sub>x</sub>Fe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> Nanoparticles,” *J. Electron. Mater.*, vol. 46, no. 7, pp. 4214–4226, 2017, doi: 10.1007/s11664-017-5359-2.
- [41] B. Behdadfar, A. Kermanpur, H. Sadeghi-Aliabadi, M. D. P. Morales, and M. Mozaffari, “Synthesis of aqueous ferrofluids of Zn<sub>x</sub>Fe<sub>3-x</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles by citric acid assisted hydrothermal-reduction route for magnetic hyperthermia applications,” *J. Magn. Magn. Mater.*, vol. 324, no. 14, pp. 2211–2217, 2012, doi: 10.1016/j.jmmm.2012.02.034.
- [42] T. I. Yang and S. H. Chang, “Controlled synthesis of metallic iron nanoparticles and their magnetic hyperthermia performance in polyaniline composite nanofibers,” *Nanotechnology*, vol. 28, no. 5, 2017, doi: 10.1088/1361-6528/28/5/055601.
- [43] Z. Nemati, J. Alonso, H. Khurshid, M. H. Phan, and H. Srikanth, “Core/shell iron/iron oxide nanoparticles: Are they promising for magnetic hyperthermia?,” *RSC Adv.*, vol. 6, no. 45, pp. 38697–38702, 2016, doi: 10.1039/c6ra05064f.
- [44] F. Fabris *et al.*, “Controlling the dominant magnetic relaxation mechanisms for magnetic hyperthermia in bimagnetic core-shell nanoparticles,” *Nanoscale*, vol. 11, no. 7, pp. 3164–3172, 2019, doi: 10.1039/c8nr07834c.
- [45] M. S. Dar *et al.*, “Heat induction in two-dimensional graphene-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>nanohybrids for

- magnetic hyperthermia applications with artificial neural network modeling,” *RSC Adv.*, vol. 11, no. 35, pp. 21702–21715, 2021, doi: 10.1039/d1ra03428f.
- [46] C. J. Hansen, P. Tartaj, P. Morales, S. Veintemillas-verdaguer, and T. Gonz, “The preparation of magnetic nanoparticles for applications in biomedicine,” 2012.
- [47] S. Laurent, S. Dutz, U. O. Häfeli, and M. Mahmoudi, “Magnetic fluid hyperthermia : Focus on superparamagnetic iron oxide nanoparticles,” *Adv. Colloid Interface Sci.*, vol. 166, no. 1–2, pp. 8–23, 2011, doi: 10.1016/j.cis.2011.04.003.
- [48] M. Kallumadil, M. Tada, T. Nakagawa, M. Abe, P. Southern, and Q. A. Pankhurst, “Journal of Magnetism and Magnetic Materials Suitability of commercial colloids for magnetic hyperthermia,” vol. 321, pp. 1509–1513, 2009, doi: 10.1016/j.jmmm.2009.02.075.
- [49] A. Manuscript, “NIH Public Access,” vol. 20, no. 39, 2014, doi: 10.1088/0957-4484/20/39/395103.Nearly.
- [50] J. Carrey, B. Mehdaoui, M. Respaud, J. Carrey, B. Mehdaoui, and M. Respaud, “Simple models for dynamic hysteresis loop calculations of magnetic single-domain nanoparticles : Application to magnetic hyperthermia optimization To cite this version : HAL Id : hal-01952248,” 2019, doi: 10.1063/1.3551582.
- [51] A. K. Gupta and V. D. Vaidya, “Recent advances on surface engineering of magnetic iron oxide nanoparticles and their biomedical applications,” vol. 2, no. Ii, pp. 23–39, 2007.
- [52] G. Hemery *et al.*, “Tuning Sizes, Morphologies, and Magnetic Properties of Monocore Versus Multicore Iron Oxide Nanoparticles through the Controlled Addition of Water in the Polyol Synthesis,” 2017, doi: 10.1021/acs.inorgchem.7b00956.
- [53] L. Zhu, Z. Zhou, H. Mao, and L. Yang, “Magnetic nanoparticles for precision oncology : theranostic magnetic iron oxide nanoparticles for image-guided and targeted cancer therapy,” 2017.
- [54] R. Hergt, S. Dutz, and M. Robert, “Magnetic particle hyperthermia : nanoparticle magnetism and materials development for cancer therapy Magnetic particle hyperthermia : nanoparticle therapy,” 2006, doi: 10.1088/0953-8984/18/38/S26.
- [55] I. M. Obaidat, V. Narayanaswamy, S. Alaabed, S. Sambasivam, and C. V. V. Muralee

- Gopi, “Principles of magnetic hyperthermia: A focus on using multifunctional hybrid magnetic nanoparticles,” *Magnetochemistry*, vol. 5, no. 4, 2019, doi: 10.3390/magnetochemistry5040067.
- [56] R. Di *et al.*, “Biomaterials Magnetic hyperthermia efficiency in the cellular environment for different nanoparticle designs,” vol. 35, pp. 6400–6411, 2014, doi: 10.1016/j.biomaterials.2014.04.036.
- [57] X. Batlle, “Finite-size effects in fine particles :,” 2002.
- [58] T. Gaudisson *et al.*, “Experimental and theoretical evidence for oriented aggregate crystal growth of CoO in a polyol,” *CrystEngComm*, vol. 23, no. 8, pp. 1756–1764, 2021, doi: 10.1039/d0ce01525c.
- [59] C. Haase and U. Nowak, “Role of dipole-dipole interactions for hyperthermia heating of magnetic nanoparticle ensembles,” *Phys. Rev. B - Condens. Matter Mater. Phys.*, vol. 85, no. 4, pp. 2–6, 2012, doi: 10.1103/PhysRevB.85.045435.
- [60] G. T. Landi, “Role of dipolar interaction in magnetic hyperthermia,” *Phys. Rev. B - Condens. Matter Mater. Phys.*, vol. 89, no. 1, pp. 1–6, 2014, doi: 10.1103/PhysRevB.89.014403.
- [61] B. Mehdaoui *et al.*, “Increase of magnetic hyperthermia efficiency due to dipolar interactions in low-anisotropy magnetic nanoparticles: Theoretical and experimental results,” *Phys. Rev. B - Condens. Matter Mater. Phys.*, vol. 87, no. 17, pp. 1–10, 2013, doi: 10.1103/PhysRevB.87.174419.
- [62] C. Martinez-Boubeta *et al.*, “Adjustable hyperthermia response of self-assembled ferromagnetic Fe-MgO core-shell nanoparticles by tuning dipole-dipole interactions,” *Adv. Funct. Mater.*, vol. 22, no. 17, pp. 3737–3744, 2012, doi: 10.1002/adfm.201200307.
- [63] P. Southern *et al.*, “Field and frequency dependence of the SAR / ILP value in magnetic hyperthermia using magnetic multi- and single core particles,” no. July, 2015.
- [64] G. Hemery *et al.*, “Tuning Sizes, Morphologies, and Magnetic Properties of Monocore Versus Multicore Iron Oxide Nanoparticles through the Controlled Addition of Water in the Polyol Synthesis,” *Inorg. Chem.*, vol. 56, no. 14, pp. 8232–8243, 2017, doi: 10.1021/acs.inorgchem.7b00956.

- [65] T. Review, “Applications of magnetic nanoparticles in biomedicine,” 2003.
- [66] P. Guardia *et al.*, “Water-Soluble Iron Oxide Nanocubes with High Values of Specific Absorption Rate for Cancer Cell Hyperthermia Treatment,” no. 4, pp. 3080–3091, 2012.
- [67] R. Hergt, S. Dutz, R. Müller, and M. Zeisberger, “Magnetic particle hyperthermia: Nanoparticle magnetism and materials development for cancer therapy,” *J. Phys. Condens. Matter*, vol. 18, no. 38, 2006, doi: 10.1088/0953-8984/18/38/S26.
- [68] A. E. Deatsch and B. A. Evans, “Journal of Magnetism and Magnetic Materials Heating efficiency in magnetic nanoparticle hyperthermia,” vol. 354, pp. 163–172, 2014, doi: 10.1016/j.jmmm.2013.11.006.
- [69] R. Hergt and S. Dutz, “Magnetic particle hyperthermia-biophysical limitations of a visionary tumour therapy,” *J. Magn. Magn. Mater.*, vol. 311, no. 1 SPEC. ISS., pp. 187–192, 2007, doi: 10.1016/j.jmmm.2006.10.1156.
- [70] M. Johannsen *et al.*, “Magnetic nanoparticle hyperthermia for prostate cancer Magnetic nanoparticle hyperthermia for prostate cancer,” vol. 6736, 2010, doi: 10.3109/02656731003745740.
- [71] M. Beković and A. Hamler, “Determination of the heating effect of magnetic fluid in alternating magnetic field,” *IEEE Trans. Magn.*, vol. 46, no. 2, pp. 552–555, 2010, doi: 10.1109/TMAG.2009.2033944.
- [72] S. Ota, T. Yamada, and Y. Takemura, “Dipole-dipole interaction and its concentration dependence of magnetic fluid evaluated by alternating current hysteresis measurement,” *J. Appl. Phys.*, vol. 117, no. 17, 2015, doi: 10.1063/1.4914061.
- [73] E. C. Stoner and E. P. Wohlfarth, “A mechanism of magnetic hysteresis in heterogeneous alloys,” *Philos. Trans. R. Soc. London. Ser. A, Math. Phys. Sci.*, vol. 240, no. 826, pp. 599–642, 1948, doi: 10.1098/rsta.1948.0007.
- [74] D. Peddis *et al.*, “Spin-canting and magnetic anisotropy in ultrasmall CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles,” *J. Phys. Chem. B*, vol. 112, no. 29, pp. 8507–8513, 2008, doi: 10.1021/jp8016634.
- [75] J. A. De Toro *et al.*, “A nanoparticle replica of the spin-glass state,” *Appl. Phys. Lett.*, vol. 102, no. 18, 2013, doi: 10.1063/1.4804187.

- [76] S. Bedanta and W. Kleemann, “Supermagnetism,” *J. Phys. D. Appl. Phys.*, vol. 42, no. 1, 2009, doi: 10.1088/0022-3727/42/1/013001.
- [77] P. De La Presa *et al.*, “Study of heating efficiency as a function of concentration, size, and applied field in  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanoparticles,” *J. Phys. Chem. C*, vol. 116, no. 48, pp. 25602–25610, 2012, doi: 10.1021/jp310771p.
- [78] O. M. Lemine, S. Algessair, N. Madkhali, B. Al-Najar, and K. El-Boubbou, “Assessing the Heat Generation and Self-Heating Mechanism of Superparamagnetic Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> Nanoparticles for Magnetic Hyperthermia Application: The Effects of Concentration, Frequency, and Magnetic Field,” *Nanomaterials*, vol. 13, no. 3, 2023, doi: 10.3390/nano13030453.
- [79] J. Carrey, B. Mehdaoui, and M. Respaud, “Simple models for dynamic hysteresis loop calculations of magnetic single-domain nanoparticles: Application to magnetic hyperthermia optimization Simple models for dynamic hysteresis loop calculations of magnetic single-domain nanoparticles : Applicatio,” vol. 083921, no. 2011, 2012, doi: 10.1063/1.3551582.
- [80] R. B. Malaki, J. Carrey, and S. Lachaize, “Magnetic hyperthermia in single-domain monodisperse FeCo nanoparticles: Evidences for Stoner–Wohlfarth behavior and large losses,” vol. 023911, no. 2009, 2012, doi: 10.1063/1.3068195.
- [81] B. Mehdaoui *et al.*, “Optimal Size of Nanoparticles for Magnetic Hyperthermia: A Combined Theoretical and Experimental Study,” pp. 4573–4581, 2011, doi: 10.1002/adfm.201101243.
- [82] J. Yu, C. Cao, F. Fang, and Y. Pan, “Enhanced Magnetic Hyperthermia of Magnetoferritin through Synthesis at Elevated Temperature,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 23, no. 7, 2022, doi: 10.3390/ijms23074012.
- [83] A. Radoń *et al.*, “Influence of the modifiers in polyol method on magnetically induced hyperthermia and biocompatibility of ultrafine magnetite nanoparticles,” *Sci. Rep.*, vol. 13, no. 1, pp. 1–18, 2023, doi: 10.1038/s41598-023-34738-z.
- [84] Y. Jabalera *et al.*, “Nanoformulation design including MamC-mediated biomimetic nanoparticles allows the simultaneous application of targeted drug delivery and magnetic hyperthermia,” *Polymers (Basel)*, vol. 12, no. 8, 2020, doi: 10.3390/POLYM12081832.

- [85] G. Hemery *et al.*, “Monocore: Vs. multicore magnetic iron oxide nanoparticles: Uptake by glioblastoma cells and efficiency for magnetic hyperthermia,” *Mol. Syst. Des. Eng.*, vol. 2, no. 5, pp. 629–639, 2017, doi: 10.1039/c7me00061h.
- [86] P. Hugounenq *et al.*, “Iron oxide monocrystalline nanoflowers for highly efficient magnetic hyperthermia,” *J. Phys. Chem. C*, vol. 116, no. 29, pp. 15702–15712, 2012, doi: 10.1021/jp3025478.

---

# Conclusions

---

Dans cette thèse, j'ai réussi en utilisant la méthode polyol à synthétiser des nanoparticules de maghémite de tailles variées, spécifiquement de 5, 10 et 15 nm, connues pour leurs propriétés magnétiques intéressantes. Pour assurer leur stabilité à long terme, j'ai innové en enrobant ces nanoparticules avec du citrate, une approche qui a prouvé son efficacité.

Un aspect crucial de mon travail a été l'assemblage méticuleux de ces nanoparticules sur les surfaces de deux virus de plantes distincts, le TYMV (Turnip yellow mosaic virus) et le RYMV (Rice yellow mottle virus). Cette étape, inédite dans le domaine, a nécessité une approche détaillée pour garantir un greffage réussi et reproductible. Nous avons obtenu des nano-biomatériaux solubles et stables dans l'eau, utilisables dans des milieux biologiques. De plus ce greffage a été réalisé à température ambiante ouvrant la voie à la synthèse de pseudo-monocristaux dans des conditions expérimentales douces. Suite au succès de ce greffage, j'ai entrepris une analyse approfondie des propriétés des nouveaux nano-bio-hybrides ainsi formés.

Le greffage des nanoparticules d'oxyde de fer sur les virus TYMV et RYMV représente une avancée majeure, offrant des améliorations notables dans leurs performances respectivement en photothermie et hyperthermie magnétique par rapport aux nanoparticules citratées libres. Nous avons montré que ces matériaux sont notamment performant même à de faibles concentrations. Cette amélioration des propriétés offre ainsi des perspectives innovantes et potentiellement révolutionnaires pour l'utilisation de ces hybrides dans une variété de domaines, allant de la médecine à la technologie des matériaux.

---

# Partie Expérimentale

---

# 1. Produits

## 1.1. Produits chimiques

Nom	Masse Molaire (g/mol)	Formule Brute	Fournisseur
Acétate de fer (II)	173.93	C <sub>4</sub> H <sub>7</sub> FeO <sub>4</sub>	Sigma Aldrich
NHS (N-hydroxysuccinimide)	115.09	C <sub>4</sub> H <sub>5</sub> NO <sub>3</sub>	Sigma Aldrich
EDC (N-(3-diméthylaminopropyl)-N'-éthylcarbodiimide)	191.70	C <sub>8</sub> H <sub>17</sub> N <sub>3</sub>	Sigma Aldrich
EDTA (acide 2,2',2'',2'''-(éthane-1,2-diyl)dinitrilo) tétraacétique)	292.24	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> O <sub>8</sub>	Acros
MES (Acide 2-(N-morpholino)éthanesulfonique)	217.20	C <sub>6</sub> H <sub>13</sub> NNaO <sub>4</sub> S	Appllichem
Acide Borique	61.83	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	Sigma
Acide Citrique	294.1	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> O <sub>7</sub> Na <sub>3</sub>	Sigma
Tris (ou 2-amino-2-hydroxyméthyl-1,3-propanediol)	121.135	C <sub>4</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>3</sub>	
Agarose		Bio Reagent for Molecular Biology	Sigma
Low melting point Agarose		Bio Reagent for Molecular Biology	Thermoscientific
Agarase		Bio Reagent for Molecular Biology	Thermoscientific
Hydroxyde de sodium	40	HNO <sub>3</sub>	Sigma
Lauryl Sulfate: SDS Sodium dodecylsulfate	288.4	C <sub>12</sub> H <sub>25</sub> O <sub>4</sub> SNa	Sigma
Glycine	75.07	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> NO <sub>2</sub>	Sigma
Calcium Chloride	110.99	CaCl <sub>2</sub>	Prolabo
Potassium Phosphate monobasic	136.09	H <sub>2</sub> KO <sub>4</sub> P	Sigma
Potassium Phosphate dibasic	174.18	HK <sub>2</sub> O <sub>4</sub> P	Sigma
Glycerol	92.09	C <sub>3</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>	Sigma

Tableau 27.5: Liste des produits chimiques employés au cours de cette thèse

## 1.2. Solutions Tampons

Nom	Composition	pH
TBE 10X	[Tris base] = 890 mM ; [Acide borique] = 890 mM ; [EDTA] = 20 mM	8.0
TBE 1X	[Tris base] = 89 mM ; [Acide borique] = 89 mM ; [EDTA] = 2 mM	8.0
MES	[MES] = 0.5 M	7.0
Phosphate	[Phosphate] = 100 mM	7.0
Tris-SDS	[Tris base] = 57.8 mM ; [Glycine] = 2 M ; [SDS] = 34 mM	7.0
Chlorure de calcium	[CaCl <sub>2</sub> ] = 0.5 M	
Bis-Tris	[Bis-Tris] = 1 M	6.5
Acétate	[Acétate] = 10 mM	5.0

## 2. Préparation et caractérisation des virus de plantes

### 2.1. Extraction et préparation des virus de plantes

#### 2.1.1. TYMV

Le virus de la mosaïque jaune du navet (TYMV), en collaboration avec l'Institut Jacques Monod, a été cultivé et inoculé sur des plants de chou chinois. Les feuilles infectées ont été homogénéisées en utilisant un mélangeur dans 5 ml/g de Tris-HCl 10 mM pH 7,0. Le mélange a ensuite été centrifugé à 3,200 x g pendant 30 min à 4°C, et le surnageant a été récupéré et ajusté à pH 4,8 avec l'acide acétique. Suite à une incubation nocturne à 4°C, l'échantillon a été de nouveau centrifugé dans les mêmes conditions. Le nouveau surnageant a été récupéré puis centrifugé à 165,000 x g avec un rotor de type 70 Ti rotor pendant 3 heures à 4 °C. Le culot, contenant les particules virales a été ensuite remis en suspension dans du tampon phosphate de potassium 10 mM pH 7,4 et à nouveau centrifugé à 15,000 x g pendant 15 min à 4°C. Le surnageant a subi un autre cycle de centrifugation à grande vitesse / basse vitesse, a été filtré sur 0,22 µm et la concentration virale a été mesurée en utilisant un coefficient d'absorption de 8,6 L. g<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup> à 260 nm. Les particules virales ont été stockées pendant des mois à 4 °C [1].

#### 2.1.2. RYMV

En collaboration avec l'IRD (institut de recherche pour le développement) de Montpellier, les virus de la panachure jaune du riz de RYMV ont été purifiées à partir de jeunes feuilles de riz fraîches ou congelées, collectées 14 jours après l'inoculation. Par la suite, ces feuilles ont été broyées dans l'azote liquide et homogénéisées dans un tampon phosphate 0,1 M, pH 5,0. Une étape de purification additionnelle a été réalisée à travers un gradient de saccharose de 10 à 40 % par centrifugation à 3000 × g pendant 2 h. La concentration de la préparation virale a été évaluée en utilisant un coefficient d'absorption de 6,5 L. g<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup> à 260 nm. Les particules virales ont été stockées pendant des mois dans un tampon acétate 0,1 M pH 5,0 à 4 °C suite à l'extraction [2].

### 2.2. Dosage des protéines

#### 2.2.1. Dosage spectrophotométrique par spectrophotométrie d'absorption UV-visible

La spectrophotométrie d'absorption UV-Visible est une méthode analytique de nature physicochimique. Elle repose sur la mesure de la quantité de lumière à une certaine longueur d'onde, notée  $\lambda$ , lorsqu'elle traverse un milieu récepteur sur une distance mesurée, notée  $l$ . Cette approche est effectuée en présence d'une intensité incidente initiale, notée  $I_0$ , qui diminue suite à cette interaction et est exprimée par l'intensité  $I$ . L'absorbance de la solution est mathématiquement liée aux intensités  $I$  et  $I_0$  et suit la loi de Beer-Lambert (Éq. 1) :

$$A_{\lambda} = \log_{10}\left(\frac{I_0}{I}\right) = C \times l \times \varepsilon_{\lambda} \quad (\text{Éq. 1})$$

Avec  $A$ , l'absorbance de l'espèce absorbante  $C$ , la concentration de l'échantillon  $l$ , la longueur du trajet optique et  $\varepsilon$  le coefficient d'absorption molaire de cette espèce à la longueur d'onde  $\lambda$ .

TYMV et RYMV présentent une bande maximale d'absorbance à 260 nm, avec des coefficients d'absorption massique respectifs de 8,6 et 6,5 L.cm<sup>-1</sup>. mol<sup>-1</sup>. La concentration de virus a été calculée à partir des spectres d'absorption mesurés, en appliquant la loi de Beer-Lambert.

Les mesures d'absorption par spectrophotométrie ont été effectuées à une température de 25°C ± 0,5°C avec un spectrophotomètre UV-visible Varian Cary 4000, équipé d'un système de thermostat à effet Peltier.

Les échantillons ont été analysés dans des cuvettes en quartz avec un trajet optique de 1 cm.

### **2.2.2. Dosage colorimétrique par la méthode de Bradford**

L'albumine sérique humaine (HSA) est utilisée dans le cadre de la méthode de Bradford pour la quantification des protéines. Diverses solutions de HSA à des concentrations déterminées sont préparées. Par la suite, ces solutions sont mélangées avec le réactif de Bradford. Ce dernier se lie spécifiquement aux protéines, affichant une absorption maximale à une longueur d'onde de 595 nm. La lumière absorbée à cette longueur d'onde est proportionnelle à la concentration protéique, offrant ainsi un moyen précis d'évaluer la concentration de protéines dans un échantillon donné.

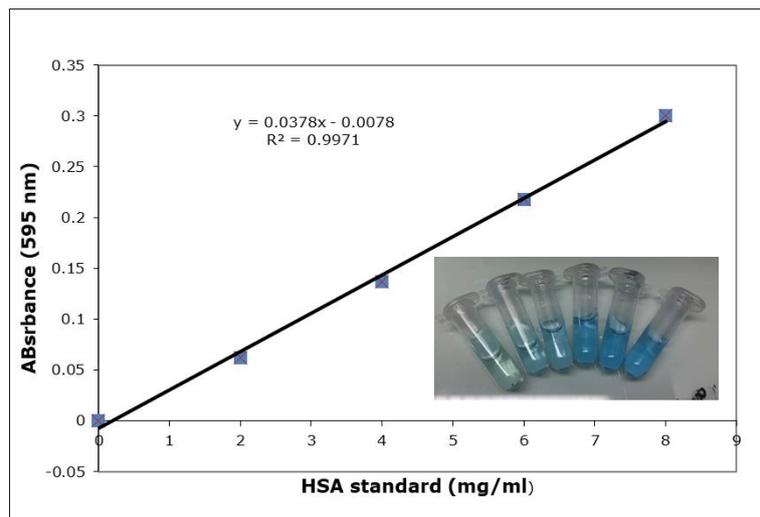


Figure 5.112 : Courbe d'étalonnage du test Bradford en fonction de la concentration de HSA pour le dosage des protéines.

Pour une expérience de référence, diverses concentrations connues d'albumine sérique humaine (HSA) ainsi qu'un échantillon dont la concentration en virus (TYMV et RYMV) est inconnue sont mélangés avec le réactif de Bradford. Cette combinaison est ensuite laissée à température ambiante pendant 5 minutes (Figure 1.5). L'absorbance est ensuite mesurée à une longueur d'onde de 595 nm. Afin de déterminer la concentration de protéines (exprimée en mg/ml), l'équation expérimentale qui a été trouvée  $y = 0,0378x - 0,0078$  est utilisée (Figure 5.1) où "y" est l'absorbance et "x" la concentration.

### 3. Synthèse, fonctionnalisation et caractérisation des nanoparticules d'oxyde de fer

#### 3.1. Synthèse des nanoparticules d'oxyde de fer de différentes tailles par voie polyol

##### 3.1.1. Synthèse des nanoparticules d'oxyde de fer de 5 nm

Dans un ballon bicol de 250 ml, 1,49 g d'acétate de fer (II), 7 ml d'eau distillée et 85 ml de diéthylène glycol sont combinés (étape 1(a), la Figure 5.2). Après avoir été agité pendant 10 minutes, le mélange est progressivement chauffé sous agitation jusqu'à atteindre 180°C à une vitesse de 6°C/min. Une fois la température d'ébullition atteinte, le mélange réactionnel est maintenu en agitation pendant 3 heures, avant d'être refroidi à température ambiante.

Pour récupérer les nanoparticules produites, un processus de lavage multi-cycles est employé pour oxyder la magnétite synthétisée et éliminer l'acétate de fer ainsi que les résidus de polyol. Ces lavages sont réalisés en effectuant des centrifugations de 30 minutes à 20000 tours

par minute, suivies de l'élimination du surnageant. Cinq cycles de lavage sont effectués en tout : trois avec de l'acétone, un avec de l'eau chaude, et le dernier avec de l'acétone (étape 2, Figure 5.2). Cette série de procédures aboutit à l'obtention d'une poudre brune. En raison de leur petite taille, les nanoparticules subissent une oxydation supplémentaire, soit dans une étuve à 50°C pendant quelques heures, soit à l'air ambiant pendant une nuit (étape 3, Figure 5.2).

### 3.1.2. Synthèse des nanoparticules d'oxyde de fer de 10 nm

Dans un ballon bicol de 250 ml, on combine 2.17 g d'acétate de fer (II), 1 ml d'eau et 125 ml de triéthylène glycol (étape 1(b), Figure 5.2). Le mélange est ensuite agité pendant une durée de 10 minutes. Puis, tout en maintenant une agitation mécanique à 500 rpm, la température est augmentée progressivement jusqu'à 230°C à une vitesse de 6°C/ min. Une fois la température désirée atteinte, on continue d'agiter le mélange pendant 2 heures supplémentaires. Le mélange est ensuite refroidi à température ambiante. Pour récupérer les nanoparticules, plusieurs cycles de centrifugation sont réalisés. On effectue deux centrifugations avec de l'acétone, puis deux autres avec de l'éthanol, une autre avec de l'eau chaude et finalement une dernière centrifugation avec de l'éthanol, chacune étant réalisée pendant 20 minutes à 15,000 tours par minute (étape 2, Figure 5.2). La poudre obtenue est ensuite séchée, soit en étant placée dans une étuve réglée à 50°C pour quelques heures, soit en étant laissée à l'air libre pendant une nuit, conformément à l'étape 3, Figure 5.2.

### 3.1.3. Synthèse des nanoparticules d'oxyde de fer de 15 nm

Dans un ballon bicol de 250 ml, on mélange 2,20 g d'acétate de fer (II), 200 µl d'eau distillée et 62 ml de tétraéthylène glycol (étape 1(c), Figure 5.2). Le mélange est ensuite agité pendant 10 minutes, puis chauffé sous agitation mécanique à 400 tours par minute, augmentant la température à 240°C à un rythme de 6°C /min. Après cela, le mélange est refroidi jusqu'à la température ambiante. La récupération des nanoparticules se fait à travers plusieurs cycles de centrifugation. Les deux premières sont effectuées avec l'acétone, suivies de deux autres avec l'éthanol, puis une dans l'eau chaude, et enfin une dernière avec l'éthanol. Chaque centrifugation est menée à 10,000 rpm pendant 15 minutes (étape 2, Figure 5.2). Pour terminer, les nanoparticules synthétisées sont oxydées. Ce processus est réalisé en plaçant les nanoparticules dans une étuve réglée à 50°C pendant quelques heures, ou en les laissant à l'air ambiant pendant une nuit (étape 3, Figure 5.2).

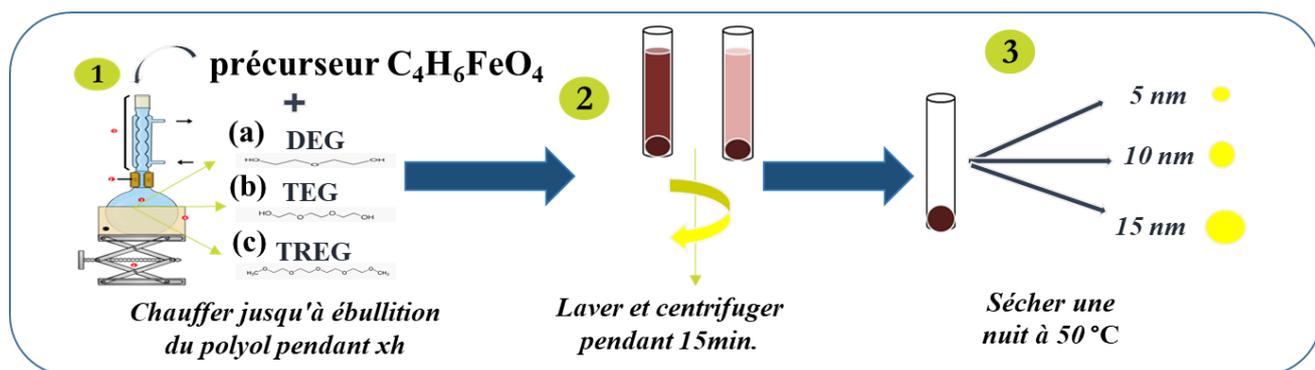


Figure 5.113 : Synthèse des nanoparticules d'oxyde de fer (maghémite) par voie polyol.

### 3.1.4. Tableau récapitulatif

Taille (nm)	5	10	15
m acétate (g)	1.49	2.17	2.20
m eau (g)	7	1	0.20
n acétate (mol)	0.01	0.01	0.01
n eau (mol)	0.38	0.05	0.01
h (n eau/n acétate)	38	5	1
Solvant	Diéthylène Glycol	Triéthylène Glycol	Tétraéthylène Glycol
V solvant (ml)	85	125	62
$T_{eb}$ polyol ( $^\circ C$ )	245	285	314
$T_{eb}$ atteint ( $^\circ C$ )	180	230	240

Tableau 5.29: Tableau récapitulatif des conditions expérimentales des synthèses de nanoparticules d'oxyde de fer de trois tailles différentes.

## 3.2. Stabilisation des nanoparticules synthétisés

### 3.2.1 Stabilisation des nanoparticules synthétisés par citrate (NPs@citrate)

Dans un ballon bicol de 250 ml, 500 mg de nanoparticules de maghémite, préalablement synthétisées par la voie du polyol, sont dispersés dans 25 ml d'eau à l'aide d'une sonication. Ensuite, 75 ml d'une solution d'acide citrique à 50 mM sont ajoutés à cette dispersion. Le mélange est alors agité pendant 10 minutes. Il est ensuite porté à ébullition et maintenu dans cet état pendant 30 minutes (étape 1, Figure 5.3). Après cela, le mélange est refroidi à la température ambiante. Pour la purification des nanoparticules, plusieurs cycles de lavage sont entrepris. Ils se déroulent par décantation magnétique, chaque cycle étant suivi d'une immersion dans l'éthanol (étape 2, Figure 5.3). Enfin, un processus de séchage est appliqué aux nanoparticules. Elles peuvent être séchées dans une étuve à  $50^\circ C$  ou laissées à l'air ambiant pendant une nuit (étape 3, Figure 5.3).

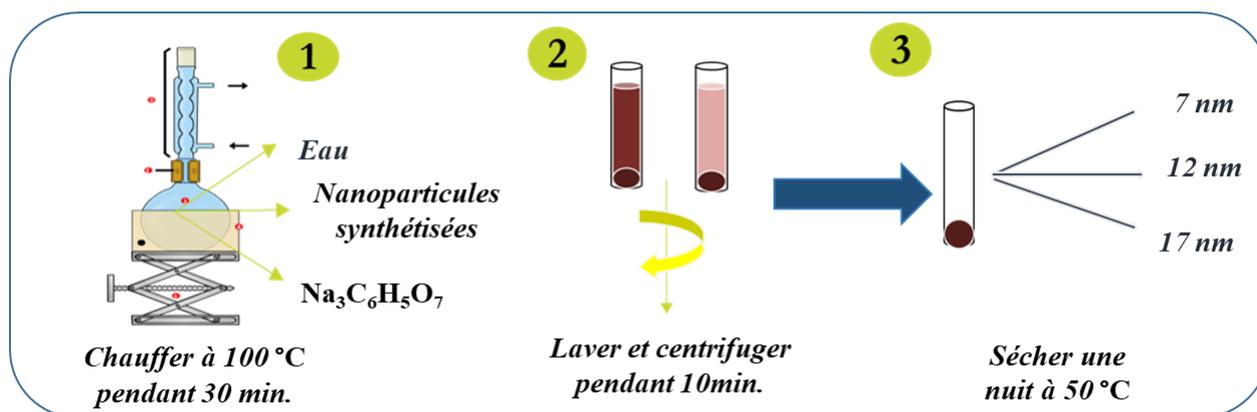


Figure 5.114 : Fonctionnalisation des nanoparticules d'oxyde de fer (maghémite) avec citrate par voie polyol.

### 3.2.2. Stabilisation des nanoparticules synthétisés par Dopamine (NPs@Dopa)

Dans un ballon bicol de 250 ml, 200 mg de nanoparticules de maghémite déjà synthétisées sont dispersés dans 100 ml d'eau distillée. Cette dispersion est ensuite soumise à un traitement par ultrasons pendant une durée de 20 minutes. Suite à cette étape, 2 g de dopamine sont ajoutés à la solution, qui est à nouveau exposée aux ultrasons, cette fois pendant une heure. Le mélange est ensuite gardé à l'obscurité pendant une nuit. Afin de purifier les nanoparticules, plusieurs cycles de lavages sont effectués en utilisant de l'acétone et en procédant à une décantation magnétique. Enfin, les nanoparticules sont déposées dans une étuve à 50 °C pour y être séchées.

### 3.2.3. Stabilisation des nanoparticules synthétisés par acide 3-aminopropylphosphonique (NPs@APPA)

Dans un ballon bicol de 100 ml, 300 mg de nanoparticules de maghémite synthétisées sont mises en suspension dans 75 ml d'eau distillée. Ensuite, 65 mg d'acide 3-aminopropylphosphonique (APPA) sont ajoutés au mélange, qui est ensuite agité mécaniquement à une température de 60°C pendant 12 heures. Afin de récupérer les nanoparticules fonctionnalisées, une décantation magnétique est employée. Cette étape est suivie de trois cycles de lavage avec de l'eau distillée. Finalement, les nanoparticules sont séchées dans une étuve réglée à une température de 50°C, et ce, pendant une nuit.

## 4. Greffage des nanoparticules synthétisés et fonctionnalisés sur la capsid de virus

### 4.1. Réaction de couplage EDC/NHS

#### 4.1.1. Greffage des NPs@Citrate sur TYMV

Deux stratégies distinctes sont développées pour greffer des NPs@Citrate sur la capsid virale. La première stratégie implique la formation d'une liaison covalente en utilisant la réaction d'amidation EDC / NHS activée. Le nombre de particules de TYMV est déduit de la masse moléculaire de la capsid (3,6 MDa), et celui de l'oxyde de fer est déduit des données obtenues par diffraction des rayons X et microscopie électronique à transmission. Chaque méthode initie l'activation de 2,2 mg d'oxyde de fer de 10 nm fonctionnalisé (NPs@Citrate) ( $\sim 8 \times 10^{14}$  particules/ml) en vue de les greffer avec 25  $\mu$ g de TYMV ( $\sim 4 \times 10^{12}$  particules de TYMV), assurant ainsi un excès de nanoparticules par rapport au virus. Dans la première stratégie, des liaisons peptidiques sont formées entre les nanoparticules de maghémite fonctionnalisées par groupe carboxyle et les groupes amines présents sur la capsid virale. À cet effet, l'EDC (N-(3-diméthylaminopropyl) -N'-éthylcarbodiimide) dissous dans l'eau distillée à une concentration finale de 1,5 mM, est intégré aux NPs@citrate, activant les groupes carboxyle sur les NPs@Citrate. Après une agitation de 30 minutes à température ambiante, du NHS à une concentration de 3,75 mM est incorporé. Après 45 min, les nanoparticules fonctionnalisés pré-activées sont mélangées avec la capsid du TYMV et laissées en réaction, sous agitation de 750 rpm à température ambiante, pendant 24h. La deuxième stratégie consiste à modifier la surface du virus en y greffant un groupe catéchol. La dopamine ( $\sim 6,9 \times 10^{-8}$  mol/ml) est greffée sur le TYMV préalablement activé, en utilisant la même procédure et concentration d'EDC/NHS que précédemment. Les NPs@Citrate sont ensuite ajoutés sur le virus modifié et laissées en incubation pendant 24 heures, permettant ainsi la création d'une liaison covalente et achevant le greffage des NPs@Citrate sur la capsid du TYMV. Quelle que soit la stratégie de greffage employée, les mélanges obtenus sont concentrés à 100  $\mu$ L à l'aide d'un concentrateur Vivaspin® 500 MWCO 10k, avec un volume maximal inséré de 500  $\mu$ L, dans le but d'éliminer l'excès de carbodiimide et de succinimide. Cette étape de lavage à l'eau et de centrifugation est effectuée trois fois, en utilisant une centrifugeuse à angle fixe, maintenue à 25 °C pendant 15 minutes à une vitesse de 10,000 rpm.

#### 4.1.2. Greffage des NPs@Citrate sur RYMV

La première stratégie a été mise en œuvre pour réaliser le greffage des NPs@Citrate sur la surface du RYMV. Cette réaction de greffage a été effectuée dans l'eau M-Q. Le nombre de particules de RYMV a été calculé en se basant sur la masse moléculaire de sa capsid (5,4 MDa). Dans ce cadre, 1,5 mg d'oxyde de fer de 10 nm fonctionnalisées avec du citrate ( $\sim 6 \times 10^{14}$  particules/ml), ont été préparés pour le greffage avec 25  $\mu\text{g}$  de RYMV ( $\sim 3 \times 10^{12}$  particules de RYMV). La quantité de NPs@Citrate employée était ajustée selon le ratio de greffage désiré, avec une concentration de RYMV fixée à 100  $\mu\text{g/ml}$  pour chaque réaction. Pour amorcer la réaction, de l'EDC (1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl) carbodiimide) à une concentration finale 1,5 de mM a été ajouté pour activer les NPs@Citrate. Après une agitation de 30 minutes à température ambiante, le NHS (N-Hydroxysuccinimide) a été ajouté à une concentration finale de 3,75 mM. Une fois 45 minutes écoulées, les NPs@Citrate préactivées ont été combinées avec la capsid du RYMV et laissées en réaction, à température ambiante et dans l'obscurité, pendant deux nuits. Pour éliminer l'excès de carbodiimide et de succinimide, une étape de centrifugation a été réalisée en utilisant des Vivaspin® 500 MWCO 10k, (avec un volume maximal inséré de 500  $\mu\text{L}$ ) ou plusieurs lavages par décantation magnétique ont été effectués. Enfin, le mélange a été dispersé et récupéré.

## 4.2. Caractérisation par électrophorèse

### 4.2.1. Electrophorèse sur gel d'agarose

L'électrophorèse est une technique biochimique qui sert à séparer, identifier, et purifier des particules selon leur taille et leur charge (Figure 5.4). Un gel d'agarose à des concentrations de 1% et 1,2 % (dissolution de 1 g et 1,2 g respectivement d'agarose dans 100 ml de tampon TBE 1x) sont préparés et chauffés au micro-ondes pendant 3 minutes jusqu'à la dissolution complète de l'agarose. La concentration de l'agarose dans le gel dépend de la taille des particules à séparer. Une fois refroidi, l'agarose fondu est coulée dans un moule avec un peigne inséré pour former des puits (étape 1, Figure 5.4). Ensuite, le plateau de gel est positionné dans une boîte d'électrophorèse (étape 2, Figure 5.4). Pour chaque échantillon, 10  $\mu\text{l}$  de TYMV et RYMV, ainsi que 25  $\mu\text{l}$  de NPs@Citrate greffés sur TYMV et RYMV, sont mélangés avec 2,5  $\mu\text{l}$  de tampon TBE 10x (89 mM Tris-base, 89 mM d'acide borique, 20 mM d'EDTA, pH 8,0) et 2,5  $\mu\text{L}$  de glycérol à 50 % dans l'eau (étape 3, Figure 5.4). Un colorant de chargement, le bleu de bromophénol (0,04 % de bleu de bromophénol, 5 % de glycérol dans

l'eau) est ajouté uniquement à l'échantillon du virus seul pour suivre la migration de l'échantillon dans le gel, surtout si l'échantillon est incolore. Les mélanges sont ensuite déposés dans les puits du gel (étape 4, Figure 5.4). Le même tampon utilisé pour la préparation du gel est ajouté dans la boîte d'électrophorèse pour couvrir la surface du gel (étape 5, Figure 5.4). Le couvercle est ensuite replacé sur la boîte d'électrophorèse en vérifiant que les électrodes sont correctement connectées aux fentes d'alimentation électrique (étape 6, Figure 5.4). Le gel est ensuite soumis à une tension définie de 100 V (correspondant à 5 V/cm) pour le greffage des NPs@Citrate-TYMV et NPs@Citrate-RYMV. Cette application de tension continue jusqu'à ce que le colorant de suivi bleu de bromophénol mélangé à l'échantillon de contrôle du virus atteigne environ les trois quarts de la longueur du gel (étape 7, Figure 5.4).

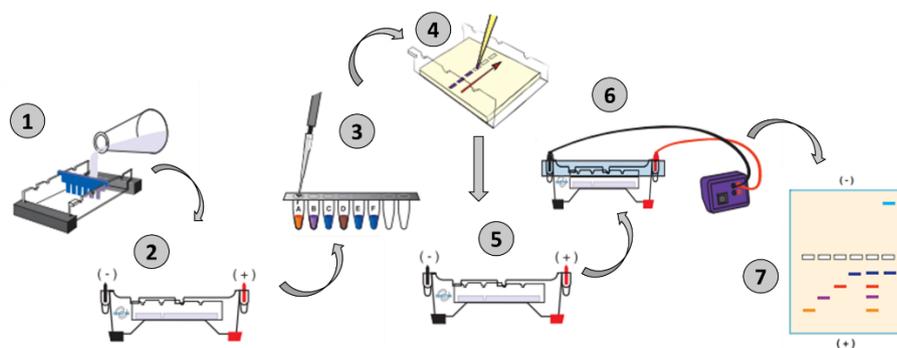


Figure 5.115 : Illustration des étapes de préparation du gel d'agarose

#### 4.2.2. Coloration et décoloration du gel

Après l'électrophorèse, le gel subit une étape de coloration en étant immergé dans une solution composée de 0,15 % de bleu de Coomassie, dilué dans un mélange d'acide acétique, d'éthanol et d'eau distillée selon un rapport volumétrique de 1/2/2, et ce, pendant 20 minutes. Cette étape permet la mise en évidence des protéines sur le gel. Suite à la coloration, le gel est ensuite décoloré en le trempant dans une solution de décoloration composée de 10% d'acide acétique, 20% d'éthanol et 70% d'eau distillée, rendant ainsi les bandes protéiques distinctement visibles sur le gel.

Pour une détection alternative des acides nucléiques, le gel est coloré avec du bromure d'éthidium (ETBr), un colorant fluorescent, utilisé à une concentration de 10 mg/ml. Après cette étape de coloration, le gel est décoloré en utilisant du tampon TBE 1x, qui est renouvelé

toutes les 20 minutes au cours de cette étape, permettant ainsi une observation efficace des acides nucléiques.

#### 4.2.3. Séparation et purification.

Afin de purifier le produit nano bio-hybride, une électrophorèse est réalisée en utilisant de l'agarose à faible point de fusion, sous les mêmes conditions que pour une électrophorèse standard sur agarose. Le gel est soumis à une tension de 100 V (correspondant à 5 V/cm) pour le greffage avec TYMV et RYMV, dans un tampon TBE 1x. La migration est poursuivie jusqu'à ce que la couleur du bleu de coomassie parcourt les trois quarts de la longueur du gel. Pour chaque processus de greffage, deux échantillons sont soumis à l'électrophorèse. L'un des échantillons, coloré avec le bleu de Coomassie, sert de référence pour repérer la bande spécifique à extraire dans le deuxième échantillon, correspondant au greffage des NPs@Citrates sur la capsid virale. Une fois la bande à récupérer identifiée, elle est soigneusement découpée du gel, placée dans un tube Eppendorf de 2 ml, et incubée à 70°C dans un Thermomixer R pendant 10 minutes pour liquéfier le gel d'agarose. Après cela, le tube Eppendorf est refroidi et équilibré à température ambiante pendant 5 minutes. Finalement, de l'agarase (à raison de 1 unité d'enzyme pour 100 mg de gel d'agarose à 1%) est ajoutée pour digérer enzymatiquement l'agarose. Cette digestion se déroule pendant 4 heures à une température de 42°C.

## 5. *Techniques de caractérisation*

### 5.1. Diffraction des rayons X (DRX)

La diffraction des rayons X est une technique analytique [3] qualitative et quantitative qui permet d'analyser des échantillons polycristallins de manière non destructive, en révélant la structure de chaque phase cristalline présente. Pour obtenir les diagrammes de diffraction aux rayons X, une plage angulaire allant de 20 à 100° a été explorée en utilisant le mode 2 $\theta$ , avec une durée de comptage de 20 secondes par pas et un pas angulaire de 0,03°. Un échantillon sous forme de poudre, comprenant une variété de monocristaux avec des orientations aléatoires, est exposé à un faisceau monochromatique de rayons X avec une longueur d'onde  $\lambda$  < 10 nm. Grâce à la présence de nombreux monocristaux, une famille de plans cristallins (hkl) se forme en grand nombre. Lorsque le rayonnement X rencontre cette famille de plans, il subit une diffraction.

L'intensité d'une raie (hkl) résulte de la multiplication de l'intensité diffractée par un cristal élémentaire par le nombre de cristaux en position de Bragg. Cette intensité est directement proportionnelle au facteur de structure  $F_{hkl}$ . Ce facteur est étroitement lié à la nature des atomes dans le plan et à leur position au sein de la structure cristalline. Ainsi, les pics obtenus sur un diffractogramme correspondent aux pics d'intensité résultant du rayonnement diffracté qui respecte la relation de Bragg (Éq. 2) :

$$2d_{hkl} \sin \theta = n \lambda \quad (\text{Éq. 2})$$

Dans laquelle "d" représente la distance inter-réticulaire entre deux plans d'une même famille (hkl), "n" est l'ordre de diffraction, " $\lambda$ " la longueur d'onde du rayonnement, et " $\theta$ " l'angle d'incidence du faisceau. Pour analyser les poudres de nanoparticules nues et fonctionnalisées, il est crucial de disposer d'une quantité substantielle de poudre pour maximiser la quantité de matière diffractante (un minimum de 150 mg). Sur une plaque cylindrique, Cette poudre est uniformément répartie en une couche plane sur une plaque cylindrique, dans des conditions de pression et de température normales.

L'analyse des diffractogrammes obtenus a été effectuée à l'aide d'un Diffractomètre Panalytical X'Pert Pro, utilisant une anode en cobalt comme source de rayons X et un détecteur X'celerator multicanal. Le rayonnement  $K\alpha$  du cobalt ( $\lambda = 0,1789$  nm) a été utilisé. Pour le traitement des diffractogrammes, les logiciels X'pert Highscore (Panalytical) et MAUD, basés sur la méthode de Rietveld associée à l'analyse de Fourier, ont été employés.

L'identification des phases de ces nanoparticules synthétisées s'est faite par comparaison des données expérimentales avec les données de référence contenues dans les fichiers ICSD (Inorganic Crystal Structure Database), qui ont été déjà interprétées dans le chapitre 2. Cette comparaison permet de déterminer la pureté des composés synthétisés ainsi que la taille de cristallite des nanoparticules.

## 5.2. Diffusion dynamique de la lumière (DLS)

La diffusion dynamique de la lumière (DLS) est une technique utilisée pour caractériser la distribution des rayons hydrodynamiques des particules dans les suspensions colloïdales (Figure 5.5). Les particules en suspension dans un solvant subissent un mouvement brownien désordonné et aléatoire [4]. La lumière diffusée par ces particules, provoque des variations d'intensité qui sont évaluées à l'aide de la fonction d'autocorrélation normalisée du deuxième ordre (Éq. 3) :

$$g_2(\tau) = \frac{G_2(\tau)}{I^2} \quad (\text{Éq. 3})$$

Où  $I$  représente l'intensité moyenne,  $\tau$  correspond au temps de corrélation et  $G_2$  (s) désigne la fonction de corrélation temporelle. Par la suite, la fonction de corrélation normalisée du deuxième ordre est reliée à la fonction de corrélation du premier ordre  $g_1(\tau)$  où  $g_1(\tau)$  est exprimé sous la forme (Éq. 4) :

$$g_1(\tau) = \exp(-q^2 D \tau) \quad (\text{Éq. 4})$$

Avec  $q$  le vecteur d'onde de diffusion et  $D$  le coefficient de diffusion. Le vecteur de diffusion  $q$  est exprimé par (Éq. 5) :

$$q = \frac{4\pi n}{\lambda} \sin\left(\frac{\theta}{2}\right) \quad (\text{Éq. 5})$$

En utilisant  $n$  pour représenter l'indice de réfraction de la solution,  $\lambda$  pour la longueur d'onde de la lumière incidente (633 nm) et  $\theta$  pour l'angle de diffusion de la lumière ( $90^\circ$  par rapport au faisceau incident). Les rayons hydrodynamiques  $R_h$  des particules dissoutes sont déterminés à l'aide de l'Équation de Stokes-Einstein :

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta R_h} \sin\frac{\theta}{2} \quad (\text{Éq. 6})$$

Avec  $D$  le coefficient de diffusion,  $k_B$  la constante de Boltzmann,  $T$  la température du solvant,  $\eta$  la viscosité du solvant et  $R_h$  le rayon hydrodynamique des particules en solution.

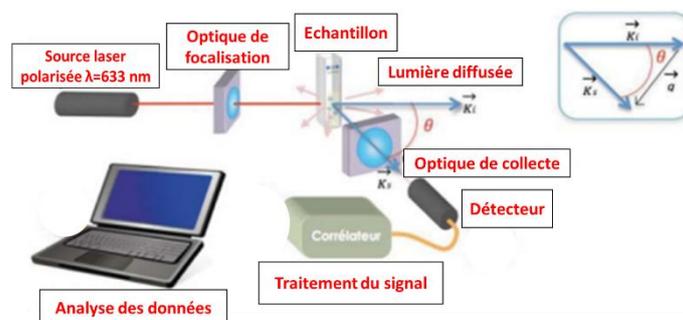


Figure 116.5 : Principe de fonctionnement classique de DLS.

La taille hydrodynamique de la capsid du TYMV et du RYMV, ainsi que celles des nanoparticules synthétisées avant et après la fonctionnalisation, ainsi que les nano bio-hybrides obtenus ont été mesurées par DLS. Cette caractérisation a été effectuée à l'aide de l'appareil Malvern Nano Zetasizer, en utilisant de l'eau distillée comme solvant, et à une température de  $20^\circ\text{C} \pm 0,5^\circ\text{C}$ .

### 5.3. Spectrométrie de photoélectrons X (XPS)

La spectrométrie photoélectronique à rayonnement X (XPS) est une méthode physique utilisée, pour quantitativement analyser la composition chimique en surface des matériaux sur une profondeur variant entre 3 nm et 10 nm. Cela se fait en mesurant le nombre d'électrons émis dans un intervalle d'énergie en fonction de l'énergie de liaison des électrons. L'identification de l'état chimique d'un élément repose sur une analyse précise des positions des pics et de leurs écarts énergétiques.

La mesure par XPS est basée sur l'étude de la distribution en énergie cinétique des photoélectrons éjectés suite à l'irradiation d'un échantillon par des rayons X d'une énergie  $h\nu$  connue. Cette irradiation induit l'ionisation des atomes par effet photoélectronique, ce qui entraîne une variation de l'énergie de liaison des photoélectrons en fonction à l'environnement chimique des atomes auxquels ils sont associés. Les photoélectrons sont éjectés de l'échantillon avec une énergie cinétique  $E_c$ . Cette énergie cinétique est exprimée par l'équation 7 (Éq. 7) :

$$E_c = h\nu - E_L \quad (\text{Éq. 7})$$

Dans laquelle  $h\nu$  l'énergie du photon incident ( $h$  représente la constante de Planck et  $\nu$  la fréquence du photon incident) et  $E_L$  l'énergie de liaison nécessaire pour que l'électron soit éjecté de l'atome.

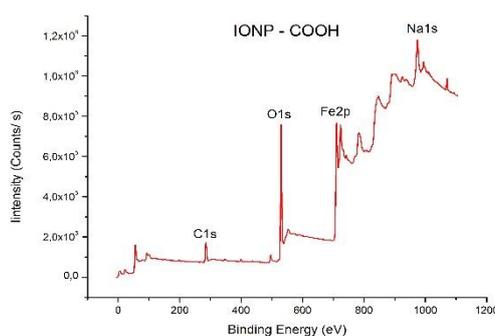


Figure 5.117 : Spectre de photoélectrons induits par des photons de rayon X (XPS) des nanoparticules de maghémite.

Chaque élément chimique est caractérisé par un pic correspondant à son énergie de liaison (Figure 5.6), ce qui permet d'identifier la nature et la proportion des atomes présents en surface du matériau. Les analyses sont réalisées par spectroscopie photoélectronique aux rayons X (XPS) à l'aide d'un système KAlpha+ (Thermo Fisher Scientific, East Grinstead, UK) équipé d'une source monochromatique d'aluminium, émettant la raie  $K\alpha$  à une énergie

de 1486,6 eV. La préparation des échantillons implique le dépôt de gouttelettes de solution sur la face conductrice des plaques de type ITO, suivies de l'évaporation du solvant. Le processus débute dans une enceinte de transfert, où une pression inférieure à  $10^{-7}$  mbar est maintenue. L'échantillon est ensuite déplacé vers la chambre d'analyse, où la pression varie entre  $10^{-8}$  et  $10^{-11}$  mbar. Cette chambre est équipée d'une source de rayons X, d'un analyseur hémisphérique doté d'une détection multiple (6 channeltrons) et d'un dispositif pour le bombardement ionique des surfaces. L'acquisition et le traitement des données s'effectuent grâce à un micro-ordinateur relié au spectromètre, utilisant le logiciel Advantage (VG thermo Electron). Les spectres obtenus sont calibrés par rapport au pic de C-1s à 285 eV, qui sert aussi de point de repère pour la correction de la charge électrique. Afin d'éviter toute contamination en surface, tous les échantillons sont fracturés sous vide poussé avant d'être transférés directement dans la chambre principale de mesure XPS, tout en préservant le vide.

#### 5.4. Microscopie électronique en transmission (MET)

La microscopie électronique en transmission (MET) est une technique de caractérisation microscopique [5] qui permet de visualiser directement la taille des nanoparticules et de mesurer leur degré de dispersion.

Elle utilise des électrons au lieu de la lumière, ainsi que des lentilles magnétiques électroniques pour la focalisation. Les électrons, accélérés depuis une source électronique, sont concentrés en un fin faisceau homogène par la lentille de condensation.

Une petite ouverture au sein de cette lentille de condensation est employée pour exclure les électrons se déplaçant à de grands angles par rapport à l'axe optique, servant ainsi à illuminer l'échantillon. Par la suite, un faisceau d'énergie élevée, généralement compris entre 10 et 100 keV, traverse l'échantillon. Certaines parties de ce faisceau subissent une diffraction, dont l'amplitude dépend de l'épaisseur et de la perméabilité électronique de l'échantillon. Les parties transmises du faisceau sont ensuite focalisées par l'objectif pour former une image. Cette image est ensuite agrandie grâce aux lentilles intermédiaires et projetée sur une caméra électronique CCD (Figure 5.7).

En option, une ouverture d'objectif peut être utilisée pour améliorer le contraste de l'image en ne laissant passer que certaines portions des faisceaux transmis ou diffractés, ou les deux à la fois. Après avoir traversé l'échantillon, les faisceaux dans la même direction sont convergés vers le même point dans le plan focal arrière de l'objectif, créant ainsi le motif de diffraction électronique. Idéalement, tous les électrons diffusés à partir d'un même point

d'échantillonnage se focalisent sur un même point du plan image. Lorsqu'il s'agit de la diffraction des électrons, la mise au point de la lentille intermédiaire est ajustée de manière à ce que le plan focal arrière de l'objectif devienne le plan objet de la lentille intermédiaire. Cette méthode permet par la suite l'enregistrement simultané de l'image électronique et des motifs de diffraction provenant de la même zone d'échantillon.

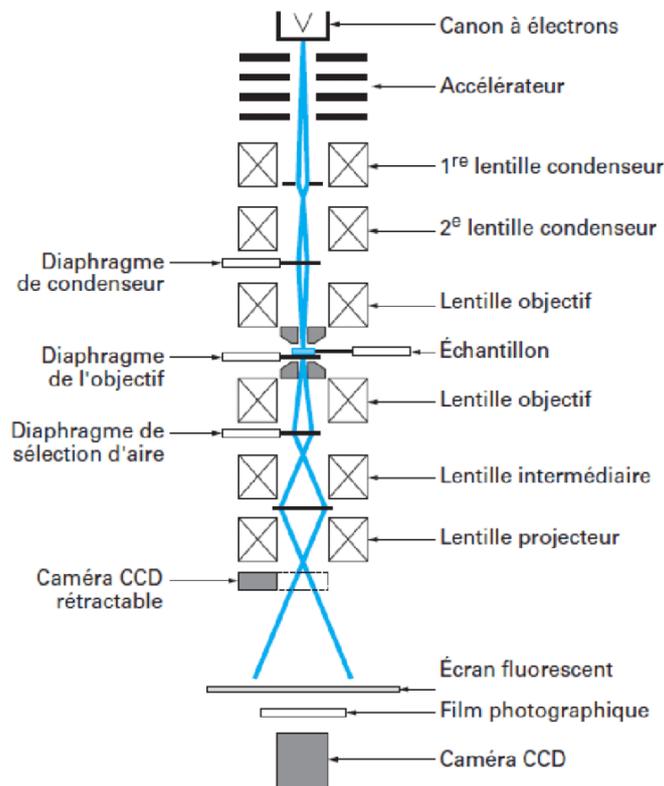


Figure 5.118 : Schéma de principe d'un microscope électronique en transmission

La préparation des échantillons pour la microscopie électronique en transmission (MET) implique diverses étapes. Les nanoparticules dispersées dans l'eau distillée, elles sont déposées sur des grilles de cuivre recouvertes de carbone et laissées à évaporer à température ambiante pendant une nuit, que ce soit pour les nanoparticules nues ou fonctionnalisées. Cependant, lorsque l'objet à visualiser est une molécule organique comme un virus, une étape préalable de coloration est nécessaire. Cette coloration implique l'ajout d'une solution contenant des sels d'atomes lourds tels que l'acétate d'uranyle ou l'acide phosphotungstique (2%), ce qui permet de rendre les objets plus contrastés et plus visibles.

La taille et la distribution moyenne des particules sont évaluées en mesurant la plus grande dimension d'au moins 200 particules pour chaque échantillon.

La taille et la forme des nanoparticules de maghémite sont analysées à l'aide de la microscopie électronique en transmission (MET) sur un appareil « JEOL-100 CXT » fonctionnant à 200 kV.

Ensuite, la taille des nanoparticules est quantifiée en utilisant un logiciel d'analyse d'images appelé « ImageJ ».

### 5.5. Potentiel Zeta

Afin de quantifier la charge à la surface des particules en suspension, le potentiel Zêta ( $\zeta$ ) est mesuré. Ce potentiel permet de décrire les forces électrostatiques répulsives qui opèrent entre deux particules, et par extension, d'évaluer la stabilité colloïdale de ces particules.

La surface d'une particule chargée attire et retient une mince couche de charge opposée, formant une première couche, appelée couche de Stern. Lorsque la particule se trouve en suspension, elle est entourée d'une couche diffuse externe constituée d'ions faiblement liés, créant ainsi une double couche électrique, connue sous le nom de couche de Gouy-Chapman. Le plan de séparation entre ces deux couches est défini comme le plan de cisaillement. La variation de potentiel entre la solution et le potentiel au niveau du plan de cisaillement est le potentiel Zêta [6].

Pour mesurer le potentiel Zêta, on applique un champ électrique d'intensité  $E$ . En présence de ce champ électrique externe, les particules chargées se déplacent vers l'électrode à travers la solution d'échantillon. La vitesse  $V$  des particules est déterminée en observant le décalage de fréquence dans la lumière diffusée. Ce décalage est proportionnel au potentiel électrique de la particule au plan de cisaillement.

La mobilité est obtenue simplement en divisant la vitesse par l'intensité du champ électrique ( $V/E$ ). Le potentiel Zêta est ensuite déduit en utilisant le modèle le plus courant, le modèle de Smoluchowski (Éq. 8) :

$$\zeta = \frac{\mu\eta}{\varepsilon} \quad (\text{Éq. 8})$$

Dans laquelle  $\mu$  représente la mobilité électrophorétique des nanoparticules mesurée,  $\eta$  est la viscosité du milieu, et  $\varepsilon$  est la constante diélectrique du milieu.

L'amplitude du potentiel Zêta fournit une estimation de la stabilité colloïdale. Les particules chargées positivement avec un potentiel Zêta de plus de +20 mV, ou négativement avec un

potentiel Zêta de moins de -20 mV, tendent à présenter un haut degré de stabilité. En revanche, les valeurs de potentiel Zêta inférieures à +20 mV ou supérieures à -20 mV conduisent à une agrégation, une coagulation ou une floculation en raison de la déstabilisation des particules en suspension et de l'attraction interparticulaire de van der Waals.

Pour déterminer le point isoélectrique de la capsidite du TYMV et du RYMV (à une concentration de 100 µg/ml), les particules à examiner ont été dispersées dans un solvant adéquat avec un pH 7. Pour chaque échantillon, trois mesures de potentiel Zêta ont été effectuées à l'aide de l'appareil Malvern Nano Zetasizer.

### 5.6. Analyse thermogravimétrique (ATG)

L'analyse thermogravimétrique est une méthodologie qui associe les principes de l'analyse gravimétrique et thermique de manière dynamique. Cette technique permet de caractériser un système, qu'il s'agisse d'un élément, d'un composé ou d'un mélange, en surveillant les variations de la masse de l'échantillon en fonction du temps et de la température jusqu'à ce que son poids se stabilise [7]. Cette démarche continue permet d'identifier à quelles températures les changements surviennent, ce qui peut apporter des éclaircissements sur des phénomènes tels que la libération d'eau ou la dégradation avec émission de gaz.

Le dispositif est composé d'une microbalance et d'un système de chauffage évalué les variations de masse qui sont ensuite capturées par un dispositif d'acquisition.

Dans le cadre de cette étude, des analyses thermogravimétriques ont été réalisées sur tous les échantillons, en couvrant une plage de températures allant de l'ambiante jusqu'à 800 °C, et ce dans une atmosphère d'air. Ces analyses ont fourni des informations détaillées sur la perte de poids associée aux variations de température.

Tout d'abord, l'échantillon à étudier est préparé avec précision en pesant la quantité nécessaire. Cette quantité est ensuite placée dans une cellule d'analyse spéciale. Avant de débiter l'analyse, l'appareil est calibré en utilisant des matériaux de référence, tandis que l'environnement de l'analyse est choisi, que ce soit de l'azote ou de l'air. Ensuite, les températures à appliquer sont programmées. Pendant que l'échantillon est chauffé, l'appareil enregistre les variations de sa masse.

### 5.6. SQUID

Le Dispositif à Effet Quantique d'Interférence Supraconducteur, ou SQUID (Superconducting Quantum Interference Device), est un instrument permettant de mesurer l'aimantation des

matériaux magnétiques en relation avec le champ magnétique ou la température. Pour ce faire, les caractéristiques magnétiques sont évaluées en déplaçant l'échantillon de haut en bas, successivement, dans un gradientmètre supraconducteur magnétisé avec un champ magnétique statique H [8].

Ce gradientmètre est composé de bobines conçues pour éliminer l'effet des courants induits par les variations d'un champ magnétique extérieur (Figure 5.8). Chaque boucle du gradientmètre correspond à une position de l'échantillon. Le mouvement engendre une variation de flux magnétique, ce qui génère un courant électrique dans un circuit supraconducteur. Le détecteur SQUID RF convertit ce courant global en tension. Cette tension, issue de l'amplificateur et liée à la position de l'échantillon, constitue le signal d'extraction. Ainsi, le moment magnétique est déduit en ajustant ce signal d'extraction.

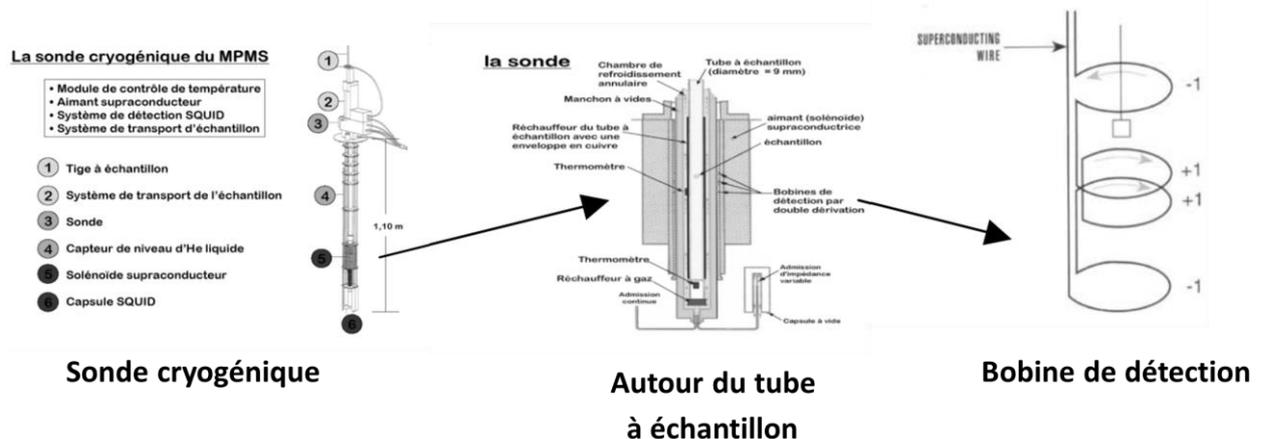


Figure 5.119 : Illustration de la sonde et la bobine de détection du magnétomètre

Les mesures de l'aimantation en fonction du champ magnétique sont réalisées à une température de 300 K, couvrant une plage de champs allant de -50 000 Oe à 50 000 Oe. Pour ce faire, une quantité d'environ une dizaine de milligrammes de poudre contenant les nanoparticules à caractériser est soigneusement pesée. Cette poudre est ensuite placée dans une gélule diamagnétique, qui est suspendue à l'extrémité d'une canne. Cette canne est ensuite insérée dans le magnétomètre équipé de la technologie SQUID, de manière à positionner l'échantillon à l'intérieur du gradientmètre.

L'ajustement précis de la position de l'échantillon s'effectue automatiquement, plaçant l'échantillon au milieu du gradientmètre. Cet ajustement est accompli par le déplacement de la canne le long de l'axe du gradientmètre.

### 5.7. Magnétométrie à Échantillon Vibrant (VSM)

Le magnétomètre à échantillon vibrant (VSM) est un instrument de mesure magnétique élaboré pour évaluer précisément les caractéristiques magnétiques des diverses substances, y compris les poudres, les liquides et les couches minces en fonction du champ magnétique appliqué. Ce dispositif est composé de plusieurs éléments essentiels.

Elle est équipée d'un cryostat qui fonctionne dans une plage de température allant de 77 K à 950 K et d'un système spécialisé pour le contrôle précis de la température. Un électroaimant intégré est capable de produire des champs magnétiques s'étendant de 0 à 2.4 T. L'appareil comprend également un porte-échantillon vibrant et un mécanisme de détection comprenant deux ensembles de bobines de détection, qui sont fondamentaux pour les mesures de moment magnétique. De plus, un ensemble informatique gère les opérations de base de la façon la plus automatisée possible.

Pour assurer l'exactitude des mesures, une calibration préalable du système est effectuée en utilisant une sphère de nickel avec un moment magnétique bien défini. Le logiciel du fabricant facilite cette étape en permettant l'introduction de la valeur du moment magnétique de la sphère de nickel pour l'étalonnage.

Lors de la caractérisation magnétique, l'échantillon est positionné sur un porte-échantillon situé entre les deux bobines de l'électroaimant, dans un champ magnétique homogène et à la température ambiante (Figure 5.9). Le mouvement de l'échantillon génère des variations de flux magnétique, qui sont captées par les bobines de détection et converties en tension, dont l'amplitude reflète le moment magnétique de l'échantillon. Cela permet de réaliser un cycle d'hystérésis en enregistrant l'aimantation spécifique pour chaque valeur de champ magnétique appliqué, considérant que ce champ est statique. La relation existante entre la force électromotrice du champ magnétique émis par l'échantillon en mouvement et le moment magnétique spécifique  $\sigma$  ( $\text{Am}^2 \cdot \text{Kg}^{-1}$ ) est utilisée pour calculer ce dernier selon l'équation 10 :

$$\sigma = C \frac{E}{m f} \quad (\text{Éq. 10})$$

Avec  $C$  une constante qui dépend du nombre de spires, de l'aire des bobines et de la géométrie du système de détection ;  $E$  l'amplitude de la tension induite, mesurée aux bornes des bobines de mesure (V) et  $f$  la fréquence de vibration de l'échantillon.

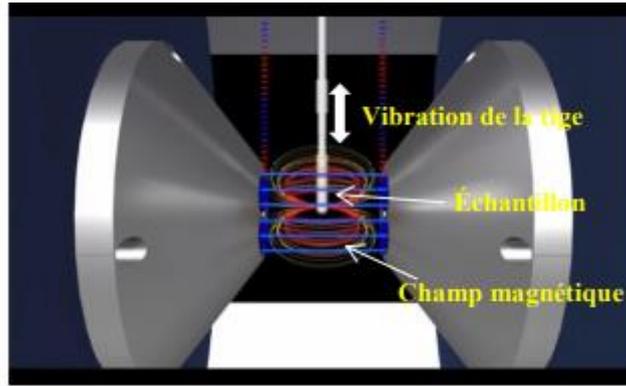


Figure 5.120 : Schéma du principe de mesure dans le VSM

Ce protocole de mesure est effectué avec un magnétomètre à échantillon vibrant, avec une capacité de champ magnétique maximal de 2.4 T. L'expérience est centrée sur la mesure de l'aimantation  $M$  en fonction du champ appliqué ( $H$ ) à l'échantillon pour obtenir le cycle d'hystérésis  $M = f(H)$ . En plus, il est possible d'effectuer une mesure de l'aimantation en fonction de la température  $M = f(T)$  pour identifier les points de transition thermique du matériau examiné.



Figure 5.121 : Magnétomètre à échantillon vibrant (VSM)

Afin de mesurer le cycle d'hystérésis, on prépare d'abord un échantillon propre et représentatif. Ce dernier est ensuite positionné dans un dispositif de mesure approprié (Figure 5.10). Les conditions requises pour observer le cycle d'hystérésis sont ensuite appliquées. L'instrument enregistre la réaction de l'échantillon durant cette phase. Une fois toutes les données collectées, on les analyse pour comprendre le comportement du matériau. Ces mesures nous permettent en fin de compte de tirer des conclusions sur les caractéristiques du matériau.

## 5.8. Hyperthermie

L'Hyperthermie Magnétique est une technique médicale novatrice exploitant la capacité de certaines nanoparticules magnétiques à transformer l'énergie d'un champ magnétique alternatif en chaleur. Cette méthode permet de cibler et de chauffer de manière sélective les cellules cancéreuses, entraînant leur destruction sans affecter les tissus environnants sains [9]. Le principe physique de cette technique repose sur l'interaction entre les particules magnétiques et le champ magnétique appliqué.

Dans la pratique, après la préparation des nanoparticules magnétiques, l'échantillon est positionné et un champ magnétique alternatif est appliqué. Sous l'effet de ce champ, les particules magnétiques produisent de la chaleur en raison de l'hystérésis magnétique et de la relaxation de Néel et Brown, entraînant une élévation de la température.

Le dispositif d'hyperthermie magnétique inclut un générateur de champ magnétique capable de créer un champ magnétique alternatif précisément caractérisé dans un volume déterminé. Ce champ se doit d'être homogène dans le volume utilisé afin de garantir une distribution uniforme de la chaleur. La fréquence du champ magnétique alternatif, employée dans les expériences d'hyperthermie magnétique, varie entre 50 kHz (pour éviter l'électrostimulation neuromusculaire) et 1 MHz, permettant une pénétration en profondeur adéquate du champ en radiofréquence [10].

Pour produire un champ magnétique d'intensité élevée, un courant alternatif de même fréquence circule à travers un conducteur, souvent configuré en bobine. Deux principales stratégies sont utilisées : la première fait appel à des bobines à air, le volume utilisable et l'échantillon étant positionnés au centre de la bobine, où le champ est le plus homogène et intense. La seconde stratégie emploie des noyaux ferromagnétiques doux pour concentrer le flux magnétique au sein de l'échantillon, produisant ainsi un champ plus uniforme.

Pour évaluer les capacités thermiques, des échantillons colloïdaux de nanoparticules magnétiques d'oxyde de fer sont élaborés à diverses concentrations. Ils sont ensuite placés dans un tube en verre, qui est inséré dans une bobine de champ magnétique. Les mesures sont effectuées avec une variation d'amplitude du champ de 4, 8, 12 et 16 kA/m et à une fréquence de 280 kHz et 344 kHz pour la magnétométrie à courant alternatif. L'efficacité des nanoparticules à produire de la chaleur sous l'influence d'un champ magnétique alternatif est analysée à travers la puissance de perte spécifique (SAR), qui est définie comme la quantité

de chaleur libérée par gramme de matière magnétique par seconde pour chacune des deux méthodes utilisées.

Pour mener à bien ces expériences, le système Advance AC Hyster a été utilisé. Il s'agit d'un magnétomètre automatisé qui permet de sélectionner une ou plusieurs conditions de champ pour programmer des mesures de magnétisation individuelles ou multiples en un temps réduit (moins de 3 minutes). Ce système est capable de générer des champs magnétiques alternatifs à huit fréquences différentes, dans une plage de 25 à 350 kHz, avec des valeurs d'intensité allant jusqu'à 24 kA/m pour toutes les fréquences disponibles, variant tous les 4 kA/m.

### 5.9. Photothermie

La photothermie est une technologie médicale de pointe basée sur des principes physiques essentiels permettant de convertir efficacement la lumière en chaleur. Ce mécanisme s'effectue par l'absorption de la lumière par des agents photosensibles, tels que des nanoparticules spécifiquement conçues, suivie d'une transformation en chaleur. Cela permet une élimination ciblée des cellules affectées sans affecter les tissus sains environnants [11].

Dans ce contexte, les nanoparticules jouent un rôle crucial. Elles sont fabriquées pour absorber de manière optimale la lumière, en particulier dans la région du proche infrarouge, grâce à leurs propriétés optiques distinctives. Cette absorption de la lumière génère de la chaleur, un processus qui est finement surveillé pour garantir son efficacité et sa sécurité.

La solution à analyser est introduite dans une petite cuvette en quartz. Cette cuvette est ensuite placée dans un porte-échantillon, où une sonde est immergée, en contact direct avec la solution. Cette configuration permet une surveillance en temps réel des variations de température, rendue possible par l'utilisation de capteurs spécifiques situés à proximité des nanoparticules. Ces instruments transmettent des données de température en continu, autorisant une adaptation automatique des paramètres du laser afin de prévenir toute surchauffe. Cette gestion rigoureuse garantit une montée en température contrôlée et uniforme pendant toute la durée de la procédure. Avant d'entamer les mesures, il est essentiel de s'assurer que le laser est correctement centré (Figure 5.11).



Figure 5.122 : Calibration du laser avant le début des mesures photothermiques.

Les travaux expérimentaux ont été effectués en collaboration avec la Vietnam Academy of Science and Technology (VAST). Ces expériences ont mis en œuvre des diodes laser de 808 ou 532 nm, opérant à une densité de puissance de  $0,42 \text{ W/cm}^2$ , et les mesures de température ont été réalisées à l'aide de thermomètres en platine PT100.

Par ailleurs, une autre collaboration avec le Laboratoire de Chimie des Polymères Organiques (LCPO) situé à Bordeaux, en France, a permis de réaliser des études en utilisant un laser de 808 nm d'une puissance de 83 mW. Au cours de ces expérimentations, les fluctuations de température des échantillons, éclairés par la diode laser, ont été enregistrées en temps réel, garantissant ainsi un suivi et une régulation constante tout au long du processus.

Les expériences photothermiques ont été réalisées en utilisant une irradiation laser à une longueur d'onde de 808 nm avec une densité de puissance variable (de  $0,165$  à  $1,5 \text{ W/cm}^2$ ).

Pour chaque expérience, un volume de  $200 \mu\text{L}$  de colloïdes aqueux d'oxyde de fer, libre et greffé, fraîchement préparés a été employé.

## 5.10. Spectroscopie de fluorescence X

La spectroscopie de fluorescence X est une technique analytique puissante utilisée pour déterminer la composition élémentaire des échantillons. Son principe repose sur l'émission de rayons X caractéristiques suite à l'excitation des atomes dans un échantillon. Ce processus commence par l'irradiation de l'échantillon avec des rayons X ou gamma de haute énergie, qui sont suffisamment puissants pour perturber les électrons des couches internes, généralement les couches K ou L, des atomes de l'échantillon.

Lorsque ces rayons X ou gamma frappent l'échantillon, ils éjectent les électrons des couches internes, créant ainsi des "trous". Pour combler ces trous, des électrons des couches électroniques supérieures descendent vers les couches inférieures, libérant de l'énergie sous forme de rayons X pendant ce processus. La longueur d'onde ou l'énergie de ces rayons X émis est spécifique à chaque élément chimique, étant donné qu'elle est déterminée par la différence d'énergie entre les niveaux électroniques impliqués.

Ces rayons X caractéristiques sont ensuite détectés par un détecteur de fluorescence X. Le spectre résultant fournit une empreinte unique pour chaque élément, permettant ainsi d'identifier et de quantifier les éléments présents dans l'échantillon. La spectroscopie de fluorescence X est appréciée pour sa capacité à fournir des analyses qualitatives et quantitatives des éléments dans divers types d'échantillons, tels que les solides, les poudres et les liquides. Elle trouve des applications dans de nombreux domaines, notamment en géologie, en chimie environnementale, dans les sciences des matériaux, et même en archéologie.

Pour mesurer la concentration de fer, la procédure commence par la calibration, où différents échantillons contenant des masses de fer variant de 0 à 30  $\mu\text{g}$  sont préparés. Ces échantillons sont obtenus en prélevant différents volumes d'une solution commerciale de fer, d'une concentration précise de 1 g/L, et en les déposant sur une membrane de polycarbonate.

La même méthode est ensuite appliquée aux échantillons à analyser. On prélève 6  $\mu\text{L}$  de chaque échantillon, que l'on dépose sur la membrane de polycarbonate dans les mêmes conditions que précédemment. En déterminant la masse de fer présente dans ces 6  $\mu\text{L}$ , il est possible de calculer la concentration de fer dans l'échantillon en g/l.

## 6. Références

- [1] M. A. Canady, S. B. Larson, J. Day, and A. Mcpherson, “mosaic virus,” vol. 3, no. 9, pp. 771–781, 1996.
- [2] C. Brugidou, N. Opalka, M. Yeager, R. N. Beachy, and C. Fauquet, “Stability of rice yellow mottle virus and cellular compartmentalization during the infection process in *Oryza sativa* (L.),” *Virology*, vol. 297, no. 1, pp. 98–108, 2002, doi: 10.1006/viro.2002.1398.
- [3] F. Serna, J. Lagneau, and J.-M. Carpentier, “La diffraction des rayons X : une technique puissante pour résoudre certains problèmes industriels et technologiques,” *Diffr. des rayons X Catal.*, no. 1, pp. 1–11, 2014, [Online]. Available: [http://chimienouvelle.be/CN116web/CN166\\_serna.pdf](http://chimienouvelle.be/CN116web/CN166_serna.pdf)
- [4] M. Mainard and D. Jacob, “Comprendre. La mesure de taille de nanoparticules par diffusion dynamique de la lumière,” *Photoniques*, vol. 1827, no. 83, pp. 40–44, 2016, doi: 10.1051/photon/20168340.
- [5] J. M. Zuo and J. C. H. Spence, *Jian Min Zuo, John C.H. Spence (auth.)-Advanced Transmission Electron Microscopy\_ Imaging and Diffraction in Nanoscience-Springer-Verlag New York (2017) (1).pdf*. 2017.
- [6] P. Moulin and H. Roques, “Zeta potential measurement of calcium carbonate,” *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 261, no. 1, pp. 115–126, 2003, doi: 10.1016/S0021-9797(03)00057-2.
- [7] F. Achchaq, K. Djellab, L. Marmoret, and H. Beji, “Analyse thermogravimétrique appliquée aux matériaux isolants fibreux,” *Lab. des Technol. Innovantes, Amiens*, no. May 2014, pp. 1–6, 2009.
- [8] R. L. Fagaly, “Superconducting quantum interference device instruments and applications,” *Rev. Sci. Instrum.*, vol. 77, no. 10, 2006, doi: 10.1063/1.2354545.
- [9] M. Dewhirst, P. R. Stauffer, S. Das, and O. I. Craciunescu, “Mark Dewhirst, Paul R. Stauffer, Shiva Das, Oana I. Craciunescu, and Zeljko Vujaskovic,” p. 381.
- [10] S. Mornet *et al.*, “Magnetic nanoparticle design for medical applications,” *Prog. Solid State Chem.*, vol. 34, no. 2–4, pp. 237–247, 2006, doi:

10.1016/j.progsolidstchem.2005.11.010.

- [11] X. Huang, I. H. El-Sayed, W. Qian, and M. A. El-Sayed, "Cancer cells assemble and align gold nanorods conjugated to antibodies to produce highly enhanced, sharp, and polarized surface Raman spectra: A potential cancer diagnostic marker," *Nano Lett.*, vol. 7, no. 6, pp. 1591–1597, 2007, doi: 10.1021/nl070472c.